UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO-EMILIA
Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali

Classe LM-8

Bioconversione dello xilosio in xilitolo mediante *Pichia fermentans* WC 1507: impiego della mutagenesi UV e chimica per migliorare la tolleranza al furfurale.

Tesi di Laurea di:

Giulia Guarriello

Relatore:

Professor Alberto Amaretti

Co-relatore:

Dott.ssa Giulia Zanfi

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 5

1.1 BIOMASSE ED ECONOMIA CIRCOLARE 5

1.1.1 BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE 5

1.1.2 EMICELLULOSA 7

1.1.3 PRETRATTAMENTO ORGANOSOLV PER L'ESTRAZIONE DELL'EMICELLULOSA DALLA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA 9

1.2 XILOSIO E XILITOLO 11

1.2.1 XILOSIO 11

1.2.2 XILITOLO 12

1.3 *PICHIA FERMENTANS* 14

1.4 FURFURALE 15

2. SCOPO DELLA TESI 18

3. MATERIALI E METODI 19

3.1 CEPPO E CONDIZIONI DI COLTURA 19

3.2 PROVE DI CRESCITA E PRODUZIONE IN PRESENZA DI INIBITORI 21

3.2.1 PREPARAZIONE DEL *BLACK LIQUOR* 21

3.2.2 DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE 22

3.2.3 PROVE DI PRODUZIONE E DI TRASFORMAZIONE DEL FURFURALE 25

3.3 MUTAGENESI 25

3.3.1 MUTAGENESI UV 25

3.3.2 MUTAGENESI CHIMICA CON ETIL-METANSULFONATO (EMS) 26

3.4 SCREENING PER LA RESISTENZA AL FURFURALE 27

3.4.1 SELEZIONE SU PIASTRA *PETRI* 27

3.4.2 SCREENING LIQUIDO IN PIASTRE DA 24 POZZETTI 27

3.4.3 SCREENING LIQUIDO IN TUBO DA BATTERIOLOGIA 28

3.4.4 DILUIZIONE SU PIASTRA *PETRI* 29

3.5 TECNICHE ANALITICHE 30

3.5.1 QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA CELLULARE TRAMITE SPETTROFOTOMETRIA 30

3.5.2 CONTA CELLULARE MEDIANTE CAMERA DI BÜRKER 31

3.5.3 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI XILOSIO, XILITOLO, FURFURALE E METABOLITI DEL FURFURALE MEDIANTE ANALISI HPLC 32

4. RISULTATI E DISCUSSIONE 35

4.1 PRODUZIONE DI XILITOLO CON *P. FERMENTANS* WC 1507 35

4.2 MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE DI FURFURALE, 5-IDROSSIMETIL-FURFURALE E ACIDO ACETICO 38

4.3 EFFETTO DEL FURFURALE SULLA PRODUZIONE DI XILITOLO 41

4.4 MUTAGENESI UV 43

4.5 SCREENING DI CEPPI MUTANTI 47

4.5.1 SCREENING LIQUIDO IN TUBO DA BATTERIOLOGIA 48

4.5.2 SCREENING MEDIANTE DILUIZIONI SU PIASTRA *PETRI* 49

4.6 PROVE DI PRODUZIONE CON E SENZA FURFURALE 51

4.7 MUTAGENESI CHIMICA CON ETIL-METANSULFONATO 55

5. CONCLUSIONI 59

6. BIBLIOGRAFIA 62

1. INTRODUZIONE

1.1 BIOMASSE ED ECONOMIA CIRCOLARE

Nell'ottica di raggiungere gli obiettivi dell'economia circolare e di ridurre la dipendenza da risorse fossili sempre più scarse e gravate da un impatto ambientale rilevante, negli ultimi decenni si è assistito ad una graduale evoluzione dei processi produttivi industriali. In questo contesto, le biomasse si sono progressivamente affermate come una risorsa centrale nella transizione verso un modello di sviluppo più sostenibile, in grado di coniugare la valorizzazione degli scarti con la produzione di composti ad alto valore aggiunto, riducendo al contempo la pressione sugli ecosistemi naturali e sulle riserve non rinnovabili del pianeta (Sherwood, 2020).

Il *CEAP - Circular Economy Action Plan* - individua esplicitamente le biomasse e i prodotti *bio-based* come uno dei settori strategici su cui intervenire per ridurre la dipendenza dalle risorse fossili e valorizzare i flussi di scarto. In questo contesto, le biomasse rappresentano un esempio concreto di applicazione dei principi del CEAP. Queste, infatti, permettono di valorizzare un rifiuto come risorsa, non competono con la produzione alimentare e permettono di produrre materiali, energia o composti bio-based riducendo l'estrazione di materie prime vergini, coerentemente con i principi cardine dell'economia circolare (riduzione, riuso, riciclo, recupero) (Commissione europea, *A new Circular Economy Action Plan*, COM 2020).

Con il termine biomassa si fa riferimento a un prodotto solido biogenico, organico-inorganico e complesso, di natura non fossile, generato sia da processi naturali sia antropogenici (tecnogenici). Essa comprende due componenti principali: da un lato, i costituenti naturali, originati dalla vegetazione terrestre e acquatica attraverso la fotosintesi, oppure derivanti dalla digestione di cibo da parte di animali e dell'uomo; dall'altro, i prodotti tecnogenici, ottenuti dalla lavorazione di tali costituenti naturali. Le diverse varietà di biomassa impiegabili come risorse combustibili possono essere classificate, in modo preliminare e approssimativo, in gruppi e sottogruppi distinti, sulla base della loro diversità biologica e della similarità di fonte e origine (Zhongye Li et al., 2024).

1.1.1 BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE

Le biomasse lignocellulosiche (LCB) rappresentano un gruppo importante di biomasse, caratterizzato da una grande diversità sia nella composizione che nei suoi potenziali prodotti finali. (Segers et al., 2024).

Queste possono essere suddivise in due categorie: le biomasse di prima generazione, derivate da colture dedicate o vergini (colture energetiche, erbe/colture erbacee, conifere e latifoglie) e le biomasse di seconda generazione, rappresentate da residui e scarti lignocellulosici generati da fabbriche e popolazioni. (Vassilev et al., 2010. Segers et al., 2024)

Per sostenere la transizione verde, diventa fondamentale il riutilizzo di materie prime LCB di seconda generazione. Rispetto a quelle di prima generazione, le LCB di seconda generazione offrono numerosi vantaggi; tra questi evitano la competizione con la produzione di cibo e fibre, eliminano la necessità di cambiamenti nell'uso del suolo, contribuendo alla conservazione della biodiversità, non richiedono l'impiego di nuovi materiali, facilitano le strategie di gestione dei rifiuti grazie all'impiego degli scarti come risorsa. (Vassilev et al., 2010).

Nonostante i numerosi vantaggi, l'utilizzo della biomassa lignocellulosica al posto delle risorse fossili presenta ancora alcune difficoltà tecnologiche legate in primo luogo alla complessità strutturale della biomassa stessa che rende difficile il processo di conversione. Questo processo di conversione è ulteriormente complicato dall'eterogeneità intrinseca della biomassa lignocellulosica e dei suoi componenti, in particolare la lignina. (Segers et al., 2024). Inoltre, a seconda dell'origine della materia prima (biomassa vergine o rifiuti lignocellulosici), possono essere presenti anche impurità (quali metalli e derivati della plastica) che possono rappresentare un ostacolo alla valorizzazione.

Le biomasse lignocellulosiche sono costituite essenzialmente da tre componenti principali (*Fig. 1.1*):

- **Cellulosa (40-55%)**: un polimero formato da lunghe catene lineari di 500-1400 unità di glucosio, legate tramite legami β-1,4-glicosidici, organizzate in fibrille parallele stabilizzate da legami a idrogeno e inglobate nella matrice lignocellulosica. Sebbene la cellulosa sia generalmente cristallina, nelle piante o nella biomassa si può osservare una combinazione di regioni amorfe e cristalline. Il grado di polimerizzazione dipende dal tipo di biomassa lignocellulosica.
- **Lignina (20-30%)**: un polimero complesso formato da unità fenilpropaniche legate tra loro a creare una struttura aromatica tridimensionale, che conferisce elevata resistenza alla degradazione chimica ed enzimatica.
- **Emicellulosa (20-30%)**: un eteropolimero composto da monomeri a cinque o sei atomi di carbonio (come arabino-xilani, glucani, galattani e mannani), caratterizzato da una

struttura amorfa facilmente scomponibile mediante trattamenti termici o con acidi diluiti (Carvalho et al., 2004).

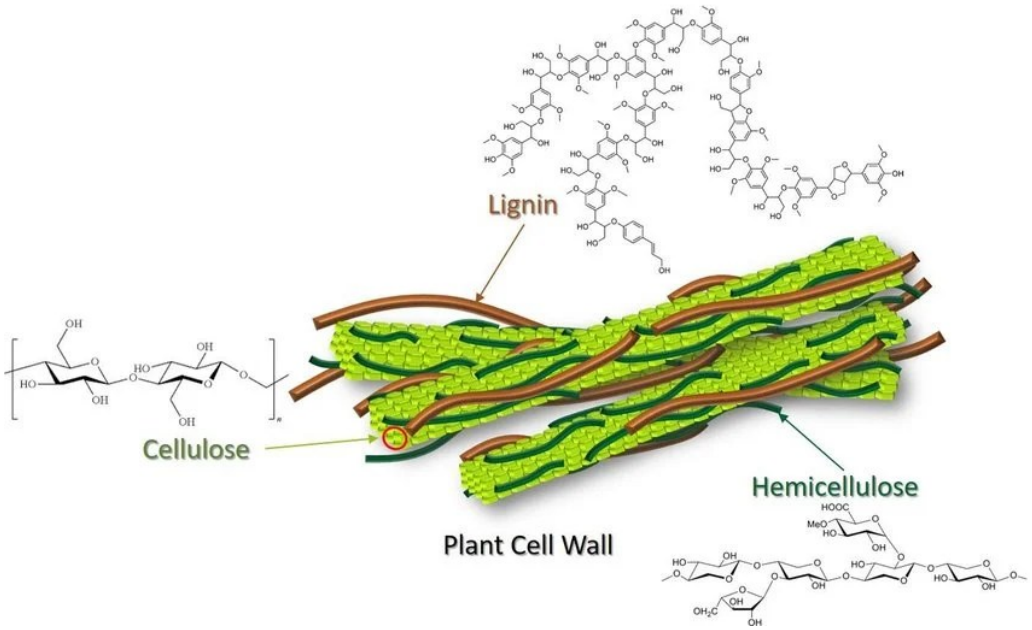


Figura 1.1: Composizione delle biomasse lignocellulosiche. (Da Jensen et al., 2017).

1.1.2 EMICELLULOSA

L'emicellulosa è, dopo la cellulosa, il secondo biopolimero più abbondante nel regno vegetale ed è un materiale polisaccaridico relativamente sottoutilizzato rispetto alla cellulosa e alla lignina. Nonostante ciò, i recenti progressi nelle tecniche di estrazione e modifica hanno aperto nuove strade per il suo utilizzo in applicazioni di alto valore. La produzione annuale di emicellulosa è stimata in circa 60 miliardi di tonnellate (Gautam et al., 2025).

Le emicellulose sono i componenti più complessi ed eterogenei nella parete cellulare di legno, paglia ed erbe, formando legami a idrogeno con la cellulosa, legami covalenti (principalmente α-benzilici) con le lignine ed esteri con unità acetiliche e acidi idrossicinnamici (Jun-Li Ren et al., 2009).

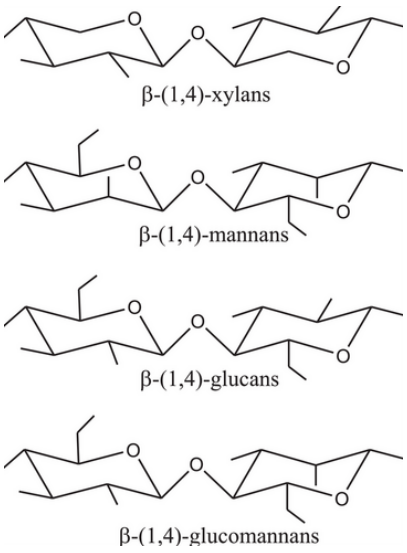
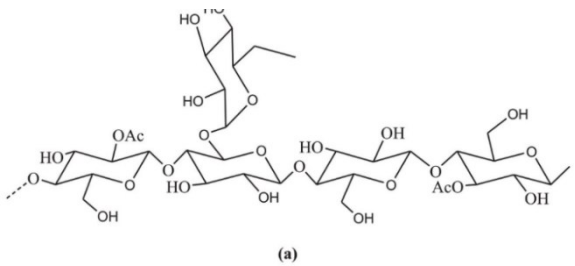


Figura 1.2: Monomeri zuccherini principalmente presenti all'interno dell'emicellulosa. (Da Gautam et al., 2025).

Lo scheletro dell'emicellulosa è costituito da monomeri di zucchero come xilani, mannani, glucani e glucomannani, con brevi ramificazioni collegate da legami β-(1,4)-glicosidici e occasionalmente anche legami β-(1,3)-glicosidici (*Fig. 1.2*).

Xilani e glucomannani sono le emicellulose più rilevanti. Gli xilani sono i più abbondanti, andando a costituire circa il 20%-30% della biomassa dei legni duri e fino al 50% di quella di alcune erbe e cereali. I glucomannani sono i principali componenti emicellulosici della parete secondaria delle conifere.

Composizione, struttura e quantità di emicellulosa variano significativamente in base alla fonte di biomassa: nelle conifere (definite *soft wood*) prevalgono i galatto-glucomannani; la struttura tipica è O-acetil-galattoglucomannano, con uno scheletro di mannosio e glucosio disposti casualmente. Nelle latifoglie (*hard wood*) prevalgono i glucurono-xilani; la struttura tipica è O-acetil-(4-O-metilglucurono) xilano, dove circa il 10% delle unità di xilopiranosio è sostituito con acido 4-O-metilglucuronico. Infine, nei residui agricoli, è particolarmente comune la presenza di xilani, simili a quelli del *hard-wood*, oltre ad altre strutture di emicellulosa.



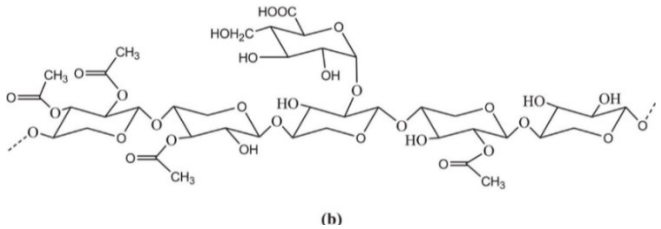


*Figura 1.3: Struttura chimica dei legni teneri (**a**) e legni duri (**b**) (Da Gautam et al., 2025).*

Grazie alla sua natura disomogenea e alla presenza di numerose ramificazioni, l'emicellulosa presenta un buon grado di affinità con l'acqua. Rispetto alla cellulosa, si distingue per una struttura amorfa fortemente intrecciata, un peso molecolare contenuto e un grado di polimerizzazione relativamente basso (indicativamente tra 80 e 425 unità), fattori che la rendono più facilmente attaccabile dai processi idrolitici.

Per quanto riguarda la solubilità, il comportamento varia a seconda del solvente: l'emicellulosa è solubile in acqua e in soluzioni alcaline acquose, mentre risulta insolubile nella maggior parte dei solventi organici. A temperatura ambiente resta praticamente insolubile in acqua; solo superando i 200°C l'idrolisi diventa efficace, portando la struttura a solubilizzarsi. Un ambiente acido favorisce ulteriormente questo processo, accelerando la rottura dei legami: attraverso l'idrolisi acida, infatti, la catena polimerica si scinde nei singoli zuccheri che la compongono - principalmente xilosio, arabinosio e glucosio - oltre ad altri sottoprodotti. (Gautam et al., 2025).

1.1.3 PRETRATTAMENTO *ORGANOSOLV* PER L'ESTRAZIONE DELL'EMICELLULOSA DALLA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA

La separazione dell'emicellulosa è un compito complesso a causa della sua intricata associazione con lignina e cellulosa, ma la sua estrazione è cruciale per applicazioni che vanno dai biocarburanti ai biopolimeri. Pertanto, lo sviluppo di metodi di estrazione efficaci ed ecocompatibili rappresenta un'area di ricerca fondamentale (Gautam et al., 2025).

Un'ampia varietà di protocolli di pretrattamento sono stati sviluppati e rivisitati, ma solo alcuni di questi appaiono adeguati, tra cui il pretrattamento con acido diluito, lo *steam explosion*, il pretrattamento idrotermico e il pretrattamento *organosolv* (Gautam et al., 2025. Gandolfi et al., 2014).

Il processo *organosolv* prevede in genere tre differenti fasi. Inizialmente, la biomassa viene miscelata con un solvente organico (ad esempio etanolo) o una miscela di solventi, acido solforico 1–4% e trattata ad elevate temperature (es. 160 °C) e pressioni per 30–60 min. Il solvente penetra nella struttura della biomassa, solubilizza la lignina e rompe i complessi lignina-carboidrati che legano insieme tali componenti nella parete cellulare vegetale, migliorando l'accessibilità alla cellulosa. L'acido solforico diluito, invece, contribuisce ad idrolizzare l'emicellulosa, che è più labile della componente cellulosica, la quale rimane intatta sotto forma di polpa parzialmente de-cristallizzata. Successivamente, la miscela biomassa-solvente viene separata mediante filtrazione in una frazione solida (la polpa ricca di cellulosa) e una frazione liquida, contenente lignina solubilizzata, zuccheri dell'emicellulosa e solvente. Queste frazioni possono quindi essere ulteriormente lavorate separatamente (Celignis bioprocess, 2026).

La polpa di cellulosa è indirizzata alla saccarificazione mediante cocktails enzimatici cellulolitici (principalmente endoglucanasi, esoglucanasi, cellobioidrolasi e beta-glucosidasi) per la sua idrolisi a glucosio e per la successiva fermentazione. La fase liquida, contenente la lignina solubilizzata e i monosaccaridi (principalmente pentosi) generati dall'idrolisi della emicellulosa in una soluzione di acqua-etanolo, è invece indirizzata alla separazione della lignina dalla componente saccaridica. L'aggiunta di acqua e l'allontanamento del solvente mediante distillazione determinano la perdita di solubilità della lignina che viene recuperata come precipitato. La miscela di pentosi rimane invece disciolta nella fase acquosa soprastante, definita *black liquor*.

Oltre ai pentosi, il black liquor contiene anche composti chimici, come il furfurale e il 5-idrossimetil-furfurale (HMF) che si generano per disidratazione degli zuccheri in seguito al trattamento termico in ambiente acido. A questi si aggiunge l'acido acetico, liberato dall'idrolisi dei gruppi acetilici dell'emicellulosa (Gandolfi et al. 2014).

I furani e l'acido acetico sono tossici per molti microrganismi e rappresentano un limite alla valorizzazione fermentativa del *black liquor* come substrato di crescita. La cellula microbica è costretta infatti a deviare il suo macchinario metabolico verso la detossificazione di questi composti, che a sua volta si traduce in una significativa perdita di produttività poiché la sintesi del prodotto industriale desiderato può avvenire solo una volta che gli inibitori sono stati rimossi dal mezzo (Jilani et al., 2023).

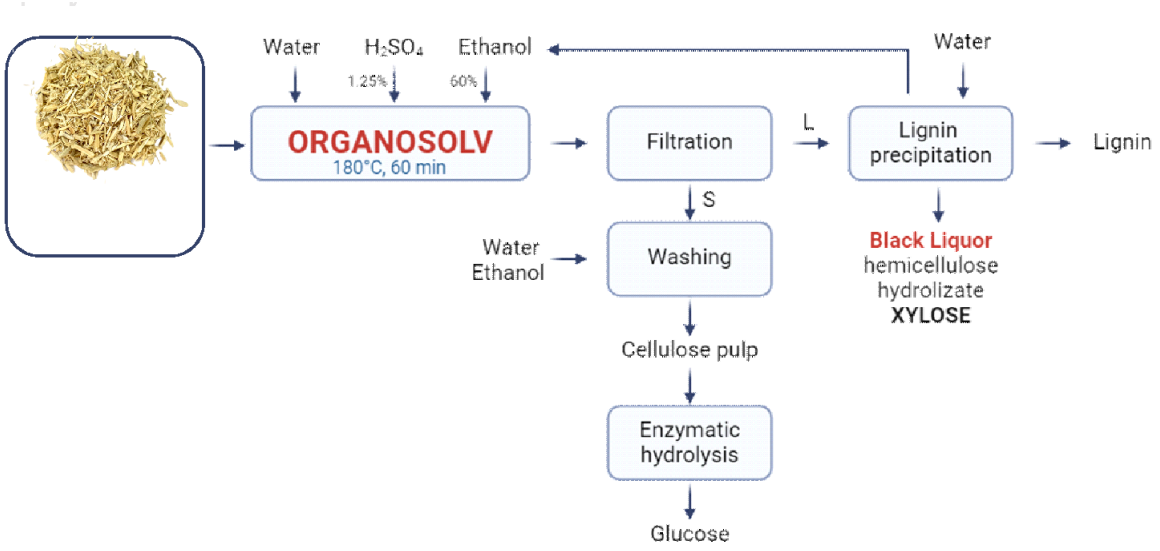


Figura 1.4: Schema riassuntivo del trattamento organosolv *di emicellulosa (Da Pan et al., 2006).*

1.2 XILOSIO E XILITOLO

1.2.1 XILOSIO

Lo xilosio è un monosaccaride aldo-pentoso ottenuto dalla parte ricca dello xilano di emicellulosa dalle pareti della cellula e dalla fibra della pianta stessa. Lo zucchero si presenta sottoforma di polvere bianca inodore a temperatura ambiente e solubile in acqua. All'interno delle diete viene usato come sostituto del saccarosio poiché presenta lo stesso potere dolcificante ma ha un apporto di calorie per grammo ingerito nettamente inferiore.

Lo xilosio è di fondamentale importanza nella biologia vegetale, largamente impiegato come fonte di sostentamento da molte specie batteriche e fungine che sono capaci di metabolizzarlo convertendolo a fruttosio e non solo: la sua conversione in xilitolo rappresenta un'opportunità interessante in ottica di economia circolare, motivo per cui sono stati messi a punto catalizzatori biologici in grado di convertire lo xilosio in xilitolo.

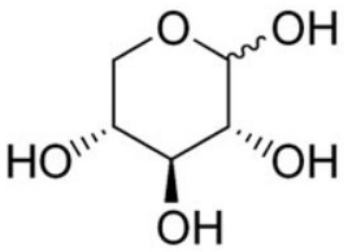


Figura 1.5: Struttura chimica del D-xilosio.

1.2.2 XILITOLO

Lo xilitolo è un pentitolo, un polialcol a cinque atomi di carbonio, largamente impiegato come sostituto del saccarosio nei settori dietetico, alimentare e farmaceutico. Le sue proprietà ne giustificano l'ampio utilizzo: un contenuto energetico ridotto, un'azione anti-cariogena, un effetto rinforzante sullo smalto dentale e una capacità preventiva nei confronti di otiti e infezioni dell'orecchio e delle vie respiratorie superiori (Rao et al., 2016). Proprio grazie a queste caratteristiche, lo xilitolo è oggi diffusamente utilizzato come dolcificante nell'industria alimentare e farmaceutica.

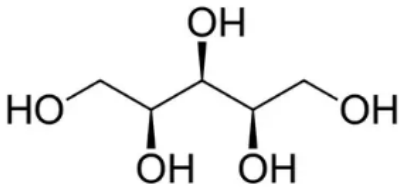


Figura 1.6: Struttura chimica dello xilitolo.

Negli ultimi anni la domanda di xilitolo è cresciuta in modo marcato, di pari passo con l'orientamento dei consumatori verso alimenti senza zucchero e a basso apporto calorico, scelta spesso legata a esigenze di salute e controllo del peso; il consumo globale del composto ha infatti registrato un incremento notevole, con una stima del valore di mercato di 1.11 miliardi di dollari nel 2025 (*Mordor Intelligence*, 2025).

La produzione industriale di xilitolo prevede la conversione chimica di zuccheri derivati da idrolizzati di emicellulosa ricchi di xilani provenienti da residui di legno. Nel processo di conversione chimica, lo xilosio, che deve essere preventivamente ottenuto ad elevata purezza, viene convertito in xilitolo mediante idrogenazione in presenza di un catalizzatore metallico (Ni, Ru, Rh), seguita da diverse fasi di purificazione per rimuovere i composti tossici. Al termine del processo, lo xilitolo viene concentrato e recuperato mediante cristallizzazione, con una purezza superiore al 98% (Delgado Alcaño et al, 2018).

Si tratta di un metodo energeticamente costoso e con un impatto ambientale non trascurabile. Per superare questi limiti, risulta quindi necessario sviluppare un processo integrato che consenta la conversione biotecnologica della biomassa lignocellulosica in xilitolo, così da renderne la produzione più sostenibile anche dal punto di vista economico (Rao et al., 2016).

Per la produzione biotecnologica di xilitolo da materiali lignocellulosici è sempre necessaria l'idrogenazione degli xilosi per formare emicellulose attraverso l'utilizzo di diversi microrganismi come lieviti, batteri e funghi. Nei lieviti, lo xilosio attraversa la membrana cellulare tramite diffusione o trasporto facilitato e, una volta nel citoplasma, viene ridotto a xilitolo per effetto dell'enzima xilosio reduttasi (XR), che utilizza NADPH come cofattore. Lo xilitolo prodotto viene poi convertito in xilulosio grazie all'enzima xilitolo deidrogenasi (XDH), il quale richiede NAD^+ per funzionare. Lo xilulosio così formato sarà poi catabolizzato attraverso la via del pentoso fosfato non ossidativa e la glicolisi per generare acido piruvico e contribuire alla produzione energetica della cellula. Quando lo xilitolo si accumula in eccesso nel citoplasma, può essere espulso verso l'esterno e recuperato dal mezzo di coltura (Ranieri et al, 2024).

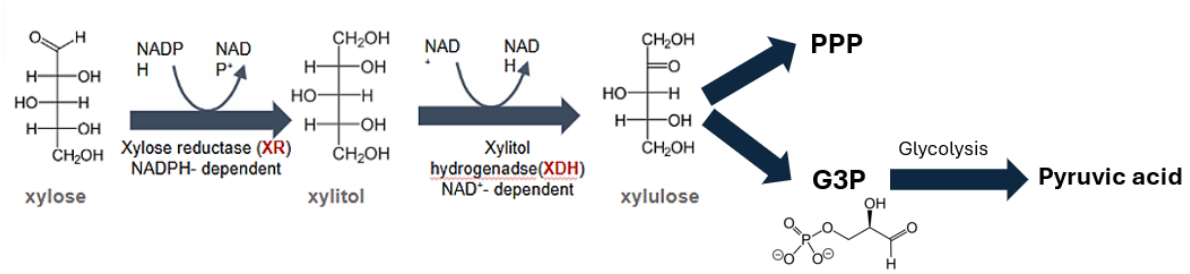


Figura 1.7: Pathway di conversione dello xilosio a xilulosio, mediante XR NADPH-dipendente e XDH NAD^+-dipendente, seguito dall'ingresso nella PPP (Pentose Phosphate Pathway) e nella via glicolitica di formazione dell'acido piruvico.

La sintesi di xilitolo è strettamente influenzata dalla disponibilità di cofattori ridotti e dall'ossigeno presente. In condizioni di elevata concentrazione di ossigeno, infatti, la fosforilazione ossidativa procede più rapidamente, rigenerando maggiori quantità di NAD^+. Ciò accelera l'attività dell'enzima XDH, incrementando la trasformazione del xilitolo in xilulosio e riducendo così la quantità di xilitolo espulsa dalla cellula e accumulata nel terreno di coltura. Al contrario, quando i livelli di ossigeno sono bassi, l'equilibrio delle reazioni tende a favorire un maggiore accumulo intracellulare di xilitolo (Prabhu et al., 2020).

Tra i lieviti più utilizzati per la produzione di xilitolo figurano quelli del genere *Candida* grazie all'elevata resa di produzione e all'efficienza del processo anche in condizioni di limitata disponibilità di ossigeno. (Espinoza-Acosta, José Luis, 2020).

Pichia fermentans, lievito ascomicete non convenzionale, merita di essere aggiunta a queste specie poiché in grado di trasformare lo xilosio in xilitolo con rese e titolo promettenti (Ranieri et al., 2024).

Uno dei principali problemi della produzione di xilitolo per via fermentativa è legata proprio agli idrolizzati dei residui agricoli. Questi, infatti, producono piccole quantità di composti tossici come furfurale, idrossimetil-furfurale (HMF) e acido acetico, i quali possono inibire la crescita del microrganismo e influire negativamente sulla resa della produzione di xilitolo (Espinoza-Acosta et al., 2020).

1.3 *Pichia fermentans*

Il genere *Pichia* (un tempo denominato *Hansenula*) comprende lieviti ascomiceti della famiglia Saccharomycetaceae; tali lieviti sono caratterizzati da gemmazione multilaterale, dalla presenza o assenza di pseudoife e ife settate e da ascospore che possono assumere diverse morfologie. Si riproducono asessualmente per gemmazione multilaterale, mentre la riproduzione sessuata è caratterizzata da aschi non coniugati (Shrivastava et al., 2023).

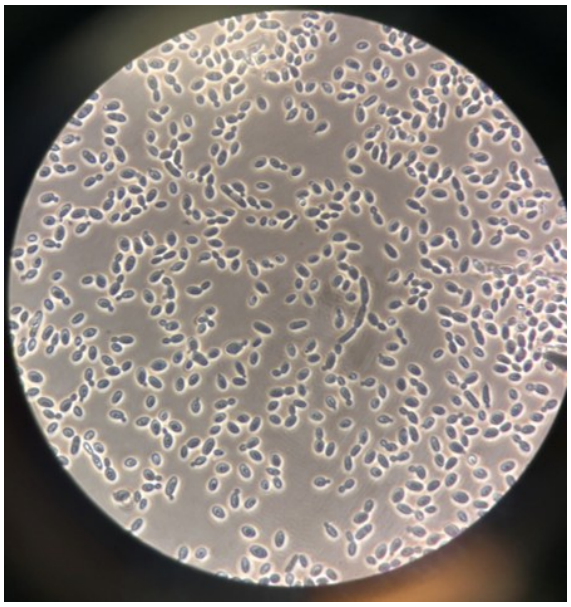


Figura 1.8: Pichia fermentans WC 1507 *al microscopio ottico in fase di crescita esponenziale. Ben visibile la presenza di una pseudoifa e di varie gemmazioni multilaterali.*

Pichia fermentans è un lievito GRAS non convenzionale, non patogenico, sicuro, dimorfico e in grado di crescere rapidamente anche in condizione di micro-aerofilia. È stato isolato in numerosi contesti fermentativi naturali e alimentari tra cui la Boza (una bevanda turca a base di cereali fermentati) nel kefir, nel mezcal messicano e in formaggi tradizionali come il Liqvan, in cui costituisce uno dei ceppi dominanti durante le fasi di produzione. Più recentemente è stato isolato anche da mosti d'uva e da altre matrici fermentative spontanee legate alla produzione di vino (Ranieri et al., 2024. Shrivastava et al., 2023).

Il microrganismo produce composti aromatizzanti che trovano ampia applicazione nelle industrie alimentari, anche grazie alla sua capacità di inibire la crescita di funghi e batteri, migliorando così la *shelf life* dei prodotti (Yewale et al., 2016).

L'utilizzo di *P. fermentans,* in questo particolare caso del ceppo WC 1507, appartenente alla ceppoteca del Laboratorio di Chimica delle fermentazioni del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Modena e Reggio-Emilia, apre la strada ad una produzione di xilitolo più sostenibile in modo tale da sostituire la produzione chimica e ridurre così la domanda energetica e lo sfruttamento di catalizzatori metallici (Ranieri et al., 2024).

P. fermentans ha la capacità di metabolizzare zuccheri complessi grazie ad una fisiologia metabolica flessibile, tipica dei lieviti non convenzionali, capaci di crescere su substrati eterogenei come residui agricoli e industriali (Shrivastava et al., 2023); nello specifico, la via metabolica dello xilosio del genere *Pichia* vede l'utilizzo della cosiddetta via xilosio reduttasi/xilitolo deidrogenasi (XR/XDH), precedentemente descritta nel paragrafo 1.2.2. Durante il primo passaggio di conversione di xilosio a xilitolo, si osserva un accumulo di xilitolo a causa della più lenta attività enzimatica del XR rispetto al XDH (Ranieri et al, 2024). In particolare, è stato mostrato che la quantità di xilitolo accumulato dipende dal rapporto tra le due attività enzimatiche e dalla disponibilità di cofattori redox. Tale accumulo favorisce il suo recupero quindi il suo sfruttamento per fini produttivi e industriali (Prabhu AA. et al., 2020).

Un aspetto rilevante, per collegare questa via metabolica alla degradazione di matrici complesse contenenti inibitori come il furfurale, riguarda la capacità di detossificazione del lievito da tale inibitore attraverso la sua riduzione a furfuril-alcol o la sua ossidazione ad acido 2-furoico, reazione che utilizza equivalenti riducenti quali NADH e NADPH. Pertanto, quando è presente il furfurale in un idrolizzato lignocellulosico, una parte della capacità riducente della cellula può essere dirottata verso la sua detossificazione anziché verso la conversione di xilosio in xilitolo, portando ad una diminuzione delle rese (Vajzovic et al., 2012. Prabhu et al., 2020).

1.4 FURFURALE

Il furfurale (o 2-furaldeide, o furforaldeide) è un composto organico derivato da una varietà di prodotti agricoli tra cui mais, avena, grano, crusca, e segatura. Chimicamente è un'aldeide aromatica derivata dal furano, di formula bruta $C_5H_4O_2$ e di formula condensata C_4H_3O-CHO (Britannica Editors, 2026).

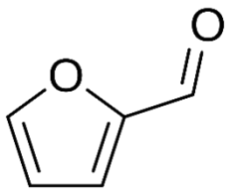


Figura 1.9: struttura chimica del furfurale.

Il composto appare come un liquido incolore o di un color marrone-rossastro con un odore penetrante. Ha un punto di fusione 140° F (circa 60° C) ed è più denso dell'acqua ma solubile in essa. Essendo abbastanza volatile, può essere tossico se inalato ed ingerito.

Il furfurale è presente naturalmente in molti alimenti e si forma durante la combustione di carbone e legno. Il composto viene prodotto industrialmente tramite processi fed-batch o continui e ad oggi il maggior produttore mondiale è la Cina, con oltre 500 mila tonnellate (Eseyin et al., 2015).

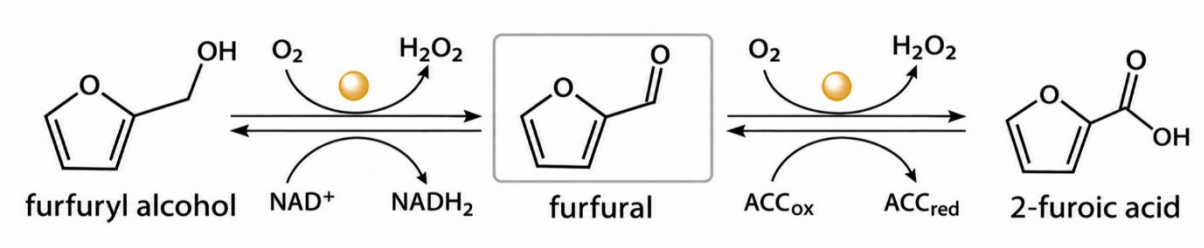


Figura 1.10: Pathway di conversione del furfurale in alcol furfurilico e in acido 2-furoico. Il furfurale può essere ridotto ad alcol furfurilico, con ossidazione di NADH a NAD⁺, oppure ossidato ad acido 2-furoico, con un accettore di elettroni generico (ACC). Le reazioni sono reversibili e catalizzate dalla furfurale ossidoreduttasi (pallino arancio); in entrambe compare O_2 come accettore finale di elettroni, con formazione di H_2O_2. (Da Wierckx et al., 2011).

All'interno dei microrganismi, il furfurale può essere convertito in due direzioni attraverso reazioni reversibili catalizzate da ossidoreduttasi. Da un lato viene ridotto ad alcol furfurilico, con ossidazione del cofattore NADH a NAD^+ (nel verso opposto l'alcol viene riossidato a furfurale, con riduzione di NAD^+); dall'altro viene ossidato ad acido 2-furoico, con un accettore

di elettroni generico che passa dalla forma ossidata a quella ridotta. La direzione prevalente dipende dal bilancio redox della cellula: la disponibilità di potere riducente favorisce la formazione di alcol furfurilico, mentre condizioni più ossidanti spingono verso l'acido 2-furoico. Poiché entrambi i prodotti sono meno tossici del furfurale, il pathway rappresenta nel complesso un meccanismo di detossificazione, utile per la crescita microbica su substrati lignocellulosici.

Il trattamento termoacido della biomassa lignocellulosica, come il pretrattamento *organosolv*, idrolizza l'emicellulosa e libera i pentosi, soprattutto xilosio, in un idrolizzato ricco di zuccheri. Nelle stesse condizioni acide e termiche, però, i pentosi si disidratano a furfurale e gli esosi a 5-idrossimetil-furfurale, che si formano quindi come sottoprodotti diretti dell'idrolisi.

Il furfurale è il principale inibitore tra i furani e agisce in sinergia con gli altri inibitori presenti, come l'acido acetico (Gandolfi et al. 2014). Tali inibitori diffondono attraverso la membrana microbica e hanno effetti dannosi sul suo funzionamento, portando ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno nell'ambiente citoplasmatico, alla frammentazione del DNA, dei mitocondri e del vacuolo, allo squilibrio redox e all'inibizione degli enzimi della via glicolitica (Jilani et al., 2023).

È stato riportato che il furfurale inibisce gli enzimi della via glicolitica: trioso-fosfato deidrogenasi e alcol deidrogenasi. Si è visto che la percentuale di riduzione dell'attività specifica in presenza di 1 g/L di furfurale per trioso-fosfato DH e alcol DH era rispettivamente del 77% e del 49% (Banerjee N., 1981). Poiché la formazione di inibitori aumenta con la severità del trattamento, per poter sopravvivere il microrganismo deve deviare parte del metabolismo verso la detossificazione, con una significativa perdita di produttività (Jilani et al., 2023).

2. SCOPO DELLA TESI

La progressiva sostituzione delle materie prime di origine fossile con risorse rinnovabili è uno degli obiettivi centrali delle strategie di sostenibilità, in particolare nel contesto del *Green Deal* europeo. In questa prospettiva, le biomasse lignocellulosiche rappresentano una fonte di carbonio abbondante, rinnovabile e non in competizione con la filiera alimentare, particolarmente interessante perché ricca di zuccheri che possono essere recuperati e valorizzati per via biotecnologica.

Tra i metodi di frazionamento delle biomasse, i trattamenti termoacidi e, in particolare, il pretrattamento *organosolv,* permettono di separare l'emicellulosa dalle altre componenti (cellulosa e lignina) delle biomasse vegetali. Dall'*organosolv* si ottiene una frazione liquida definita come *black liquor*, ricca di zuccheri rilasciati dall'idrolisi dell'emicellulosa, tra cui figura lo xilosio. Oltre agli zuccheri, però, queste matrici contengono anche composti inibitori, come furfurale, 5-idrossimetil-furfurale ed acido acetico, che limitano l'impiego delle biomasse come substrato di fermentazione da parte dei microrganismi.

Lo xilosio può essere convertito in xilitolo, un poliolo dolcificante di interesse alimentare e farmaceutico. In questo contesto, *Pichia fermentans* WC 1507 si è dimostrato un ottimo bio-convertitore di xilosio in xilitolo: è un lievito non patogeno e caratterizzato da una rapida crescita. Grazie a tali caratteristiche, il ceppo potrebbe essere impiegato come via biotecnologica per la produzione di xilitolo a partire dagli zuccheri recuperati dalle biomasse lignocellulosiche. La presenza di inibitori negli idrolizzati rimane tuttavia un limite all'efficienza del processo.

Questo lavoro di tesi ha approfondito gli effetti dei principali inibitori generati dal trattamento termoacido delle biomasse lignocellulosiche sulla vitalità di *P. fermentans* WC1507 e sulla sua capacità di produrre xilitolo da xilosio, in vista di un possibile impiego del ceppo nella valorizzazione degli sciroppi ottenuti mediante trattamento *organosolv*. In assenza di strumenti genetici per il miglioramento mirato di *P. fermentans*, il ceppo è stato sottoposto a mutagenesi casuale, dapprima mediante irraggiamento UV e successivamente mediante esposizione a etil-metansulfonato, con l'obiettivo di ottenere mutanti resistenti al furfurale e capaci di produrre xilitolo in presenza di questo inibitore. Lo screening dei mutanti ha permesso di individuare alcuni ceppi candidati che mostravano crescita abbondante e produzione di xilitolo in presenza di furfurale. Questi ceppi sono stati scelti per un ulteriore ciclo di mutagenesi e selezione, finalizzato a migliorarne ulteriormente le prestazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CEPPO E CONDIZIONI DI COLTURA

Pichia fermentans WC1507 è il ceppo che è stato utilizzato per tutta la serie di prove di mutagenesi grazie al fatto di essere già noto per la sua capacità di convertire lo xilosio in xilitolo (Raimondi et al., 2023). *P. fermentans* è stato prelevato dalla ceppoteca del Laboratorio di Biotecnologie Microbiche dell'Università di Modena e Reggio-Emilia (Dipartimento di Scienze della Vita). Per la conservazione del ceppo wild-type sono stati impiegati dei becchi di clarino con terreno YPD solidificato con agar (*Tab 3.1*) e stoccati a 4°C in frigorifero. Questo, ogni 2 mesi, è stato ripreso e trapiantato. Per la conservazione dei mutanti interessanti, invece, oltre all'utilizzo di becchi di clarino, sono stati stoccati su piastre di YPX addizionato di 20 g/L di agar, suddivise in 32 quadranti. Il terreno YPX è una variante del YPD, in cui il D-glucosio è sostituito con il D-xilosio. Prima di ogni prova le colture sono state riprese in terreno liquido (sempre YPX), in beuta o in tubo, e incubate in agitazione a 170-180 rpm a 30°C per 24 o 48 ore a seconda della necessità.

Componente	Concentrazione (g/L)
Peptone	10
Estratto di lievito	10
D-glucosio o D-xilosio	20
Agar	20

Tabella 3.1: composizione dei terreni YPD (con glucosio) e YPX (con xilosio) agar.

Componente	Concentrazione (g/L)
Estratto di lievito	3
$(NH_4)_2SO_4$	2
K_2HPO_4	1
KH_2PO_4	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1
D-xilosio	20 o 120

Tabella 3.2: composizione del terreno MY completo.

Per le prove di produzione è stato impiegato terreno MY completo a 120 g/L di xilosio. Le prove sono state condotte in beute agitate contenenti 20 mL di terreno o in bioreattori da banco ad agitazione meccanica (STR) contenenti 400 mL.

Per le prove in bioreattore è stato utilizzato l'apparato *MiniBio* (*Applikon Biotechnology*, Delft, NL), dotato di vessel cilindrico in vetro (diametro 70 mm, volume massimo 500 mL). Il sistema è gestito da un controllore *My-control*, accessibile via web browser, che permette di monitorare e regolare pH, temperatura, ossigeno disciolto (DO), livello di liquido e schiuma e agitazione. Il controllore è collegato a quattro pompe a velocità regolabile per l'aggiunta di componenti o soluzioni al terreno.

L'agitazione è affidata a due turbine *Rushton* (d = 30 mm) montate su un albero centrale collegato a un motore esterno posto sulla sommità del vessel. L'ossigenazione avviene tramite uno sparger che insuffla aria sterile, filtrata, a pressione atmosferica; l'aria esausta esce da un tubo in silicone collegato a un condensatore, che limita l'evaporazione del terreno.

Le condizioni di coltura sono mantenute costanti da diversi sensori:

- DOT: elettrodo polarografico per l'ossigeno disciolto, collegato al sistema che regola la velocità delle turbine;
- pH: elettrodo in vetro che comanda pompe peristaltiche per l'aggiunta di NaOH 1 M o HCl 1 M;
- temperatura: sonda Pt-100 collegata a una cella Peltier;
- livello: sonda per liquido e schiuma, regolabile per contatto o non contatto.

Nel vessel sono inoltre presenti tubi pescanti ad altezza regolabile, collegati a una pompa per il prelievo di campioni.



Figura 3.1: Bioreattore da banco ad agitazione meccanica (STR) MiniBio (Applikon Biotechnology, Delft, NL).

3.2 PROVE DI CRESCITA E PRODUZIONE IN PRESENZA DI INIBITORI

3.2.1 PREPARAZIONE DEL *BLACK LIQUOR*

Il black liquor derivante dal pretrattamento organosolv è stato preparato precedentemente, come descritto da Gandolfi *et al.* (2014), e utilizzato come fonte grezza di xilosio.
Gli scarti di canapa tritati, forniti da *Assocanapa* (Carmagnola, Italia), sono stati separati dalla polvere e dalle fibre corte, macinati, setacciati a 0.5 mm ed estratti con metanolo in un apparecchio *Soxhlet*. Il pretrattamento organosolv è stato condotto in un sistema a reattore ad alta pressione (*BR-300*, Berghof, Germania), risospendendo i canapuli estratti in metanolo acquoso (65%), contenente il 3% p/p di acido solforico come catalizzatore. Il reattore è stato pressurizzato a 5 bar con N_2 e mantenuto a 165 °C per 90 min.
La polpa di cellulosa è stata separata dalla miscela di reazione raffreddata mediante filtrazione. Per precipitare la lignina disciolta, il metanolo è stato rimosso dalla frazione liquida mediante evaporazione rotativa. Dopo filtrazione, la frazione liquida (*black liquor*), derivata dall'idrolisi dell'emicellulosa, è stata liofilizzata e utilizzata come fonte di carboidrati per fornire 20 g/L o 120 g/L di xilosio nel terreno MY contenente *black liquor* (indicati rispettivamente come MYBL-20 e MYBL-120).

3.2.2 DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE

Per la ricerca della minima concentrazione inibente di furfurale, 5-idrossimetil-furfurale (5HMF) e acetato nei confronti di *P. fermentans* WC 1507 sono state impiegate delle piastre *Petri* sterili da 24 pozzetti.

Per ogni inibitore, sono state preparate una soluzione stock iniziale (8.33 g/L per furfurale, corrispondente al limite massimo di solubilità, 11.1 g/L per 5HMF, 111.1 g/L per acido acetico) in terreno MY contenente a 20 g/L di xilosio. La concentrazione della soluzione stock è stata scelta superiore a quella effettivamente desiderata nel pozzetto, in modo da tenere conto della diluizione dovuta all'aggiunta dell'inoculo di *P. fermentans*. Le soluzioni stock sono quindi state diluite in terreno MY contenente a 20 g/L di xilosio per ottenere le concentrazioni desiderate di inibitori.

In ogni pozzetto è stato dispensato un volume finale di 1 mL, ottenuto aggiungendo 100 µL di inoculo, diluito 1:10, a 900 µL di terreno contenente l'inibitore.

- In ciascun pozzetto sono stati inseriti un volume di soluzione stock (terreno + inibitore) e un certo volume di terreno necessario per diluire l'inibitore alla concentrazione desiderata, per un volume totale di 900 µL per pozzetto. I volumi relativi a ciascun inibitore sono riportati nelle *Tabelle 3.3, 3.4 e 3.5*.
- La coltura è stata diluita 1:10 e 100 µL di inoculo diluito sono stati aggiunti a ogni pozzetto.

Ogni condizione è stata allestita in triplicato (*Tab 3.6, 3.7, 3.8*).

Il furfurale presenta un limite massimo di solubilità di 8.33 g/L, motivo per cui non sono mai state utilizzate concentrazioni superiori ai 7.5 g/L durante le prove.

FURFURALE		
g/L finali	µL slz stock	µL terreno
7,5	900	0
6	720	180
5	600	300
4	480	420
3	360	540
2	240	660
1	120	780
0,5	60	840

Tabella 3.3: Volumi effettivi di soluzione stock con furfurale 8.33 g/L e terreno di diluizione per ogni concentrazione. Per la preparazione della stock e delle diluizioni è stato utilizzato MY contenente 20 g/L di xilosio.

5-HM-F		
g/L finali	µL slz stock	µL terreno
10	900	0
8	720	180
6	540	360
4	360	540
2	180	720
1	90	810

Tabella 3.4: Volumi effettivi di soluzione stock con 5-idrossimetil-furfurale 11.1 g/L e terreno di diluizione per ogni concentrazione. Per la preparazione della stock e delle diluizioni è stato utilizzato MY contenente 20 g/L di xilosio.

ACIDO ACETICO		
g/L finali	µL slz stock	µL terreno
100	900	0
80	720	180
60	540	360
40	360	540
20	180	720
10	90	810
5	45	855

Tabella 3.5: Volumi effettivi di soluzione stock con acido acetico 111.1 g/L e terreno di diluizione per ogni concentrazione. Per la preparazione della stock e delle diluizioni è stato utilizzato MY contenente 20 g/L di xilosio.

FURFURALE					
7.5 g/L	7.5 g/L	7.5 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
6 g/L	6 g/L	6 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L
5 g/L	5 g/L	5 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
4 g/L	4 g/L	4 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L

Tabella 3.6: Allestimento piastra con furfurale. Ogni concentrazione viene ripetuta in triplicato.

5-IDROSSIMETIL-FURFURALE					
10 g/L	10 g/L	10 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L
8 g/L	8 g/L	8 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
6 g/L	6 g/L	6 g/L	Controllo - solo terreno	Controllo - solo terreno	Controllo - solo terreno
4 g/L	4 g/L	4 g/L	Controllo - MY + Furf	Controllo - MY + 5HMF	Controllo - MY + Acetato

Tabella 3.7: Allestimento piastra con 5-idrossimetil-furfurale. Ogni concentrazione viene ripetuta in triplicato, con l'aggiunta di un controllo negativo e di altri tre controlli negativi delle differenti soluzioni stock prive di inoculo.

ACIDO ACETICO					
100 g/L	100 g/L	100 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
80 g/L	80 g/L	80 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
60 g/L	60 g/L	60 g/L	5 g/L	5 g/L	5 g/L
40 g/L	40 g/L	40 g/L	Controllo +	Controllo +	Controllo +

Tabella 3.8: Allestimento piastra con acetato. Ogni concentrazione viene ripetuta in triplicato, con l'aggiunta di un controllo positivo.

Sulla coltura diluita sono stati effettuati una conta cellulare mediante camera di *Burker* e una lettura di OD_{600} all'interno di una piastra sacrificale. Le soluzioni madre sono state infine analizzate mediante HPLC.

L'OD_{600} iniziale della piastra è stata misurata con il lettore per piastre multipozzetto *Tecan*: dopo 2 minuti di agitazione per risospendere le cellule, la lettura è stata effettuata a 595 nm e ad una temperatura di 37°C per limitare la formazione di condensa.

La piastra è stata poi incubata a 30 °C in agitazione a 180 rpm. Per i quattro giorni successivi sono state effettuate due misure di OD al giorno.

Al termine dell'esperimento, da un pozzetto per ciascun triplicato è stata prelevata la biomassa, centrifugata e recuperato il surnatante per poi essere congelato per le successive analisi HPLC.

Per l'acetato è stato testato il pH con cartina al tornasole.

3.2.3 PROVE DI PRODUZIONE E DI TRASFORMAZIONE DEL FURFURALE

I ceppi sono stati testati per la produzione di xilitolo a partire da xilosio, in colture in beuta agitate.

I pre-inoculi, coltivati in MY completo addizionato con 20 g/L di xilosio in tubo da batteriologia, sono stati messi a punto trasferendo con ansa sterile ogni ceppo, derivante da piastre *Petri* di YPX, all'interno di 5mL di terreno liquido.

Per la prova di produzione sono state utilizzate beute da 100 mL contenenti 18 mL di terreno MY con 120 g/L di xilosio. Ciascuna beuta è stata inoculata con 2 mL di coltura proveniente dal rispettivo tubo di pre-inoculo (10% v/v), per un volume finale di 20 mL tra terreno e inoculo.

Le colture sono state incubate a 30 °C in agitazione a 170 rpm per 7 giorni. Una volta al giorno sono stati prelevati 700 µL di coltura, che sono stati centrifugati e conservati congelati fino all'analisi in HPLC con rivelatore a indice di rifrazione (RID) per la determinazione del consumo e della produzione rispettivamente di xilosio e xilitolo.

La stessa prova di produzione è avvenuta anche in presenza di 1 g/L di furfurale aggiunto nel terreno di coltura, in modo tale da testare la capacità dei ceppi di produrre xilitolo anche in presenza di inibitore, andando anche a ricercare eventuali metaboliti del furfurale stesso.

L'analisi HPLC è stata effettuata con rivelatore a indice di rifrazione (RID) per la determinazione di xilosio e xilitolo, mentre per la detection del furfurale e dei suoi eventuali prodotti di trasformazione è stata utilizzata la modalità DAD (*Diode Array Detector)* a 230 nm e a 280 nm, lunghezze d'onda utili per rilevare composti dotati di doppi legami coniugati.

3.3 MUTAGENESI

3.3.1 MUTAGENESI UV

Una coltura madre è stata incubata in terreno liquido YPX (20 g/L di xilosio), a 30 °C e in agitazione a 180 rpm. A partire da questa coltura cresciuta, con una conta vitale approssimativamente di $n \times 10^9$ CFU/mL, sono state allestite diluizioni seriali in soluzione fisiologica, da 10^{-2} a 10^{-7}. Ciascuna diluizione è stata strisciata con ansa a L su piastre di YPX, ottenendo diluizioni finali comprese tra 10^{-3} e 10^{-8}. Un set di diluizioni non è stato sottoposto ad irraggiamento come controllo positivo.

Una piastra per ciascuna diluizione, ad eccezione delle piastre di controllo, è stata sottoposta a irraggiamento UV per tempi crescenti (5 s, 10 s, 30 s, 1 min, 2 min e 5 min), utilizzando tutti e 6 i tempi di irraggiamento per le 5 diluizioni a disposizione (10^{-3} e 10^{-8}).
Le piastre sono state incubate a 30 °C per 48 h, al termine delle quali è stata effettuata la lettura e la conta delle colonie per valutarne la vitalità.

Dalle piastre di mutagenesi sono state selezionate alcune colonie ritenute promettenti, le quali sono state strisciate su piastre di YPX suddivise in 32 quadranti, per la conferma della vitalità e della purezza delle colonie.

3.3.2 MUTAGENESI CHIMICA CON ETIL-METANSULFONATO (EMS)

La mutagenesi chimica è stata condotta mediante esposizione al mutageno etil-metansolfonato (EMS) a diverse concentrazioni (da 2 a 500 mM) e per diversi tempi da 10 min a 2 h). Soluzioni di sodio tiosolfato a diversa concentrazione sono state preparate ed aliquotate e sono state utilizzate per inattivare l'EMS in diverse fasi della procedura sperimentale. Aliquote da 100 µL di soluzione di sodio tiosolfato 200 g/L sono servite per inattivare il mutageno una volta avvenuta la mutagenesi del lievito. Una soluzione alla concentrazione di 20 g/L è servita per i lavaggi delle cellule e per lo smaltimento di tutte le soluzioni contenenti EMS.

Il ceppo è stato inoculato in terreno YPX e incubato overnight a 30 °C in agitazione in modo da ottenere cellule in fase di crescita esponenziale. La concentrazione cellulare delle colture è stata stimata mediante conta su camera di *Burker*.

La biomassa è stata pellettata tramite centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti; il pellet ha subito un passaggio di lavaggio con fisiologica sterile per poi essere nuovamente risospesa in 20 mL di soluzione fisiologica in modo tale da avere una concentrazione effettiva di 10^7 cellule/mL.

Dalla sospensione cellulare, aliquote di 1 mL sono state prelevate e trasferite in tubi *Eppendorf* contenenti 100 µL di sodio tiosolfato 200 g/L, corrispondenti al tempo 0.

A 10 mL di sospensione cellulare è stato quindi aggiunto EMS, fino a una concentrazione finale definita durante le varie prove, di 2, 50, 100, 200, 250 e 500 mM, all'interno di tubi Falcon da 15 mL. Le provette sono state vortexate e mantenute in agitazione orbitale a temperatura ambiente. Ogni 30 min è stato prelevato 1 mL di sospensione e trasferito in tubo *Eppendorf* contenente 100 µL di sodio tiosolfato 200 g/L per ottenere una sospensione cellulare in 20 g/L di sodio tiosolfato. Dopo l'inattivazione del mutageno, i campioni sono stati centrifugati e le

cellule sono state risospese in 1 mL di soluzione di tiosolfato 20 g/L e mantenute in ghiaccio fino al completamento della raccolta di tutti i campioni. Tutti i surnatanti sono stati smaltiti addizionandoli di soluzione di tiosolfato 20 g/L.

Le sospensioni cellulari sono state nuovamente centrifugate e i campioni sono stati sottoposti a lavaggio in fisiologica per eliminare il tiosolfato residuo per poi essere risospesi in 1 mL di fisiologica. Diluizioni seriali di ogni campione sono preparate e quelle comprese tra 10^{-4} e 10^{-7} sono state seminate su piastre di YPX. Le piastre sono state incubate a 30 °C fino alla comparsa delle colonie.

3.4 SCREENING PER LA RESISTENZA AL FURFURALE

Le colonie vitali ottenute in seguito alla mutagenesi sono state sottoposte a diversi approcci di screening, finalizzati sia all'identificazione di mutanti con maggiore tolleranza al furfurale, sia alla definizione di una strategia efficace per lo screening di un elevato numero di colonie.

3.4.1 SELEZIONE SU PIASTRA *PETRI*

Le colonie sono state strisciate su piastre di YPX a 32 quadranti addizionate con furfurale a due diverse concentrazioni, 1 g/L e 2 g/L, al fine di valutarne la resistenza all'inibitore. In ciascuna piastra, accanto alle colonie mutate, è stato strisciato anche il ceppo wild-type, utilizzato come riferimento per il confronto della crescita.

Tutte le piastre sono state incubate a 30 °C per il tempo necessario alla crescita dei microrganismi, generalmente superiore alle 48 ore.

Al termine dell'incubazione è stata effettuata la lettura delle piastre e il confronto della crescita tra i diversi ceppi, al fine di identificare i mutanti con maggiore tolleranza al furfurale rispetto al wild-type.

3.4.2 SCREENING LIQUIDO IN PIASTRE DA 24 POZZETTI

I ceppi selezionati per lo screening sono stati inoculati in 3 mL di terreno YPX liquido e incubati a 30 °C in agitazione per 48h, al fine di ottenere una coltura in fase di crescita adeguata per i successivi step. Successivamente, sono stati diluiti 1:10 in fisiologica in modo tale da avere un inoculo del 10% rispetto al volume totale.

Per ciascuna diluizione è stata eseguita una misura dell'OD_{600} e una conta cellulare attraverso camera di *Burker*.

In un secondo momento sono state allestite piastre sterili da 24 pozzetti. Per ciascun ceppo sono state testate due condizioni, ciascuna in triplicato: 900 µL di terreno YPX + 100 µL di sospensione cellulare, oppure 900 µL di terreno YPX addizionato di furfurale (1 g/L) + 100 µL di sospensione cellulare. Il volume totale in ogni pozzetto era di 1 mL (*Tab. 3.9*).

Infine, le piastre sono state incubate a 30°C in agitazione 180 rpm per oltre 48 h. Ogni 24 ore sono stati fatti dei prelievi per misurarne la densità ottica.

Ceppo 1	YPX	YPX	YPX	1 g/L F	1 g/L F	1 g/L F
Ceppo 2	YPX	YPX	YPX	1 g/L F	1 g/L F	1 g/L F
Ceppo 3	YPX	YPX	YPX	1 g/L F	1 g/L F	1 g/L F
Ceppo 4	YPX	YPX	YPX	1 g/L F	1 g/L F	1 g/L F

Tabella 3.9: allestimento piastra 24 pozzetti nelle due condizioni di screening, in triplicato.

3.4.3 SCREENING LIQUIDO IN TUBO DA BATTERIOLOGIA

I ceppi sono stati inoculati in 3 mL di terreno YPX liquido e incubati a 30 °C in agitazione per 48h, al fine di ottenere una coltura in fase di crescita adeguata per i successivi step.
Al termine dell'incubazione, la coltura è stata sottoposta a una prima diluizione 1:10 in soluzione fisiologica (1 mL di coltura in 9 mL di fisiologica), su cui è stata misurata la densità ottica mediante spettrofotometro. Sulla base di tale misura, è stata effettuata una seconda diluizione in fisiologica per ottenere una sospensione cellulare con OD_{600} pari a 0.3, utilizzata come inoculo standardizzato per tutte le prove.
I tubi da batteriologia utilizzati per lo screening sono stati sterilizzati vuoti, mentre il terreno di coltura e la soluzione stock di xilitolo sono stati sterilizzati separatamente. In ciascun tubo sono stati inoculati 2.7 mL di terreno con furfurale.
Sono stati messi a punto due set differenti, allestendo 4 tubi per ceppo, comprendenti soltanto YPX (controllo positivo) e YPX + furfurale 1 g/L (in triplicato).
Ciascun tubo è stato inoculato con 300 µL della sospensione cellulare standardizzata e incubata a 30 °C in agitazione.
La crescita è stata monitorata a 24h mediante osservazione visiva, in modo tale da individuare i campioni già in crescita, confermata mediante osservazione al microscopio; a 48 ore è stata misurata la densità ottica.

3.4.4 DILUIZIONE SU PIASTRA *PETRI*

I ceppi sono stati preventivamente fatti crescere in tubo da batteriologia con brodo YPX. A partire da ciascuna coltura sono state allestite diluizioni seriali in soluzione fisiologica, da 10^{-1} a 10^{-4}.

Su piastre di YPX addizionate con 2 g/L e 5 g/L di furfurale sono stati seminati 4 µL di ciascuna diluizione; su ciascuna piastra sono stati inoculati quattro ceppi mutanti e il ceppo wild-type.

Le piastre sono state incubate a 30 °C. Durante il periodo di incubazione, sono state controllate quotidianamente per monitorare l'andamento della crescita e valutare eventuali differenze tra i ceppi mutanti e il wild-type. In presenza di furfurale, i ceppi hanno mostrato tempi di crescita più lunghi rispetto a quanto osservato in coltura liquida, richiedendo generalmente 4–5 giorni per evidenziare crescita, soprattutto alle diluizioni più alte (10^{-4}).

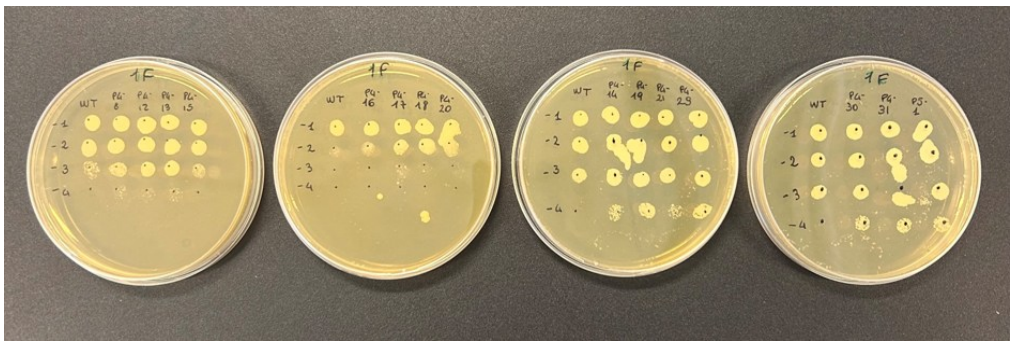


Figura 3.2: Screening su piastre Petri con terreno YPX addizionato ad 1 g/L di furfurale.

3.5 TECNICHE ANALITICHE

3.5.1. QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA CELLULARE TRAMITE SPETTROFOTOMETRIA

La biomassa nelle sospensioni cellulari è stata quantificata per via turbidimetrica misurando l'assorbanza a 600 nm (OD600) con uno spettrofotometro UV-visibile a raggio singolo (*UV 31 SCAN, ONDA Spectrophotometer*) (*Fig. 3.3*). Lo strumento è composto da:

- una lampada al tungsteno come sorgente di luce UV-visibile;
- una lente che rende paralleli i raggi;
- un monocromatore (fenditure e prisma) che seleziona la lunghezza d'onda desiderata;
- un vano portacampioni per le cuvette in vetro ottico;
- un rilevatore che converte la luce in corrente elettrica;
- un software che trasforma il segnale in valore di assorbanza.

L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della specie in soluzione, secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

dove A è l'assorbanza alla lunghezza d'onda considerata, ε è il coefficiente di assorbimento molare (dipende dalla lunghezza d'onda e dalla specie), l è il cammino ottico (spessore di soluzione attraversato dalla luce) e C è la concentrazione.

Prima di ogni misura lo strumento è stato azzerato con 1 mL di acqua distillata come bianco. Il campione (1 mL) è stato inserito in cuvetta e misurato tal quale; se necessario, è stato poi diluito fino a ottenere un valore di OD600 compreso tra 0.2 e 0.6.



Figura 3.3: Spettrofotometro UV 31 SCAN, ONDA Spectrophotometer.

3.5.2 CONTA CELLULARE MEDIANTE CAMERA DI *BURKER*

L'analisi quantitativa della biomassa è stata condotta, oltre che con la spettrofotometria, anche mediante conteggio in camera di Bürker. Si tratta di un vetrino sul quale è incisa una griglia microscopica formata da quadrati e rettangoli di dimensioni note. Ai lati della griglia sono presenti due fermagli che permettono di fissare un apposito coprioggetti. Tra la camera e il coprioggetti si crea uno spazio di 0,1 mm, nel quale vengono introdotti, con una micropipetta, 20 µL di sospensione cellulare opportunamente diluita. Poiché le dimensioni della griglia e l'altezza dello spazio tra i due vetri sono note, è possibile ricavare il volume di liquido contenuto nella camera.

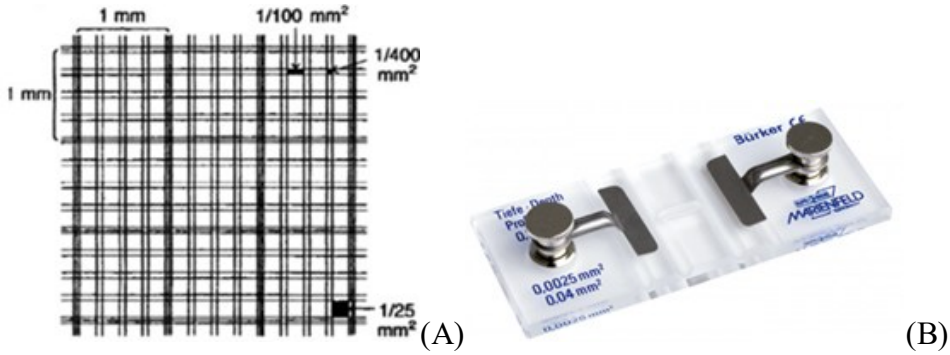


Figura 3.4: A) ingrandimento della griglia presente nella camera; B) Camera di Burker.

La camera viene osservata al microscopio ottico (*Eclipse 80i, Nikon, Minato*, Tokyo, JP.) a 40X senza immersione. Si procede alla conta delle cellule presenti nei 12 quadrati lungo la diagonale della camera di conta. Questa operazione è ripetuta lungo la diagonale della seconda camera, per un totale di 24 quadranti, da cui si calcola il valore medio di cellule per riquadro. Questo valore medio viene moltiplicato per il fattore di diluizione del campione e per un fattore legato al volume della camera stessa, ottenendo così la concentrazione della biomassa espressa in cellule/ml.

$$C = \text{media cellule per quadrante} \cdot \text{fattore di diluizione} \cdot \text{fattore della camera}$$

3.5.3 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI XILOSIO, XILITOLO, FURFURALE E METABOLITI DEL FURFURALE MEDIANTE ANALISI HPLC

La determinazione della concentrazione di xilosio, xilitolo, furfurale e metaboliti del furfurale all'interno della coltura è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC Agilent 200 series (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA).

L'analisi è stata condotta mediante una colonna a scambio ionico (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mantenuta a una temperatura costante di 60°C. La fase mobile utilizzata per l'eluizione dei campioni è una soluzione di H_2SO_4 a bassa concentrazione (mM), con un flusso impostato a 0.6 mL/min.

Le analisi in HPLC sono state effettuate secondo il seguente protocollo:

1. Preparazione soluzione HPLC: la soluzione viene preparata inserendo 278 µL di H_2SO_4 al 98% in 1 L di acqua milliQ. Successivamente viene sottoposta a filtraggio e a procedura di degassaggio.
2. Preparazione dei campioni per l'analisi HPLC:
    - prelievo di 2 mL di coltura omogeneizzata.
    - centrifugazione del campione in eppendorf a 10.000 rpm per 10 minuti.
    - recupero del surnatante: se limpido, viene trasferito direttamente in vials per HPLC, in caso contrario viene trasferito in una nuova eppendorf, trattato con 30 µL di cloroformio e centrifugato nuovamente.
    - posizionamento dei vials nel rack specifico per HPLC.
    - avvio della corsa cromatografica.

Al termine della corsa, il software elabora un cromatogramma, mostrando i picchi di assorbimento ai diversi tempi di ritenzione. Ogni picco viene integrato per calcolare l'area sottesa, che permette di identificare i composti e quantificarne la concentrazione.

La rilevazione di xilosio e xilitolo è avvenuta tramite un sensore a indice di rifrazione (RID), che confronta l'indice di rifrazione del campione con quello dell'eluente puro per identificarne la composizione. Per ottenere la concentrazione in g/L, sono state costruite rette di taratura per xilosio e xilitolo. Alla fine della corsa, il software genera un cromatogramma che mostra i picchi di assorbimento corrispondenti ai diversi tempi di ritenzione. Ogni picco viene poi

integrato per calcolare l'area sottostante, il che consente di identificare i composti presenti e determinarne la concentrazione.

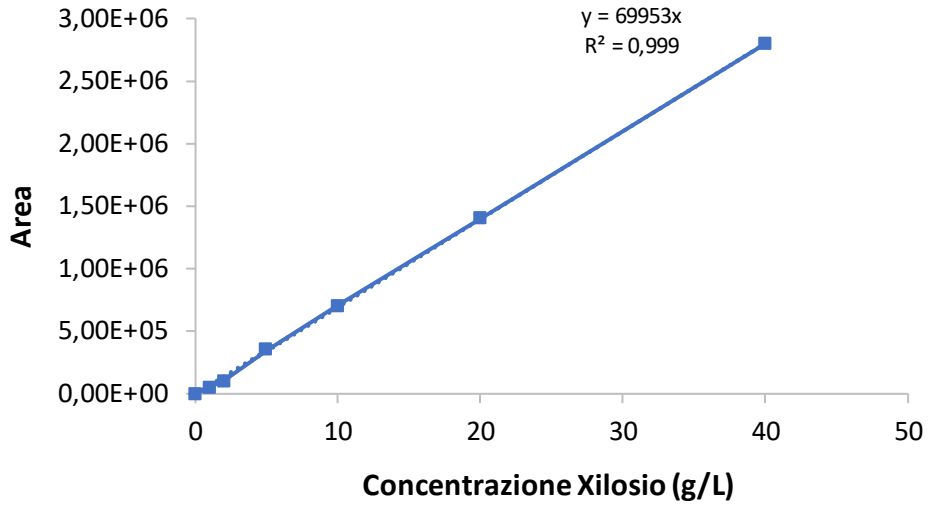


Grafico 3.1: Retta di taratura dello xilosio.

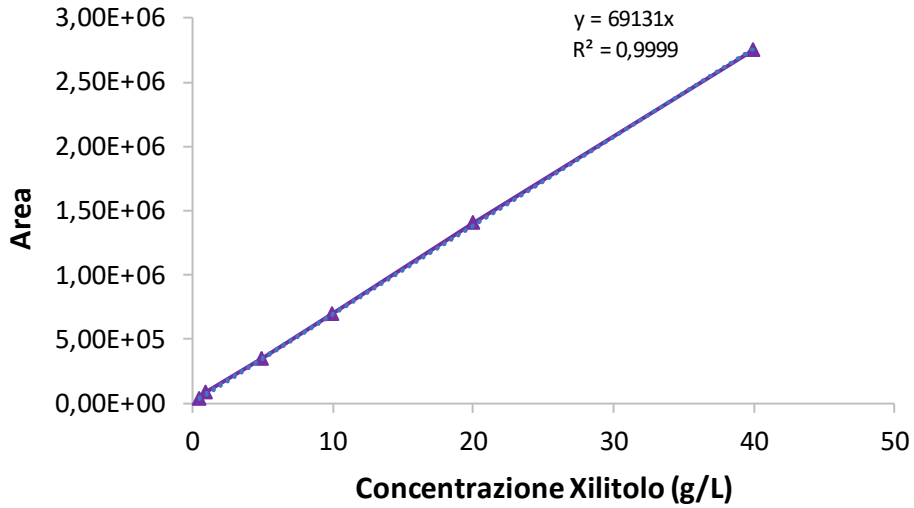


Grafico 3.2: retta di taratura dello xilitolo.

Dall'analisi HPLC delle soluzioni standard è stato possibile costruire le rette di taratura delle due sostanze, inserendo in grafico le due grandezze: sulle ordinate, l'ampiezza dell'area sottesa e sulle ascisse le corrispondenti concentrazioni in g/L. Dalla costruzione delle rette di taratura è stata ottenuta la correlazione tra area del picco e concentrazione.

Per quantificare il furfurale e i suoi metaboliti è stata effettuata, nella stessa corsa cromatografica, una rilevazione mediante DAD (*Diode Array Detector*) alle lunghezze d'onda di 280 nm, a cui il furfurale presenta un picco massimo di assorbimento, 230 nm, 330 nm e 380 nm. Anche per l'inibitore è stata costruita una retta di taratura.

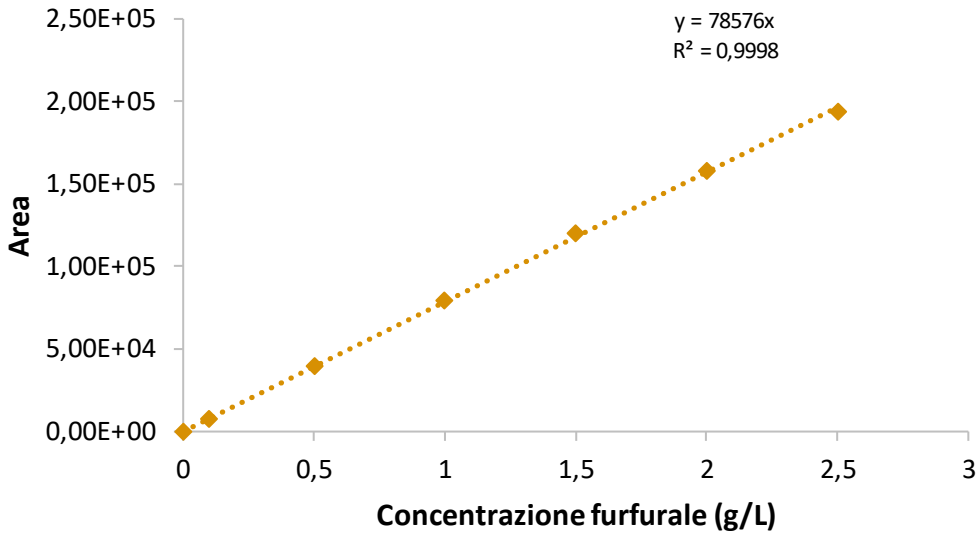


Grafico 3.3: retta di taratura del furfurale a 280 nm (DAD).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 PRODUZIONE DI XILITOLO CON *P. fermentans* WC 1507

Pichia fermentans WC1507 è un lievito già noto in letteratura per la sua capacità di bioconvertire lo xilosio in xilitolo, oltre che per la sua rapida crescita e la non patogenicità. (Prabhu et al., 2020).

La sintesi di xilitolo avviene prevalentemente in concomitanza con la proliferazione cellulare, come dimostrato da studi precedenti (Raimondi et al., 2023); per questo motivo le produzioni vengono realizzate impiegando terreni di coltura arricchiti con fonti azotate, indispensabili per il metabolismo e la crescita del microrganismo. La conversione dello xilosio in xilitolo è catalizzata dalla xilosio-reduttasi (XR), che richiede un cofattore ridotto (NADH). *P. fermentans* WC 1507 necessita pertanto di condizioni a basso tenore di ossigeno, che limitano la riossidazione del NADH a livello respiratorio e ne favoriscono l'accumulo intracellulare, aumentando così l'efficienza della reazione (Prabhu et al., 2020).

Se con xilosio puro l'efficienza della bioconversione dipende dal bilanciamento tra crescita cellulare e disponibilità di cofattori, l'utilizzo di substrati di origine lignocellulosica introduce ulteriori variabili, legate alla natura della materia prima e al suo pretrattamento.

L'impiego della biomassa lignocellulosica come fonte di carbonio per il metabolismo microbico richiede, infatti, un pretrattamento preliminare che permette di solubilizzare in modo efficace la frazione pentosica attraverso l'idrolisi delle fibre di emicellulosa, dando origine a un liquido ricco di zuccheri noto come black liquor. Tuttavia, lo stesso processo determina anche la generazione di furani (furfurale e 5-idrossimetilfurfurale) e di altri composti inibitori che compromettono l'attività metabolica dei microrganismi (Jilani SB. et al., 2023).

Per valutare la capacità di *P. fermentans* WC 1507 di metabolizzare lo xilosio derivante dal pretrattamento *organosolv* dell'emicellulosa, è stata condotta una prova di crescita comparativa in terreno di produzione MY, con xilosio puro a 20 g/L e a 120 g/L, e in terreno MY addizionato di *black liquor*.

Come già descritto in studi precedenti (Raimondi et al., 2023), il *black liquor*, ottenuto tramite pretrattamento *organosolv* della canapa (varietà *Assocanapa*, Carmagnola, Italia), è stato impiegato come fonte di carbonio. In particolare, dopo un trattamento di liofilizzazione,

è stato aggiunto al terreno MY in quantità tali da ottenere una concentrazione di xilosio di 20 g/L o 120 g/L (terreni denominati rispettivamente MYBL-20 e MYBL-120).

P. fermentans WC 1507 è stato fatto crescere in bioreattore nelle quattro differenti condizioni e sono state estratte le curve di crescita e di eventuale produzione di xilitolo.

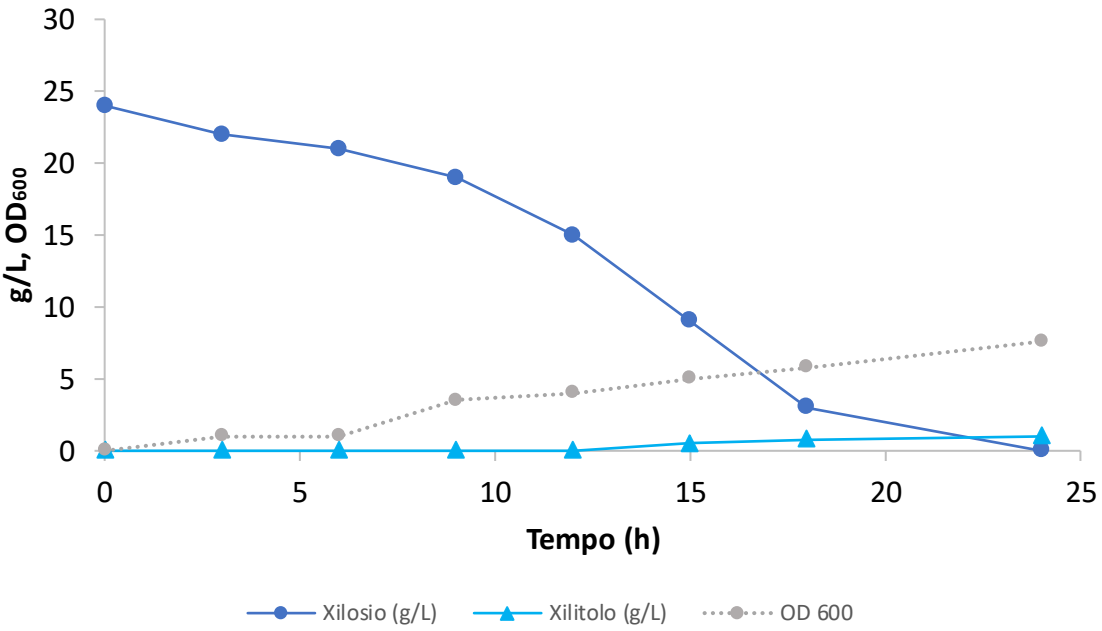


Figura 4.1: Curva di produzione di xilitolo (triangoli) a partire da 20 g/L di xilosio (cerchi). La prova è stata condotta in triplicato; è riportato l'andamento di una fermentazione rappresentativa.

Il ceppo coltivato in terreno MY con 20 g/L di xilosio puro, nel giro di 24 ore, ha utilizzato tutto lo xilosio a disposizione per la crescita, quantificata con un aumento della densità ottica fino ad un valore di circa 7.5, senza però produrre quantità apprezzabili di xilitolo (< 1 g/L) (*Fig. 4.1*).

Similmente è accaduto nella condizione di crescita in MYBL-20, in cui è stato registrato comunque un aumento della torbidità della coltura, seppur inferiore rispetto al MY-20, ed una produzione di xilitolo decisamente trascurabile.

I risultati di maggior interesse sono stati osservati in colture di *P. fermentans* WC 1507 contenenti 120 g/L di xilosio puro, in cui il ceppo ha raggiunto valori di produzione di xilitolo particolarmente elevati, fino a 63.5 g/L di xilitolo, con una resa $Y_{P/S}$ del 71,5%. Inoltre, è stato possibile notare un progressivo aumento della densità ottica, intorno ai 30 a 72 h per poi raggiungere il suo massimo in fase stazionaria, dove è stata registrata una OD_{600} di 35. Contemporaneamente all'aumento della torbidità, è stata osservata una progressiva

diminuzione del pH della coltura fino a valori intorno ai 3.5, in conseguenza dell'utilizzo dell'ammonio per la crescita del microrganismo.

Un andamento completamente opposto è stato quello registrato dalla crescita in MYBL-120 *g/L,* dove è stata osservata un'inibizione della crescita dei lieviti durante tutto l'arco della fermentazione, presumibilmente a causa dalla presenza di elevate concentrazioni di inibitori derivanti dal pretrattamento della biomassa lignocellulosica.

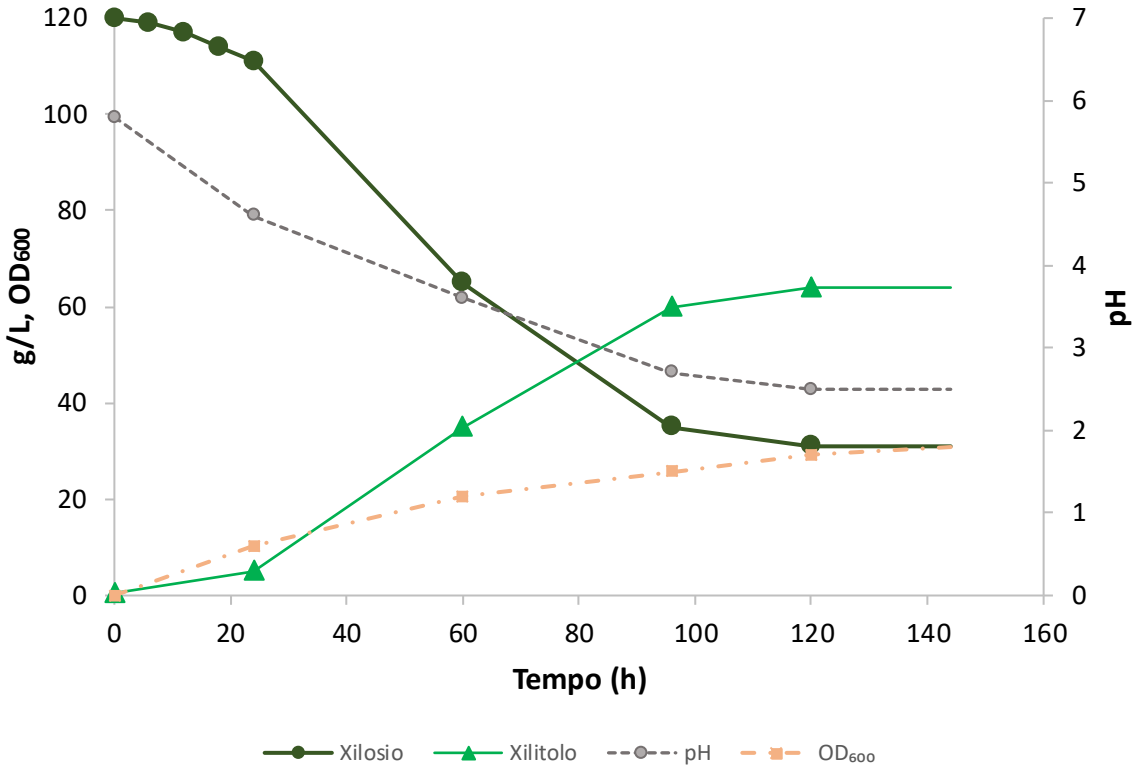


Figura 4.2: Andamento nel tempo di xilosio (cerchi), xilitolo (triangoli), OD_{600} (linea tratto-punto) e pH (linea tratteggiata) in colture di P. fermentans WC 1507 *partite con 120 g/L di xilosio. La prova è stata condotta in triplicato; è riportato l'andamento di una fermentazione rappresentativa.*

In conclusione, i risultati ottenuti mostrano che la produzione di xilitolo da parte di *P. fermentans* WC 1507 dipende in modo marcato dalla concentrazione di xilosio e dalla natura del substrato. A basse concentrazioni (20 g/L), lo xilosio viene destinato quasi interamente alla crescita cellulare, senza una produzione apprezzabile di xilitolo, sia in terreno con xilosio puro sia in presenza di *black liquor*. Solo a 120 g/L di xilosio puro il ceppo ha dato luogo a una bioconversione efficiente, raggiungendo 63.5 g/L di xilitolo con una resa del 71.5%. Al contrario, la crescita in MYBL-120 è risultata fortemente inibita, verosimilmente a causa dei composti derivanti dal pretrattamento della biomassa.

Tali evidenze confermano il potenziale del ceppo per la produzione di xilitolo, ma indicano che l'impiego del *black liquor* come fonte di carbonio non è praticabile, evidentemente perché alcune molecole generate dalla degradazione degli zuccheri durante il pretrattamento *organosolv* (principalmente furani) inibiscono l'attività e la vitalità del lievito (Raimondi S. et al., 2023). Il *black liquor* richiede pertanto una fase di detossificazione preliminare o, in alternativa, l'impiego di lieviti resistenti agli inibitori in esso presenti. Alla luce di quanto osservato negli esperimenti preliminari, *P. fermentans* WC 1507 non ha mostrato alcuna crescita nel terreno MYBL-120, mentre nel terreno MYBL-20 la crescita è stata osservata ma in misura ridotta rispetto al terreno semisintetico. Questi risultati suggeriscono che i composti inibitori presenti nel *black liquor* influiscono sulla crescita e ancora di più sulla produzione di xilitolo da parte del lievito già a basse concentrazioni di black liquor, bloccandola del tutto a concentrazioni più elevate.

4.2 MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE DI FURFURALE, 5-IDROSSIMETIL-FURFURALE E ACIDO ACETICO

Per approfondire la tolleranza di *P. fermentans* WC 1507, sono stati condotti degli screening finalizzati a determinare la minima concentrazione inibente (MIC) di tre inibitori potenzialmente presenti nel *black liquor*: furfurale, 5-idrossimetil-furfurale (5-HMF) e acido acetico.

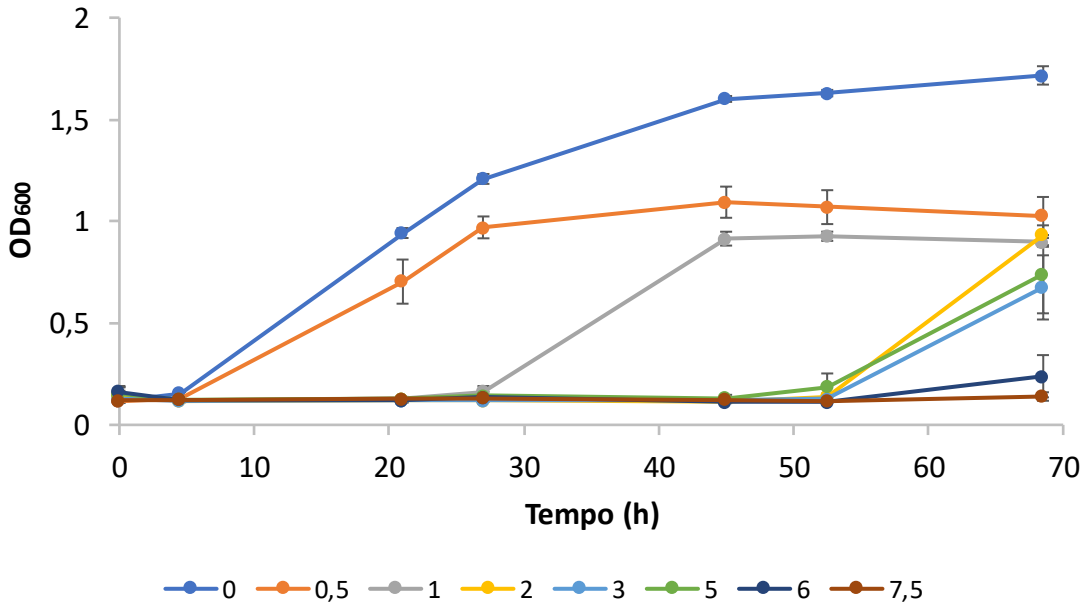


Figura 4.3: Andamento della crescita di P. fermentans WC 1507 in presenza di concentrazioni crescenti di furfurale (0–7.5 g/L). La prova è stata condotta in triplicato; i valori sono medie ± DS.

L'andamento delle curve di crescita mostra un effetto dose-dipendente del furfurale sulla crescita di *P. fermentans* WC 1507 *(Fig. 4.3)*. A causa del limite di solubilità di 8.3 g/L, durante le prove non sono mai state oltrepassate concentrazioni di furfurale superiori ai 7.5 g/L.

Il controllo positivo (0 g/L) cresce dopo una breve fase lag e raggiunge un'assorbanza di circa 1.7 al termine dell'esperimento (circa 70 h). A 0.5 g/L la fase lag resta breve, ma la crescita è rallentata e la torbidità si stabilizza intorno a 1.0-1.1, quindi a un valore inferiore rispetto a quello del controllo. A 1 g/L la fase lag si allunga in modo evidente (la crescita inizia dopo circa 27 h), fino al raggiungimento di un *plateau* a valori di assorbanza intorno a 0.9. Alle concentrazioni di 2, 3 e 5 g/L la fase lag è ulteriormente prolungata: l'assorbanza resta ai valori iniziali fino ad oltre 50 ore e la crescita compare solo nell'ultimo punto della curva, con valori finali inferiori al controllo (circa 0.9 a 2 g/L, 0.7 a 3 g/L e 0.7 a 5 g/L). A 6 g/L si osserva solo un debole accenno di crescita, mentre a 7.5 g/L non si osserva alcuna crescita nell'intervallo di tempo considerato.

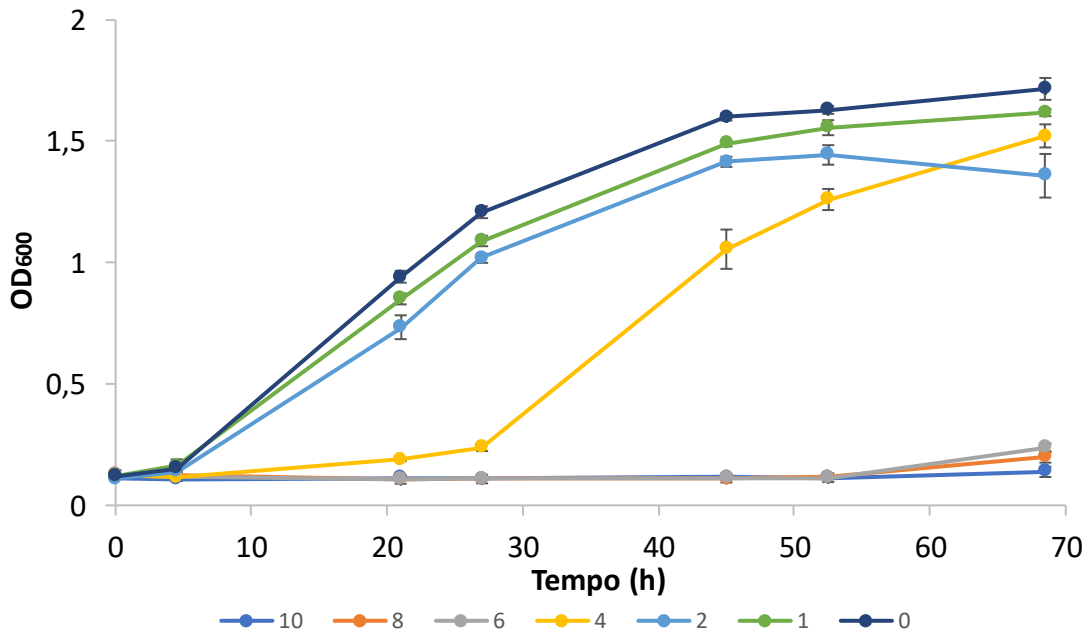


Figura 4.4: Andamento della crescita di P. fermentans WC 1507 in presenza di concentrazioni crescenti di 5-idrossimetil furfurale (0–10 g/L). La prova è stata condotta in triplicato; i valori sono medie ± DS.

Nel caso del 5-idrossimetil-furfurale, l'andamento delle curve mostra un effetto dose-dipendente dell'inibitore sulla crescita di *P. fermentans* WC 1507 *(Fig. 4.4)*, similmente a

quanto visto per il furfurale. Non essendoci problemi di solubilità della sostanza, sono state utilizzate delle concentrazioni anche superiori agli 8 g/L.

Il controllo positivo (0 g/L) cresce dopo una breve fase lag e raggiunge un'assorbanza di circa 1.7 al termine dell'esperimento. A 1 g/L la crescita è molto simile a quella del controllo, con un'assorbanza finale di circa 1.6. A 2 g/L la fase lag resta breve e la crescita è leggermente rallentata: la torbidità raggiunge circa 1.4 intorno a 45-52 h e poi diminuisce lievemente, fino a circa 1.35 a fine esperimento. A 4 g/L la fase lag si allunga in modo evidente: fino a circa 27 h la torbidità rimane molto bassa (inferiore a 0.3), poi la crescita parte e a 68 h il lievito raggiunge circa 1,5, quindi un valore prossimo a quello del controllo. A 6 g/L, 8 g/L e 10 g/L non si osserva crescita fino a circa 52 h, per poi mostrare un minimo accenno di crescita in prossimità delle 70 h (circa 0.2 per 6 g/L e 8 g/L e circa 0.15 per 10 g/L).

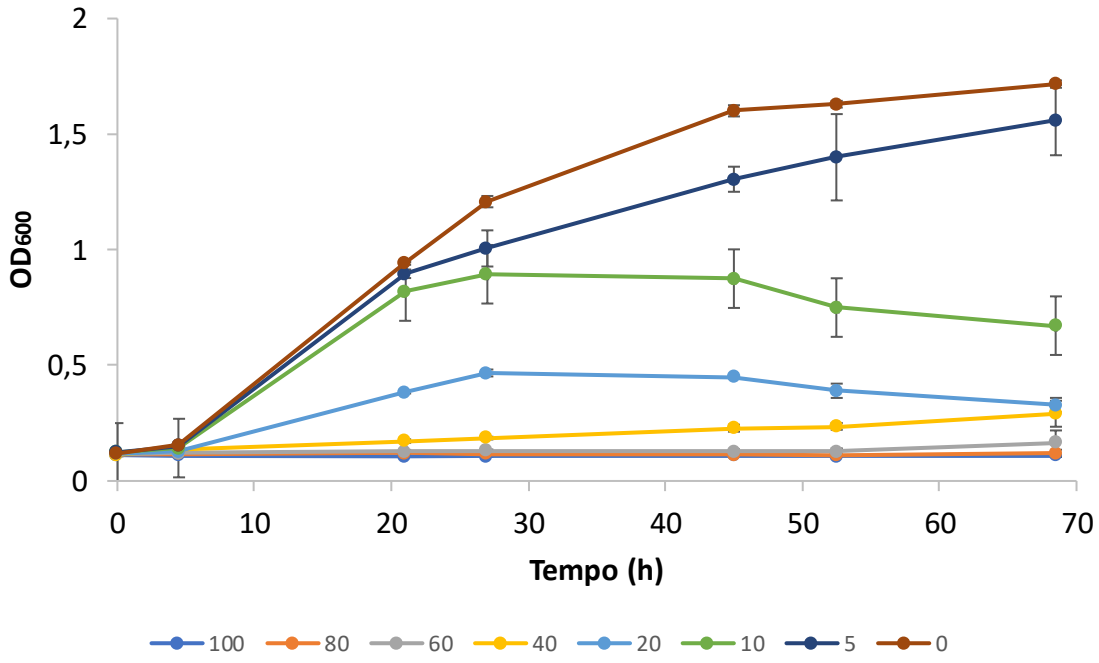


Figura 4.5: Andamento della crescita di P. fermentans WC 1507 in presenza di concentrazioni crescenti di di acido acetico (0-100 g/L). La prova è stata condotta in triplicato; i valori sono medie ± DS.

L'andamento delle curve mostra che anche l'acetato esercita un effetto dose-dipendente sulla crescita di *P. fermentans* WC 1507 *(Fig. 4.5)*. Anche in questo caso sono state utilizzate delle concentrazioni di inibitore particolarmente elevate, non avendo alcun problema di solubilità.

A differenza dei due furani, l'acido acetico agisce inibendo solo la crescita e non la fase lag, che tende a permanere costante per tutte le varie concentrazioni. A 5 g/L la crescita è molto

simile a quella del controllo positivo (0 g/L) fino a circa 21 h, poi rallenta leggermente e raggiunge a fine esperimento un'assorbanza di circa 1.6, di poco inferiore a quella del controllo (circa 1.7). A 10 g/L il lievito cresce in modo evidente nelle prime 27 h fino a circa 0.9, ma poi l'OD_{600} si stabilizza e tende a diminuire, scendendo a circa 0.7 alla fine. A 20 g/L la crescita è nettamente ridotta (massimo di circa 0.5 intorno alle 27 h) e l'assorbanza cala poi a circa 0.3. A 40 g/L si osserva solo una crescita molto limitata e lenta, con valori finali intorno a 0.3. A 60 g/L la torbidità resta quasi invariata rispetto ai valori iniziali, con un debole aumento solo nell'ultimo punto, mentre a 80 g/L e 100 g/L non si osserva alcuna crescita nell'intervallo di tempo considerato.

Un punto importante da considerare nel caso dell'acetato è la dipendenza dal pH. L'acido acetico è un acido debole ($K_a \approx 1{,}75\ 10^{-5}$) motivo per cui il pH finale dipende direttamente dalla sua concentrazione e dalla presenza di altre sostanze. Nel caso dell'esperimento in questione, è stata notata una progressiva basificazione del pH in corrispondenza delle crescite, mentre a più elevate concentrazioni di inibitore il pH permaneva invariato.

Nel complesso, gli esperimenti per la determinazione della minima concentrazione inibente hanno mostrato che sia il furfurale sia il 5-HMF inibiscono la crescita di *P. fermentans* WC 1507 agendo principalmente sull'allungamento della fase lag e sulla riduzione dell'entità della crescita all'aumentare delle concentrazioni delle due sostanze. Per il furfurale, entro circa 68 h di incubazione, la crescita è stata osservata fino a 5 g/L, sempre con una fase lag progressivamente più lunga e un'assorbanza finale inferiore a quella del controllo. Per il 5-HMF il lievito è cresciuto fino a 4 g/L, con una fase lag prolungata e un successivo recupero quasi completo, mentre a 6, 8 e 10 g/L la crescita è risultata minima o assente. Sulla base di questi risultati, per le indagini successive ci si è concentrati principalmente sul furfurale, utilizzando le concentrazioni di 1 g/L, 2 g/L e 5 g/L. Il 5-HMF non è stato più utilizzato per problemi di disponibilità della sostanza, mentre l'acido acetico è stato scartato a causa della forte variazione del pH all'interno della coltura, difficilmente monitorabile.

4.3 EFFETTO DEL FURFURALE SULLA PRODUZIONE DI XILITOLO

Dai risultati ottenuti con le prove di MIC, in cui 1 g/L di furfurale si era dimostrato compatibile con la crescita di *P. fermentans* WC 1507 nonostante allungasse la fase lag, è stata condotta una prova di produzione di xilitolo in presenza di questo inibitore.

Al terreno MY contenente 120 g/L di xilosio è stato aggiunto 1 g/L di furfurale, con l'obiettivo di valutare se una concentrazione che consenta la crescita sia compatibile anche con la bioconversione dello xilosio in xilitolo, creando così delle condizioni che simulano la crescita in *black liquor*.

I risultati di questa prova sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle colture allestite in beuta con terreno MY contenente 120 g/L di xilosio;

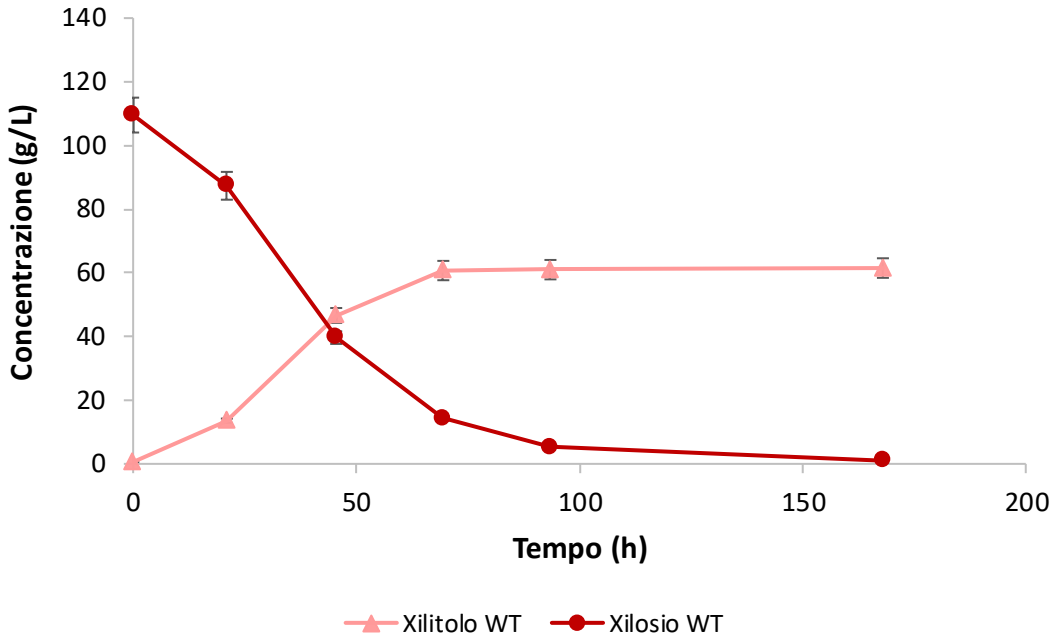


Figura 4.6: Curva di produzione dello xilitolo a partire da 120 g/L di xilosio, in condizioni di assenza di inibitore. La prova è stata condotta in triplicato; i valori sono medie ± DS.

Il grafico in *Fig. 4.6* mostra l'andamento della curva di produzione di xilitolo a partire da circa 120 g/L di xilosio da parte di *P. fermentans* WC 1507. Raggiunte le 150 ore, la concentrazione di xilosio nel terreno di coltura è pressoché esaurita, mentre lo xilitolo prodotto raggiunge un picco massimo di produzione attorno ai 61.5 g/L. In assenza di inibitori, quindi, il lievito utilizza lo xilosio fornito all'interno del terreno di coltura per la produzione di buone quantità di xilitolo.

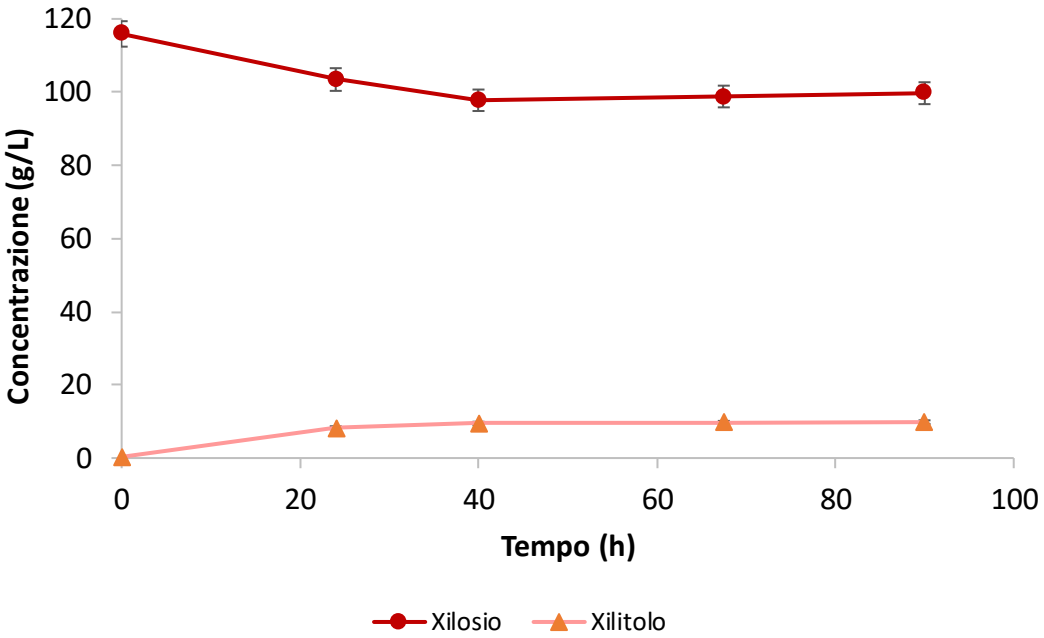


Figura 4.7: *Curva di produzione dello xilitolo a partire da 120 g/L di xilosio + 1 g/L di furfurale. La prova è stata condotta in triplicato; i valori sono medie ± DS.*

Nelle beute in cui è stato aggiunto 1 g/L di furfurale, la produzione di xilitolo è drasticamente diminuita. Dalla *Fig. 4.7* è possibile osservare come il consumo di xilosio rimanga al di sotto dei 20 g/L, mentre la produzione di xilitolo si è attestata a circa 10 g/L, circa 1 /6 rispetto alla prova in assenza di inibitore.

Questo risultato indica che una concentrazione di furfurale permissiva per la crescita non è necessariamente permissiva per la produzione del metabolita di interesse: l'effetto dell'inibitore si manifesta quindi non solo sul ritmo di crescita, ma anche sull'attività di bioconversione.

4.4 MUTAGENESI UV

Al fine di isolare mutanti che presentassero una maggiore tolleranza ai furani, e in particolare al furfurale rispetto al ceppo wild-type, una coltura di *P. fermentans WC 1507* con una concentrazione di 8,0 10^8 cellule/mL è stata sottoposta ad una mutagenesi fisica attraverso l'utilizzo di raggi UV. L'impiego della mutagenesi random per il miglioramento genetico di *P. fermentans* WC 1507 è stata una scelta obbligata, vista l'assenza di tools genetici per un intervento mirato in questo organismo.

Dopo essere stata incubata in terreno liquido YPX con 20 g/L di xilosio, lasciata crescere per 48 ore a 30° C a 180 rpm, la coltura è stata sottoposta a diluizioni seriali in fisiologica per poi essere piastrata su terreno solido YPX. 100 µL delle diluizioni seriali sono stati seminati sulle piastre *Petri* e distribuiti con un'ansa ad L. Successivamente le piastre sono state sottoposte ad irraggiamento UV.

Inizialmente, per individuare il tempo di irraggiamento ottimale, sono state utilizzate 6 differenti tempistiche di mutagenesi: 5 s, 10 s, 30 s, 1 min, 2 min e 5 min. Dopo aver incubato le piastre irraggiate a 30° C per 48 ore, ne è stata fatta una conta della vitalità. Dopo due giorni, le colonie risultavano essere ancora troppo piccole e difficili da contare, motivo per cui tutte le piastre sono state re-incubate per altre 48 ore per poi poterne fare una nuova conta.

		Tempo di irraggiamento						
		0 s	5 s	10 s	30 s	1 min	2 min	5 min
Diluizioni	-3	n.c.	n.c.	n.c.	6	3	0	0
	-4	n.c.	n.c.	n.c.	5	1	0	0
	-5	n.c.	n.c.	n.c.	2	1	0	0
	-6	n.c.	532	175	2	0	0	0
	-7	66	63	48	0	0	0	0
	-8	9	0	0	0	0	0	0

Tabella 4.1: Mutagenesi UV di P. fermentans WC 1507. Colonie vitali ottenute a diversi tempi di irraggiamento su diverse diluizioni decimali. n.c. *indica un numero di colonie non contabile.*

La *Tabella 4.1* riporta il numero di colonie ottenute dopo irraggiamento UV di una coltura di *P. fermentans* WC 1507 a tempi crescenti di esposizione (da 0 a 5 min), a partire da diluizioni seriali della coltura irraggiata (da 10^{-3} a 10^{-8}). Le celle con dicitura *n.c.* corrispondono a piastre con un numero di colonie troppo elevato per essere contate, segno che a quei tempi e a quelle diluizioni la mutagenesi non ha causato una mortalità elevata.

Nel controllo non irradiato (0 min) le piastre sono risultate essere non contabili fino alla diluizione 10^{-6}, mentre alle diluizioni 10^{-7} e 10^{-8} sono state contate rispettivamente 66 e 9 colonie. Dopo 5 s e 10 s di esposizione il numero di colonie è ancora molto alto: sono ancora non contabili le piastre fino alla diluizione 10^{-5}, mentre a 10^{-6} si contano 532 colonie dopo 5 s e 175 dopo 10 s, e a 10^{-7} figurano 63 e 48 colonie rispettivamente. La mortalità indotta da questi tempi di esposizione è quindi ancora modesta.

Un cambiamento netto si osserva a partire da 30 s, quando il numero di colonie crolla: si contano 6 colonie a 10^{-3}, 5 a 10^{-4} e 2 sia a 10^{-5} sia a 10^{-6}, mentre a 10^{-7} e 10^{-8} non cresce alcuna colonia. Questo indica che la maggior parte delle cellule è stata inattivata. Dopo 1 min di esposizione le colonie sopravvissute sono ancora presenti ma pochissime (3 a 10^{-3} e 1 a 10^{-4}), mentre dopo 2 min e 5 min non si osserva alcuna colonia a nessuna diluizione, indicando una mortalità praticamente totale.

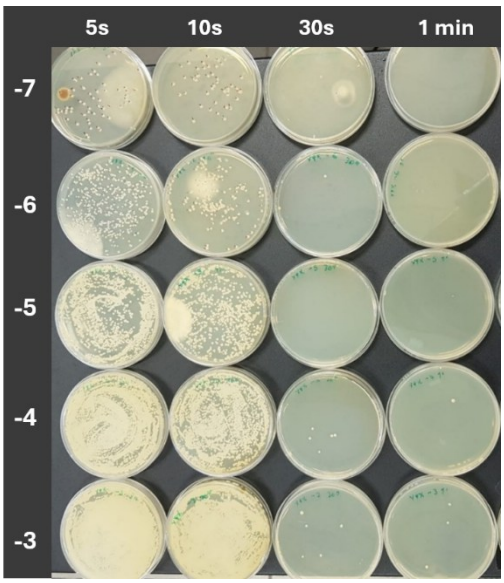


Figura 4.8: Piastre di P. fermentans WC 1507 derivanti da irraggiamento UV a 5 s, 10 s, 30 s e 1 min a diluizioni successive (da 10^{-3} fino a 10^{-7}).

Sulla base di questi risultati, per gli esperimenti successivi è stato scelto un tempo di esposizione di 1 min, ritenuto il miglior compromesso tra mortalità elevata, necessaria per esercitare un'efficace pressione mutagena, e persistenza di un numero sufficiente di cellule sopravvissute da cui isolare eventuali mutanti. Poiché dopo 2 min non sopravvive alcuna cellula, un'esposizione di 1 min lascia inoltre un margine di sicurezza rispetto alla dose letale per l'intera popolazione. Dalle piastre ottenute ai diversi tempi di irraggiamento e alle diverse diluizioni sono state inoltre selezionate 96 colonie, pur essendo il numero di colonie recuperabili molto più elevato, e sono state ri-piastrate su piastre *Petri* di YPX suddivise in 32 quadranti (*Fig. 4.9*) e nuovamente incubate.

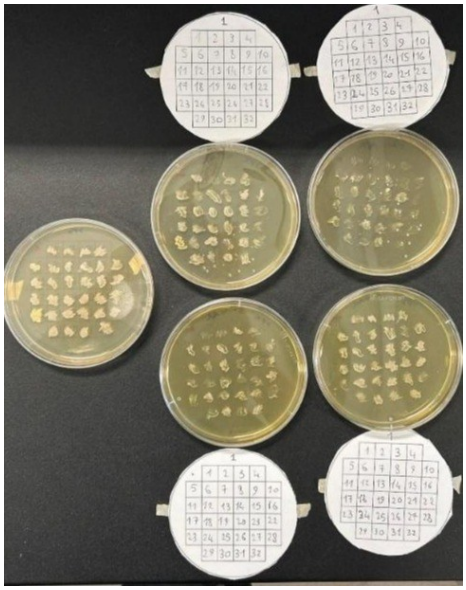


Figura 4.9: Piastre Petri con YPX divise in 32 quadranti sulle quali sono state strisciate le 96 colonie selezionate dalla mutagenesi UV.

Una prova ulteriore è stata condotta seminando le diluizioni seriali della coltura di *P. fermentans* WC 1507 su piastre contenenti 0.1, 0.5 e 1 g/L di furfurale, in modo da effettuare già una prima selezione di mutanti con maggiore tolleranza all'inibitore e da alleggerire la successiva fase di screening. È stata quindi messa a punto una nuova prova, questa volta considerando solo diluizioni su piastra fino a 10^{-4} e un unico tempo di esposizione UV, ossia 1 min. Le diverse diluizioni sono state piastrate sia su terreno YPX, usato come controllo, sia su YPX addizionato di furfurale a concentrazioni crescenti.

		YPX	0.1 g/L F	0.5 g/L F	1 g/L F
Diluizioni	-1	n.c.	281	133	0
	-2	38	12	6	0
	-3	3	2	0	0
	-4	0	0	0	0

Tabella 4.2: Mutagenesi UV di P. fermentans WC 1507. Colonie vitali ottenute dopo 1 min di irraggiamento UV su diverse diluizioni decimali, seminate in piastre di YPX addizionato con 0, 0.1, 0.5 e 1 g/L di furfurale (F). n.c. *indica un numero di colonie non contabile.*

Su YPX le colonie non sono contabili alla diluizione 10^{-1} e scendono a 8 a 10^{-2} e a 3 a 10^{-3}, mentre a 10^{-4} non cresce nulla. In presenza di 0.1 g/L di furfurale il numero di colonie è confrontabile con quello del controllo (281 a 10^{-1}, 12 a 10^{-2} e 2 a 10^{-3}, nessuna a 10^{-4}), indicando che questa concentrazione non riduce in modo apprezzabile la sopravvivenza delle cellule irraggiate. A 0.5 g/L l'effetto inibitorio diventa evidente: le colonie crescono solo alla

diluizione 10^{-1} (133, circa la metà rispetto a 0.1 g/L) e non se ne osservano a diluizioni maggiori, quando il numero di cellule piastrate è molto più basso. A 1 g/L di furfurale non si osserva alcuna colonia a nessuna diluizione, nemmeno a 10^{-1}, a indicare che questa concentrazione impedisce la crescita dei lieviti poiché ulteriormente danneggiati dalla presenza di furfurale. Alcune delle colonie cresciute da 0.5 g/L di furfurale sono state recuperate dalle piastre di mutagenesi ed isolate.

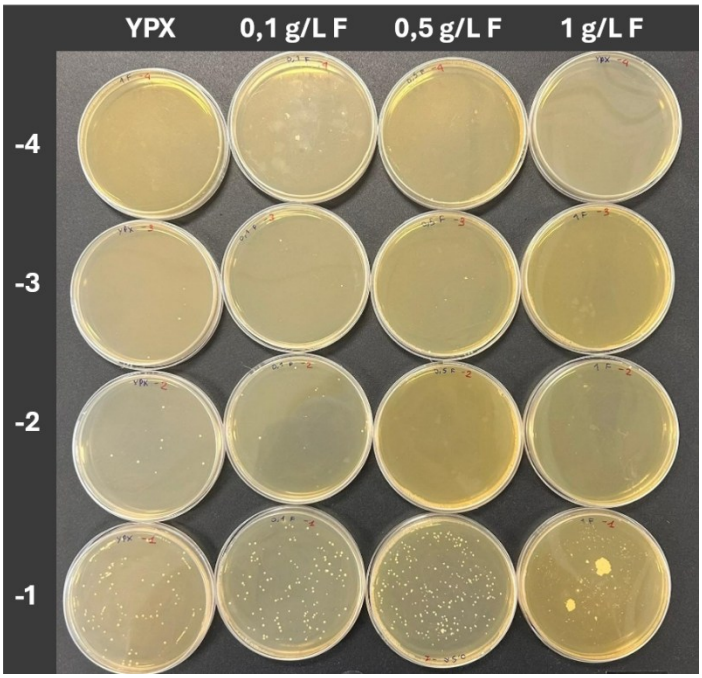


Figura 4.10: Mutagenesi UV di P. fermentans WC 1507 in presenza di 1 g/L di furfurale. Colonie vitali ottenute a diverse diluizioni decimali.

Alla fine degli esperimenti di mutagenesi UV sono stati isolati circa 200 ceppi su piastre *Petri* con terreno YPX divise in 32 quadranti, così da poter essere più facilmente conservate.

4.5 SCREENING DI CEPPI MUTANTI

Per parallelizzare lo screening dei 200 ceppi isolati dalla mutagenesi UV, è stata allestita una prima prova che impiegasse micropiastre da 24 pozzetti.

Per ciascun ceppo sono state testate due condizioni, ciascuna in triplicato: 900 µL di terreno YPX + 100 µL di sospensione cellulare, oppure 900 µL di terreno YPX addizionato di furfurale (1 g/L) + 100 µL di sospensione cellulare. Il volume totale in ogni pozzetto era di 1 mL.

Le piastre sono state incubate in aerobiosi a 30 °C per tre giorni, misurando ogni 24 ore il valore dell'OD_{600} mediante lettore di micropiastre.

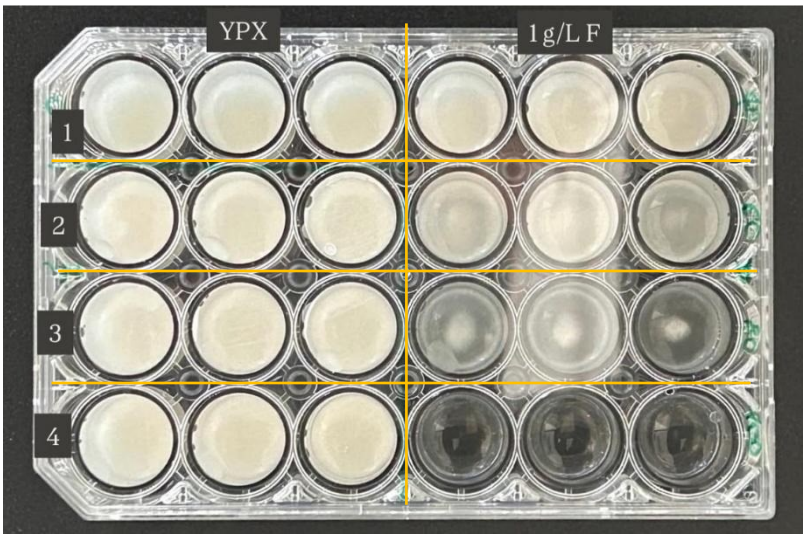


Figura 4.11: Allestimento di una piastra rappresentativa utilizzata per lo screening; la piastra è stata allestita con 4 ceppi differenti a due condizioni, (YPX e YPX + 1 g/L F), ciascuna in triplicato. Foto scattata a 48 h di incubazione.

Nel caso dell'esempio riportato in *Figura 4.11*, i ceppi in YPX hanno raggiunto una torbidità elevata e simile, a indicare che le cellule sottoposte a mutagenesi erano vitali e che, in assenza dell'inibitore, non vi sono differenze visibili di crescita tra i ceppi. In presenza di furfurale, invece, si osserva una netta differenza di comportamento. Il ceppo della riga 1 cresce in modo molto simile al controllo; quello della riga 2 mostra una crescita evidente ma ridotta; il ceppo della riga 3 cresce ancora meno e con una certa variabilità tra i triplicati; il ceppo della riga 4 non mostra alcuna crescita visibile.

Già ad una prima osservazione visiva è quindi possibile distinguere ceppi che presentano un'evidente tolleranza al furfurale rispetto a quelli che paiono più sensibili.

Sulla base di questo screening sono stati selezionati 100 ceppi, scelti in base a valori di OD_{600} in presenza di furfurale equivalenti o superiori a quelli ottenuti in solo YPX. Su questi ceppi sono stati poi condotti screening più approfonditi.

4.5.1 SCREENING LIQUIDO IN TUBO DA BATTERIOLOGIA

Un limite dello screening in piastra multi-pozzetto è che l'agitazione è stata tenuta bassa per evitare cross-contaminazioni tra un pozzetto e l'altro; tuttavia, queste condizioni non sono ottimali per la crescita di un lievito aerobio. Per questo motivo, i 100 ceppi risultati più

promettenti sono stati sottoposti a un secondo screening di conferma in tubi da batteriologia, allestiti come descritto nella sezione 3.3.3.

La prova è stata condotta coltivando i ceppi in tubi da batteriologia, incubati a 30°C in un termoshaker orbitale. Ogni tubo conteneva un totale di 3 mL di coltura in YPX, addizionata o meno di 1 g/L di furfurale. Al fine di partire da una concentrazione cellulare comparabile tra i diversi ceppi, l'inoculo è stato standardizzato, provvedendo a diluire opportunamente le colture madri e a seminare ogni tubo con una medesima carica cellulare, pari ad un valore iniziale di OD_{600} di 0.3.

Dei 100 ceppi di partenza, 70 hanno confermato il loro comportamento anche in queste condizioni, mostrando una buona crescita in presenza di 1 g/L di furfurale.

Questa metodica di screening si è rivelata efficace in quanto ha consentito di restringere ulteriormente il numero di ceppi da considerare, nonostante si trattasse di una procedura molto lunga e laboriosa, che ha richiesto grandi quantità di materiale da sterilizzare e utilizzare.

4.5.2 SCREENING MEDIANTE DILUIZIONI SU PIASTRA PETRI

I 70 ceppi selezionati nella prova di crescita precedentemente descritta sono stati sottoposti ad un'ulteriore prova per restringere ulteriormente il numero di mutanti. A partire da ciascuna delle 70 colture over night cresciute in tubo da batteriologia di YPX addizionato di 1g/L di furfurale sono state allestite diluizioni seriali in soluzione fisiologica, da 10^{-1} a 10^{-4}, e di ognuna di esse sono stati seminati 4 µL su piastre *Petri* di YPX addizionate di 2 g/L e di 5 g/L di furfurale, come da protocollo nella sezione 3.3.4. Essendo tutti e 70 i ceppi ben cresciuti a 1g/L di furfurale, si è deciso di aumentarne le concentrazioni all'interno del terreno di coltura per tentare un ulteriore selezione di mutanti.

Le piastre sono state incubate a 30° C e ogni 24 ore per diversi giorni sono state studiate visivamente e lasciate in incubazione per il tempo necessario alla crescita. In questo esperimento di screening è stato infatti riscontrato che i tempi di crescita di *P. fermentans* su furfurale sono più lunghi rispetto al solo YPX, in linea con quando visto dagli andamenti della MIC nella sezione 3.2, in cui si vedeva proprio come la presenza di furfurale, in particolare a 5 g/L ma anche a 2 g/L, allungasse la fase di lag del microrganismo senza però impedirne del tutto la crescita.

Le piastre Petri con addizionati 5 g/L di furfurale al YPX non hanno mostrato alcuna crescita significativa, mentre quelle con 2 g/L hanno fornito dati interessanti. Quello che è stato possibile osservare dalle piastre di screening è che alcuni ceppi, anche a maggiori diluizioni, presentavano delle crescite migliori rispetto al wild-type posto a controllo su ogni piastra. In particolare, dei 70 ceppi di partenza, ne sono stati selezionati 13, caratterizzati da crescite promettenti a 2 g/L di furfurale, come nel caso della *Figura 4.12*.

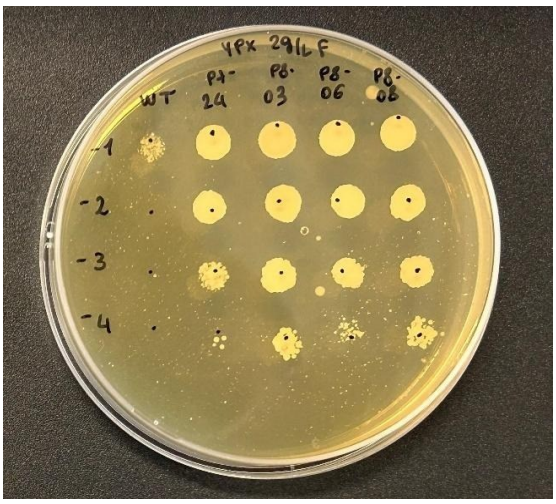


Figura 4.12: Piastra rappresentativa di YPX addizionata con 2 g/L di furfurale su cui sono stati inoculati 4 µL delle quattro diluizioni considerate.

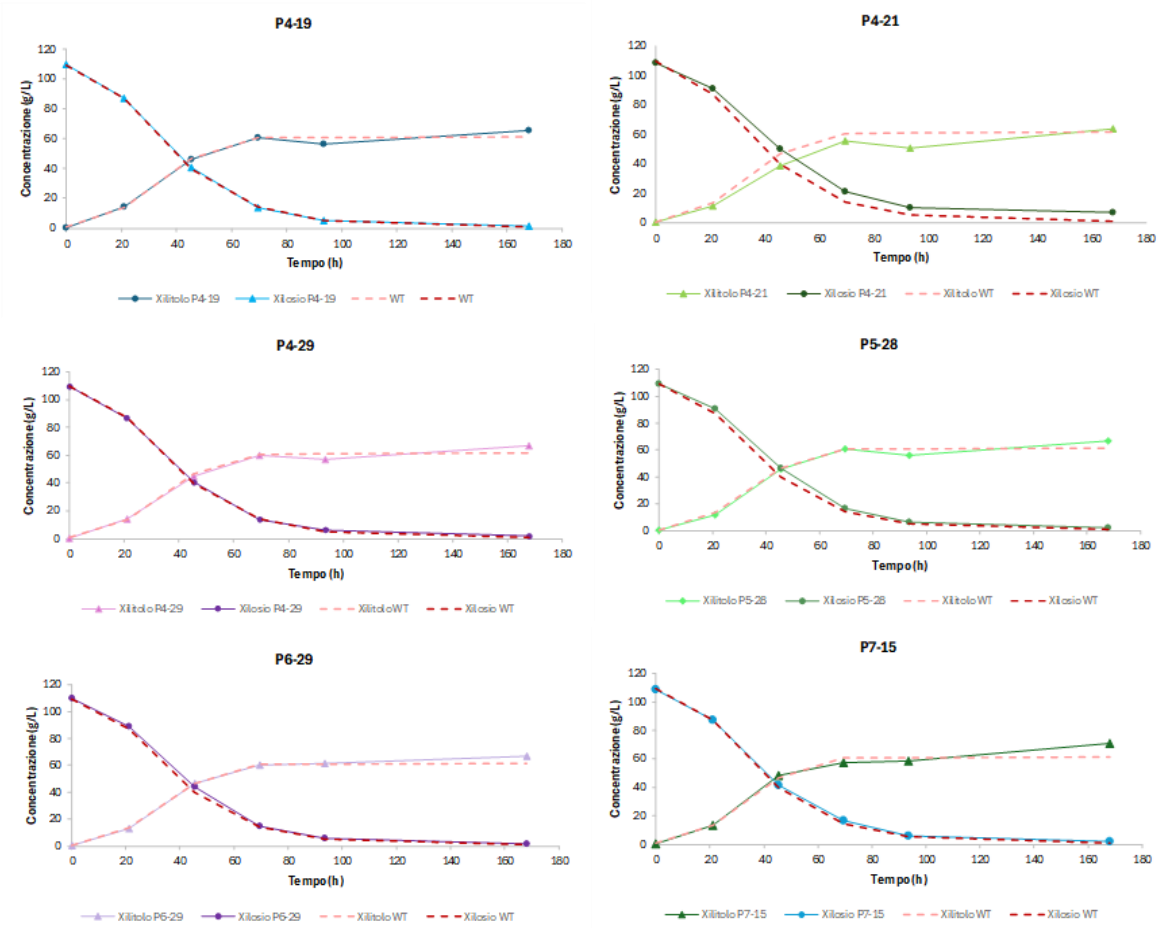
La piastra presa in esame mostra come i ceppi P8-03 e P8-08 siano abbondantemente cresciuti anche alla diluizione di 10^{-4}, destando così particolare interesse. P7-24 e P8-06 sono ben cresciuti fino a concentrazioni di 10^{-3} con qualche piccola colonia anche alla diluizione successiva. Ciò che di significativo si può trarre da questo specifico caso è il fatto che i mutanti parrebbero essere in grado di crescere su furfurale decisamente meglio rispetto al wild-type.

Questa metodica si è rivelata essere la più adatta per la selezione di mutanti poiché ha permesso di ridurre ulteriormente il numero di ceppi d'interesse e ha notevolmente rapidizzato le tempistiche di screening; per tali ragioni, è stato utilizzato anche per indagini successive.

4.6 PROVE DI PRODUZIONE CON E SENZA FURFURALE

A seguito dell'ampia selezione dovuta alla mutagenesi UV e ai successivi screening, i 13 ceppi isolati sono stati oggetto di una nuova prova di produzione di xilitolo, volta a valutare se la mutagenesi UV aveva alterato la capacità del ceppo di produrre xilitolo in elevata concentrazione. I mutanti sono stati quindi coltivati in beute agitate con 20 mL di terreno MY contenente 120 g/L di xilosio, prima in assenza, poi in presenza di 1 g/L di furfurale. La produzione è stata quantificata attraverso l'analisi HPLC dei picchi di assorbimento di xilosio e xilitolo per ogni mutante, una volta al giorno per una settimana (circa 160 ore).

Gli andamenti di consumo di xilosio e di produzione di xilitolo sono stati confrontati con quelli ottenuti precedentemente dal wild-type nelle medesime condizioni.



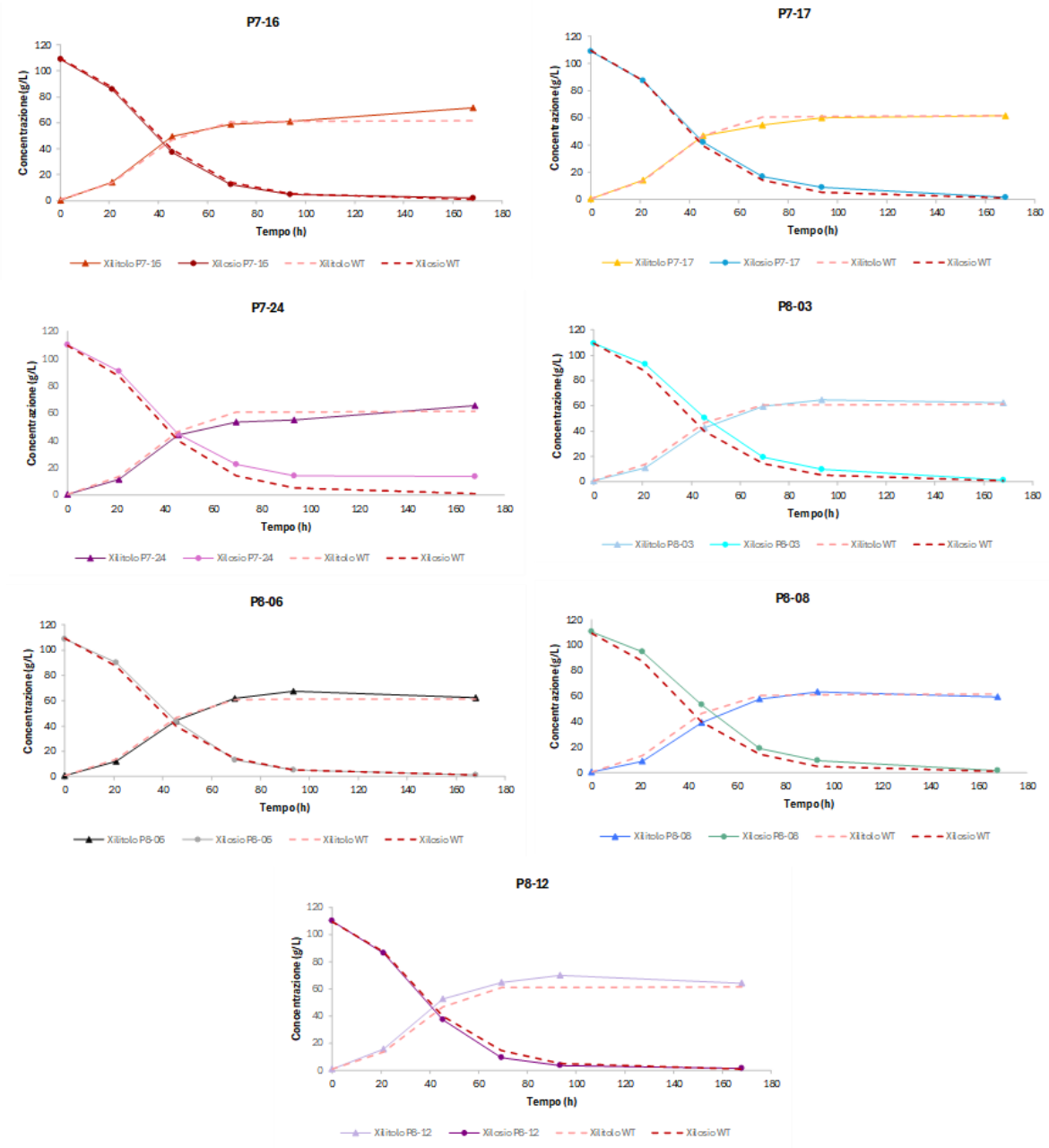


Figura 4.13: Andamento del consumo di xilosio e della produzione di xilitolo nei 13 mutanti ottenuti mediante irraggiamento UV e successivamente selezionati. Le prove sono state condotte in terreno MY contenente 120 g/L di xilosio, in assenza di furfurale. In ogni grafico, le linee tratteggiate sono gli andamenti di xilosio e xilitolo osservati per il wild-type.

In ogni grafico sono presenti le curve relative al ceppo in questione confrontate con le curve di *P. fermentans* wild-type considerato nella prova di produzione precedente (sezione *3.3*). Facendo un'analisi complessiva degli andamenti è stato osservato che tutti i mutanti utilizzano lo xilosio fornito per produrre concentrazioni di xilitolo che si aggirano intorno ai 60 g/L a 160 ore, in maniera similare al comportamento del wild-type. In particolare, i ceppi P6-29 e P7-15, mostrano un lieve aumento di concentrazione finale, fino a 70 g/L, rispetto al wild-type che invece si fermava a 61.5 g/L. Altri mutanti per cui è stata osservata una produzione di xilitolo interessante sono il P4-19, P4-29 e il P8-12, per cui si è arrivati a circa 68 g/L per i primi due, mentre interessante è la rapidità con cui l'ultimo inizia a produrre xilitolo. Tutti gli altri ceppi, invece, sono arrivati a livelli di produzione del ceppo wild-type.

Avendo identificato ceppi dalle buone potenzialità, si è quindi passati ad una prova di produzione per ogni mutante anche in presenza di furfurale all'interno del terreno di coltura. Ciò che ci si aspetterebbe da letteratura (Vajzovic et al., 2012; Prabhu et al., 2020) è che *P. fermentans* metta in atto un meccanismo di detossificazione dell'inibitore, che porterebbe alla formazione dei suoi metaboliti (alcol furfurilico o acido 2-furoico), compromettendo però la produzione di xilitolo. Questo aspetto è legato al fatto che, sia per la trasformazione del furfurale nei suoi metaboliti sia per la produzione di xilitolo, verrebbe impiegato lo stesso cofattore, il NADH, che non sarebbe più destinato unicamente alla bioconversione dello xilosio, ma verrebbe ripartito tra due processi distinti, riducendo così il potere redox disponibile per la via produttiva.

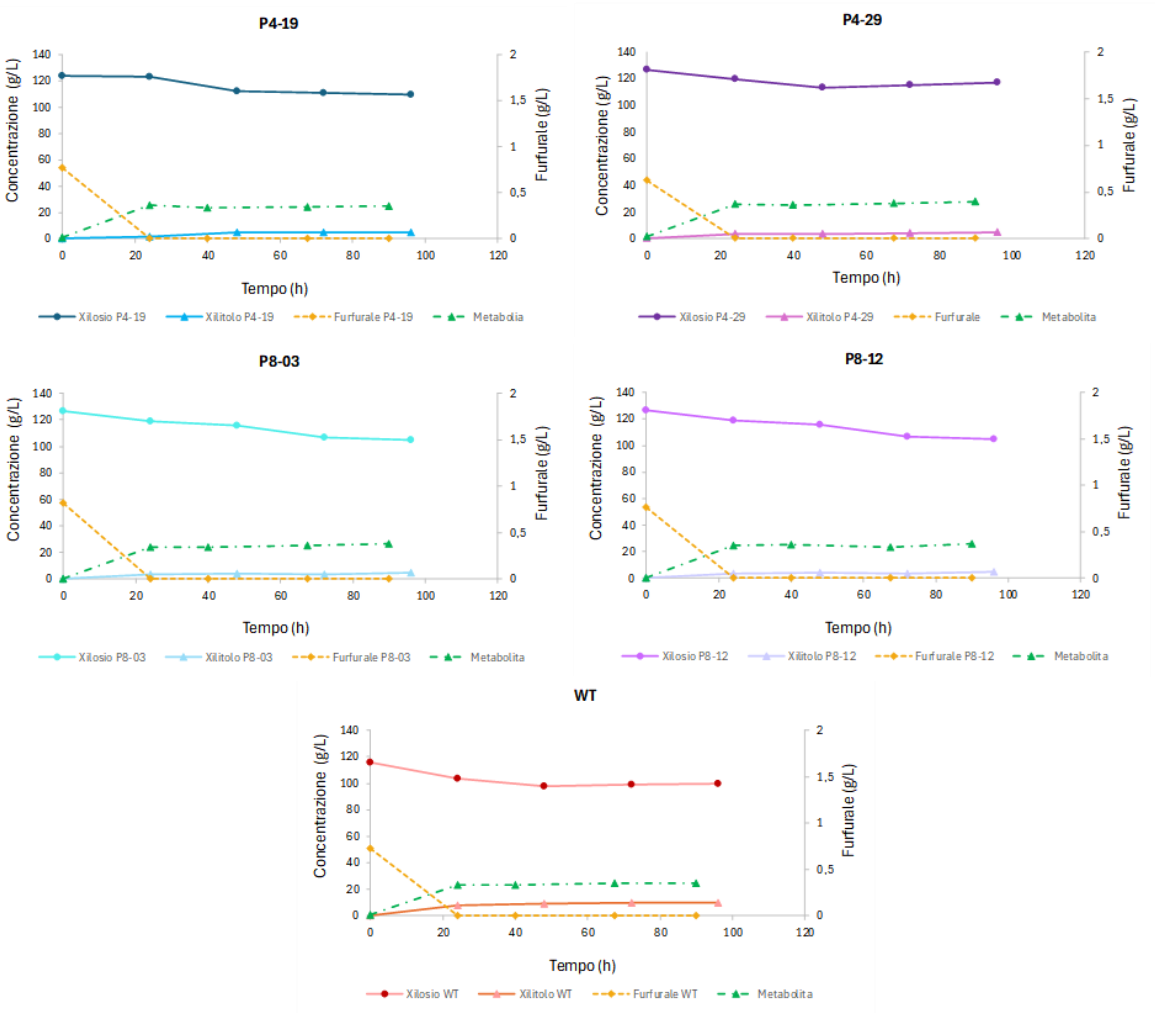


Figura 4.14: Andamento del consumo di xilosio, della produzione di xilitolo e della trasformazione del furfurale nei 4 mutanti ottenuti mediante irraggiamento UV e nel wild-type. Le prove sono state condotte in terreno MY contenente 120 g/L di xilosio e 1 g/L di furfurale. Il metabolita considerato è stato ipotizzato, da letteratura, essere l'acido 2-furoico.

Dall'analisi degli andamenti più rappresentativi è stato possibile notare come le concentrazioni di xilosio tendano a variare di pochi g/L rispetto ai 120 g/L iniziali. Coerentemente, la produzione di xilitolo è particolarmente contenuta, tanto nel wild-type quanto nei mutanti. In particolare, P4-29 e P6-12 presentano un picco di produzione entro le 100 ore (circa 4 giorni) rispettivamente di 4.5 g/L e 4.65 g/L; concentrazione che aumenta lievemente in P4-19, arrivando a toccare i 5 g/L. P8-03, invece, presenta un comportamento molto più simile al wild-type, con un picco di produzione che si accosta ai suoi 9.82 g/L, di 9.51 g/L.

In tutti i ceppi, mutanti e wild-type, il furfurale (concentrazione iniziale di 1 g/L) viene consumato completamente entro le prime 24 h e rimane a zero fino al termine della

fermentazione. Parallelamente compare un metabolita, molto probabilmente l'acido 2-furoico, il quale raggiunge circa 0.35-0.40 g/L entro 24 h e poi si stabilizza in un *plateau* fino a 96 h, compatibilmente con la detossificazione del furfurale. Le differenze rispetto al wild-type sono minime: la cinetica di scomparsa del furfurale è sovrapponibile e il *plateau* del metabolita è praticamente identico.

Il consumo di furfurale è stato monitorato con rilevazione UV a due lunghezze d'onda: 280 nm, corrispondente al picco di assorbimento del furfurale, e 230 nm, a cui è possibile rilevare i suoi prodotti di trasformazione.

Dallo screening di 200 colonie ottenute per mutagenesi UV è emerso che 13 ceppi mostrano una resistenza al furfurale tale da consentire una crescita superiore a quella del wild-type. Tuttavia, nessuno di questi ha evidenziato una migliore capacità di produrre xilitolo in presenza di furfurale rispetto al wild-type. La capacità produttiva dei mutanti non è comunque andata persa: almeno 5 di essi hanno mostrato, in assenza di furfurale, una produzione di xilitolo paragonabile, se non superiore, a quella del wild-type. Alla luce di questi risultati, è stato scelto come ceppo migliore P8-12, che si è rivelato il più rapido nella produzione di xilitolo in presenza di furfurale, ed è stato sottoposto ad una nuova prova di mutagenesi, ma questa volta utilizzando un agente mutageno.

4.7 MUTAGENESI CHIMICA CON ETIL-METANSULFONATO

Le prove di mutagenesi chimica sono state svolte con l'agente mutageno etil-metansulfonato (EMS), un composto dello zolfo cancerogeno, che può essere particolarmente nocivo se ingerito ed è irritante per occhi e pelle. L'EMS agisce come agente alchilante alchilante sul DNA del lievito, inducendo mutazioni puntiformi casuali (Holman et al., 2026).

Sono state condotte quattro prove di mutagenesi chimica, variando la concentrazione di EMS e il tempo di esposizione, con l'obiettivo di migliorare il protocollo di selezione.

Da letteratura (Winston F.,2008) viene utilizzata una concentrazione di EMS di 20 mM di EMS per 1.5 - 2 mL di sospensione cellulare del ceppo desiderato in fase esponenziale avanzata, concentrata 1×10^8 cellule/mL, per tempi successivi da 20 a 60 minuti.

Pertanto, una prima prova è stata condotta con due differenti concentrazioni di EMS per testare un range un po' più ampio di concentrazioni: 2 mM e 50 mM di mutageno sono stati messi a contatto con il ceppo P8-12**,** risultato essere interessante sia dalle prove di screening

post-mutagenesi UV sia dalle prove di produzione in presenza di furfurale, per intervalli di 10 minuti fino ad un'ora. La concentrazione cellulare di partenza presentava 1×10^{9} cellule/mL.

Dopo 24h di incubazione, tutte le piastre, sia quelle su cui è stato spatolato il lievito trattato con 2 mM di EMS sia quelle con 50 mM, hanno formato una patina identica, senza alcuna possibilità di poter distinguere e quindi isolare colonie. L'ipotesi che è stata fatta è che le cellule iniziali fossero troppo concentrate e che quindi una considerevole parte di queste sia sopravvissuta al trattamento, anche a tempi più lunghi di contatto con l'EMS. Una seconda possibilità potrebbe essere invece legata alle concentrazioni di agente mutageno, esigue rispetto alla concentrazione cellulare impiegata. Una seconda possibilità potrebbe essere invece legata alle concentrazioni di agente mutageno, esigue rispetto alla concentrazione cellulare impiegata.

Per tale ragione, per l'allestimento di una seconda prova sono stati modificati alcuni parametri: in particolare, i tempi di esposizione sono stati estesi a intervalli di 30 minuti fino a 2 ore, mantenendo un'unica concentrazione di EMS pari a 50 mM. La concentrazione cellulare è stata mantenuta la stessa (10^9).

Rispetto alla prima prova, è stato possibile distinguere singole colonie anziché una patina continua. Tuttavia, non sono emerse differenze apprezzabili tra le diverse diluizioni della coltura spatolata sulle piastre. Le colonie visibili erano piccole e rade.

Con l'allestimento di una terza prova di mutagenesi si è puntato ad aumentare significativamente la concentrazione di EMS, portandolo nuovamente a due differenti concentrazioni: 250 mM e 500 mM. I tempi utilizzati sono stati mantenuti ad intervalli di 30 minuti, ma questa volta fino a 1 ora e 30, accorciando di mezz'ora il tempo finale prelevato. Questa volta anche le concentrazioni cellulari sono state diminuite di un ordine di grandezza, riportandole a quelle protocollari di 1×10^{8} cellule/mL. Ancora, la prova non ha fornito alcun risultato degno di nota, ma ha permesso di identificare un possibile range di concentrazione e tempi di esposizione che permettesse di osservare un risultato più solido rispetto alle prove precedenti.

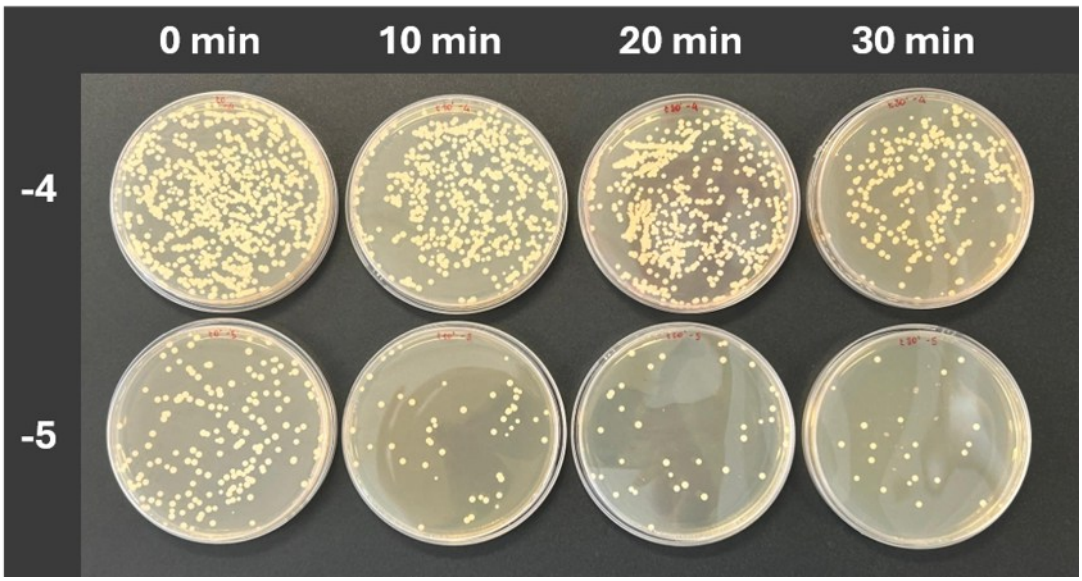


Figura 4.15: Mutagenesi chimica IV. Piastre di YPX a due differenti concentrazioni cellulari, 10^{-4} e 10^{-5}, del ceppo P8-12 a contatto per tempi successivi con 200mM di EMS.

La quarta ed ultima prova di mutagenesi è stata svolta per tempi successivi a partire da 10 minuti fino ad arrivare ai 30 minuti. Le concentrazioni di EMS sono state selezionate entro un range di quelle precedentemente testate, ossia 100 mM e 200 mM. La concentrazione cellulare di partenza era sempre di 1×10^{8} cellule/mL. Tale metodica si è rivelata essere quella più fruttuosa; il numero di colonie contato sulle piastre è risultato essere proporzionale alla concentrazione cellulare della sospensione piastrata: a minori diluizioni, sono state osservate un maggior numero di colonie.

Nella *Figura 4.15* sono mostrate le piastre presentanti le due diluizioni maggiori, 10^{-4} e 10^{-5}, le quali consentono di intravedere un certo andamento della mortalità cellulare direttamente legato ai tempi di esposizione all'agente mutageno alla concentrazione di 200 mM.

Le piastre su cui sono state seminate le cellule trattate con 100 mM di EMS, invece, non presentavano un andamento degno di nota, complice probabilmente la ancora troppo scarsa concentrazione di mutageno o l'elevata concentrazione delle cellule di partenza.

		Tempo			
		0 min	10 min	20 min	30 min
Diluizioni	-4	793	546	480	256
	-5	177	49	38	29

Tabella 4.3: Conta delle colonie alle diluizioni di 10^{-4} e 10^{-5} a 0 min (controllo positivo, privo di mutageno), 10 min, 20 min e 30 min.

Dai dati emerge un aumento progressivo della mortalità cellulare all'aumentare del tempo di esposizione all'EMS. A entrambe le diluizioni il numero di colonie diminuisce in modo costante rispetto al controllo a 0 min: alla diluizione 10^{-4} si passa da 793 colonie a 546 dopo 10 min, 480 dopo 20 min e 256 dopo 30 min, mentre alla diluizione 10^{-5} si scende da 177 a 49, 38 e 29 colonie. Il calo è più rapido nei primi 10 min e prosegue poi più gradualmente, ma si mantiene sempre nella stessa direzione, a conferma dell'azione tossica dell'EMS, che con il prolungarsi del contatto comporta la morte di una frazione sempre maggiore della popolazione. Nessuna delle due diluizioni risulta quindi ottimale per tutti i punti: considerando che le conte sono più attendibili tra 30 e 300 colonie per piastra, la diluizione 10^{-5} è più adatta per i tempi brevi, mentre la 10^{-4} lo è per i tempi lunghi. Tuttavia, anche dopo 30 min un numero ancora consistente di cellule risulta vitale, il che è in linea con quanto osservato anche nelle piastre trattate con 100 mM di EMS e con l'ipotesi che la concentrazione di mutageno fosse ancora troppo bassa, o la densità cellulare di partenza troppo elevata, per ottenere un effetto mutageno più marcato.

Dall'ultimo ciclo di mutagenesi chimica del ceppo P8-12 sono state selezionate 8 colonie di particolare interesse, sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche rispetto al ceppo parentale. Tali colonie saranno oggetto di ulteriori studi futuri, al fine di caratterizzare più a fondo le prestazioni e di individuare i mutanti più promettenti.

5. CONCLUSIONI

Le biomasse lignocellulosiche costituiscono una risorsa di carbonio abbondante e rinnovabile che non entra in competizione con la produzione alimentare. Il loro interesse deriva soprattutto dall'elevato contenuto di zuccheri, che possono essere recuperati e valorizzati mediante processi biotecnologici. Tuttavia, i pretrattamenti necessari a rendere accessibili tali zuccheri portano alla formazione di composti furanici, tossici per numerosi microrganismi, che rappresentano un ostacolo all'impiego degli idrolizzati come substrati di fermentazione.

Lo scopo di questo lavoro era individuare, mediante mutagenesi casuale, mutanti di *Pichia fermentans* WC 1507 in grado di produrre xilitolo anche in presenza di furfurale, così da rendere utilizzabile il *black liquor*, una fonte di xilosio ottenuta da trattamenti *organoslv*. I risultati ottenuti confermano il grande potenziale del ceppo che, in terreno con 120 g/L di xilosio puro, ha prodotto circa 60 g/L di xilitolo, ma ne mettono anche in evidenza un importante limite. Il ceppo risulta infatti inibito dalle sostanze contenute nel black liquor e non è stato in grado di crescere e produrre xilitolo su questa matrice. Le prove di minima concentrazione inibente hanno mostrato che furfurale e 5 idrossimetil-furfurale (5-HMF) allungano molto la fase lag e rallentano e riducono la crescita in modo dipendente dalla dose. Sebbene una concentrazione di 1 g/L di furfurale sia stata permissiva per la crescita, ha ridotto la produzione di xilitolo a circa un sesto rispetto al controllo. Questo dato indica che la tolleranza all'inibitore, intesa come capacità di crescere, non coincide con la capacità di realizzare la bioconversione. L'ipotesi più verosimile, coerente con quanto riportato in letteratura, è che il potere riducente della cellula venga in parte dirottato verso la detossificazione del furfurale, a scapito della riduzione dello xilosio a xilitolo.

È interessante osservare come *P. fermentans* WC 1507 sia risultato capace di trasformare completamente il furfurale nelle prime 24 h di incubazione, trasformandolo in un metabolita, presumibilmente acido 2-furoico, la cui identificazione è tutt'ora in corso e che evidentemente presenta anch'esso una certa tossicità.

In assenza di strumenti genetici per il miglioramento mirato di *P. fermentans*, il ceppo è stato sottoposto a mutagenesi casuale, dapprima mediante irraggiamento UV e successivamente mediante esposizione a etil-metansulfonato. La mutagenesi UV, seguita da una serie di screening delle colonie ottenute, si è rivelata efficace nel generare variabilità e nel selezionare ceppi capaci di crescere in presenza di furfurale: dalle circa 200 colonie isolate si è arrivati,

attraverso le diverse fasi di selezione, a 13 mutanti di interesse che presentavano una capacità di crescita migliore rispetto al wild-type anche in presenza di 2 g/L di furfurale.

La crescita in piastra multipozzetto ha permesso di parallelizzare le prove di crescita dei mutanti e di restringere il numero di candidati, che sono stati confermati nella crescita in tubo, metodica risultata più accurata anche se più laboriosa. Infine, un ulteriore metodo di screening, basato sulle diluizioni su piastra *Petri,* si è dimostrato utile perché ha consentito di restringere ulteriormente la selezione a 13 mutanti soltanto.

Le prove condotte in assenza di furfurale hanno mostrato che alcuni mutanti crescevano meglio del wild-type, sia in termini di resa sia di velocità. In alcuni ceppi un miglioramento analogo è stato osservato anche nella produzione di xilitolo. Tuttavia, in presenza di furfurale, il miglioramento della crescita non si è tradotto in un aumento della produzione di xilitolo: nessuno dei mutanti ha superato in modo netto il wild-type in queste condizioni, registrando concentrazioni inferiori rispetto ai 9.82 g/L del ceppo parentale.

Dal punto di vista della produttività del ceppo in presenza di inibitore, l'esito della mutagenesi UV non è stato quindi soddisfacente. Per questo motivo si è proceduto a sottoporre a mutagenesi chimica, mediante esposizione a etil-metansulfonato (EMS), il ceppo P8-12. Tale ceppo, ottenuto dalla mutagenesi UV, è stato selezionato poiché presentava una crescita accelerata rispetto al wild-type in presenza di furfurale. Inoltre, la sua produzione di xilitolo, sebbene non migliore di quella del wild-type, risultava anch'essa accelerata rispetto agli altri mutanti UV.

La mutagenesi chimica con EMS ha richiesto diverse prove di messa a punto, che hanno permesso di individuare condizioni operative adeguate (200 mM di EMS, tempi di esposizione fino a 30 minuti e 10^8 cellule/mL) alle quali la mortalità cresce in modo progressivo con il tempo di contatto. Le prove preliminari hanno altresì mostrato quanto sia critico il rapporto tra concentrazione di mutageno e densità cellulare: con 10^9 cellule/mL anche concentrazioni elevate di EMS non hanno permesso di distinguere singole colonie. Anche dopo 30 minuti, tuttavia, una frazione consistente di cellule è rimasta vitale: ciò suggerisce che esistano ancora margini per aumentare la pressione mutagena. Dall'ultima mutagenesi chimica di P8-12 sono stati selezionati 8 ceppi di particolare interesse, i quali saranno oggetto di studi ulteriori.

Per quanto riguarda le prospettive, il passo immediato sarà rivalutare questi 8 ceppi per la tolleranza al furfurale e, successivamente, per la produzione di xilitolo in presenza dell'inibitore, confrontandoli con il wild-type e con P8-12. Sarà utile affiancare a queste prove

l’analisi dei metaboliti del furfurale, per verificare se un eventuale miglioramento sia legato a una detossificazione più rapida e se questa avvenga senza sottrarre potere riducente alla produzione di xilitolo. Nel complesso, pur non avendo ancora ottenuto mutanti con una produttività migliorata in presenza di furfurale, questo lavoro ha definito un percorso sperimentale completo di mutagenesi e screening, utilizzabile per i successivi sviluppi. Se la sola mutagenesi non fosse sufficiente, i risultati suggeriscono di considerare strategie complementari, come una fase di detossificazione del *black liquor* o l’adattamento del lievito all’inibitore, prima di passare a prove sul substrato reale.

6. BIBLIOGRAFIA

Almeida, J. R. M., Modig, T., Röder, A., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2008). *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels, 1*, Article 12. https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-12

Banerjee, N., Bhatnagar, R., & Viswanathan, L. (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 11*, 226–228. https://doi.org/10.1007/BF00505872

Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2009). Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels, 2*, Article 9. https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-9

Britannica Editors. (2019, 25 settembre). *Furfural*. In *Encyclopaedia Britannica*. Recuperato il 28 agosto 2026, da https://www.britannica.com/science/furfural

Caputo, L., Quintieri, L., Baruzzi, F., Borcakli, M., & Morea, M. (2012). Molecular and phenotypic characterization of *Pichia fermentans* strains found among Boza yeasts. *Food Research International, 48*(2), 755–762. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.019

Carvalho, W., Santos, J. C., Canilha, L., Almeida e Silva, J. B., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M., & Silva, S. S. (2004). A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. *Process Biochemistry, 39*(12).

de Albuquerque, T. L., da Silva, I. J., de Macedo, G. R., & Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry, 49*(11), 1779–1789. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.010

Delgado Arcaño, Y., Valmaña García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A., & Magalhães Pontes, L. A. (2018). Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060

Eseyin, A. E., & Steele, P. H. (2015). An overview of the applications of furfural and its derivatives. *International Journal of Advanced Chemistry, 3*(2), 42–47.

Espinoza-Acosta, J. L. (2020). Biotechnological production of xylitol from agricultural waste. *Biotecnia, 22*(1), 126–134. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1160

European Commission. (2020). *A new Circular Economy Action Plan: For a cleaner and more competitive Europe* (COM(2020) 98 final). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Brussels. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020DC0098

Gandolfi, S., Ottolina, G., Consonni, R., Riva, S., & Patel, I. (2014). Fractionation of hemp hurds by organosolv pretreatment and its effect on production of lignin and sugars. *ChemSusChem, 7*(7), 1991–1999. https://doi.org/10.1002/cssc.201301396

Gautam, D., Rana, V., Sharma, S., Walia, Y. K., Kumar, K., Umar, A., Ibrahim, A. A., & Baskoutas, S. (2025). Hemicelluloses: A review on extraction and modification for

various applications. *ChemistrySelect, 10*, Article e06050. https://doi.org/10.1002/slct.202406050

Holman, D. E., Abrahams, A. I., Hattingh, K., Saulse, C., Hess, M., Stegmann, D., Roomanay, M., Basson, G., Klein, A., & Keyster, M. (2026). Ethyl methanesulfonate mutagenesis in fungi: Genetic mechanisms, applications, and implications for agricultural biotechnology. *Archives of Microbiology, 208*(7), Article 341. https://doi.org/10.1007/s00203-026-04858-x

Jensen, C., Rodriguez Guerrero, J., Karatzos, S., Olofsson, G., & Iversen, S. (2017). Fundamentals of Hydrofaction™: Renewable crude oil from woody biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery, 7*. https://doi.org/10.1007/s13399-017-0248-8

Jilani, S. B., & Olson, D. G. (2023). Mechanism of furfural toxicity and metabolic strategies to engineer tolerance in microbial strains. *Microbial Cell Factories, 22*(1), Article 221. https://doi.org/10.1186/s12934-023-02223-x

Kayalvizhi, R., & Jacob, S. (2026). Ultraviolet mutagenesis and tolerance adaptive laboratory evolution of *Pichia fermentans* modulate the membrane-bound xylose uptake transporter genes for enhanced xylitol production. *Systems Microbiology and Biomanufacturing, 6*, Article 96. https://doi.org/10.1007/s43393-026-00494-0

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, 73*(4), 331–371. https://doi.org/10.1023/A:1001761008817

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., & Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research, 8*(6), 939–954. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x

Li, Z., Waghmare, P. R., Dijkhuizen, L., Meng, X., & Liu, W. (2024). Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass. *Engineering Microbiology, 4*(2), Article 100139. https://doi.org/10.1016/j.engmic.2024.100139

López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2018). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology, 247*, 736–743. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139

Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J. H., & Hu, C. (2019). The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catalysis Today, 319*, 14–24. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042

Mordor Intelligence. (2025). *Xylitol market size & share analysis: Growth trends & forecasts (2025–2030)*. https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/xylitol-market

National Center for Biotechnology Information. (s.d.). *Taxonomy browser: Pichia fermentans* (Taxonomy ID: 53655). NCBI. Recuperato il 31 luglio 2026, da https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=53655

Pan, X., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D., & Saddler, J. (2006). Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an

organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering, 94*(5), 851–861. https://doi.org/10.1002/bit.20905

Pfützner, A., Demircik, F., Sachsenheimer, D., Spatz, J., Pfützner, A. H., & Ramljak, S. (2017). Impact of xylose on glucose-dehydrogenase-based blood glucose meters for patient self-testing. *Journal of Diabetes Science and Technology, 11*(3), 577–583.

Prabhu, A. A., Bosakornranut, E., Amraoui, Y., Agrawal, D., Coulon, F., Vivekanand, V., Thakur, V. K., & Kumar, V. (2020). Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated *Pichia fermentans*. *Biotechnology for Biofuels, 13*(1), Article 209. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01845-2

Raimondi, S., Ranieri, R., Leonardi, A., Ottolina, G., Rossi, M., & Amaretti, A. (2023). Hemp biomass pretreatment and fermentation with non-*Saccharomyces* yeasts: Xylose valorization to xylitol. *Chemical Engineering Transactions, 99*, 97–102. https://doi.org/10.3303/CET2399017

Ranieri, R., Candeliere, F., Moreno-García, J., Mauricio, J. C., Rossi, M., Raimondi, S., & Amaretti, A. (2024). Fermentative processes for the upcycling of xylose to xylitol by immobilized cells of *Pichia fermentans* WC1507. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 12*, Article 1339093. https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1339093

Ren, J.-L., Peng, F., Sun, R.-C., & Kennedy, J. F. (2009). Influence of hemicellulosic derivatives on the sulfate kraft pulp strength. *Carbohydrate Polymers, 75*(2), 338–342. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.011

Schoch, C. L., et al. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database, 2020*, Article baaa062. https://doi.org/10.1093/database/baaa062

Segers, B., Nimmegeers, P., Spiller, M., Tofani, G., Jasiukaitytė-Grojzdek, E., Dace, E., Kikas, T., Marchetti, J. M., Rajić, M., Yildiz, G., & Billen, P. (2024). Lignocellulosic biomass valorisation: A review of feedstocks, processes and potential value chains and their implications for the decision-making process. *RSC Sustainability, 2*(12), 3730–3749. https://doi.org/10.1039/d4su00342j

Shrivastava, A., Pal, M., & Sharma, R. K. (2023). *Pichia* as yeast cell factory for production of industrially important bio-products: Current trends, challenges, and future prospects. *Journal of Bioresources and Bioproducts, 8*(2), 108–124. https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.01.007

Silva, D. D. V., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M., Luchese, R. H., & Silva, S. S. (2004). Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Brazilian Journal of Microbiology, 35*(3), 248–254. https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200014

Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., & Vassileva, C. G. (2010). An overview of the chemical composition of biomass. *Fuel, 89*(5), 913–933. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022

Wierckx, N., Koopman, F., Ruijssenaars, H. J., & de Winde, J. H. (2011). Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(6), 1095–1105. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3632-5

Winston, F. (1990). Mutagenesis of yeast cells. *Current Protocols in Molecular Biology, 12*, 13.3.1–13.3.4. https://doi.org/10.1002/j.1934-3647.1990.tb00202.x

Winston, F. (2008). EMS and UV mutagenesis in yeast. *Current Protocols in Molecular Biology, 82*, Unit 13.3B. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1303bs82

Xilosio. (s.d.). My-personaltrainer.it. https://www.my-personaltrainer.it/salute/xilosio.html