

Poliidrossialcanoati

polimeri biodegradabili del futuro?

(prima parte)

di Marco Valera

I polimeri biosintetici dei 3 (R-) idrossiacidi rivestono particolare interesse per le loro proprietà chimiche, fisiche, meccaniche e di biodegradabilità. Le ipotesi più realistiche relative ai potenziali consumi dei poliidrossialcanoati riguardano in prima istanza settori specialistici, dove faccia premio il complesso delle suddette proprietà. Nella seconda parte dell'articolo saranno illustrati i tentativi di riduzione dei costi di produzione facendo ricorso alla biosintesi in piante.

I poliidrossialcanoati (PIA) sono macromolecole sintetizzate da più di 90 generi di batteri gram+ e gram- (ad esempio *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes/Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*).

In condizioni di coltura appropriate, ed in particolare in carenza di qualche nutriente (ad esempio N, P, S), i poliidrossialcanoati si accumulano nel batterio sotto forma di granuli ($\phi \approx 0,5 \mu\text{m}$), fino ad una concentrazione che può raggiungere il 90% del peso secco della massa batterica.

Si ritiene che la funzione svolta da questi materiali ad alto peso molecolare sia principalmente quella di accumulo di carbonio e di potere riducente. È stata anche avanzata l'ipotesi di un loro possibile coinvolgimento nelle strutture di membrana preposte allo scambio di ioni con l'ambiente.

I principali tipi di poliidrossialcanoati finora identificati sono poliesteri lineari testa-coda, composti da monomeri appartenenti al gruppo dei $\beta/3$ (R-) idrossiacidi (in molto minor misura anche γ , δ , ϵ (R-) idrossiacidi).

La chiralità dei monomeri (solo eccezionalmente assente) dà origine a polimeri dotati di regolarità sterica. Lo schema sintetico di polimerizzazione è riportato nella Figura 1.

Il gruppo laterale R in posizione β (3) è un alchile con $C=1-13$, che può essere lineare o ramificato, saturo o insaturo, epossidato, con sostituenti aromatici o alogenati.

Si usa distinguere poliidrossialcanoati a catena laterale corta

($R=CH_3, C_2H_5$)

e a catena laterale media

($C_3H_7-C_{13}H_{27}$).

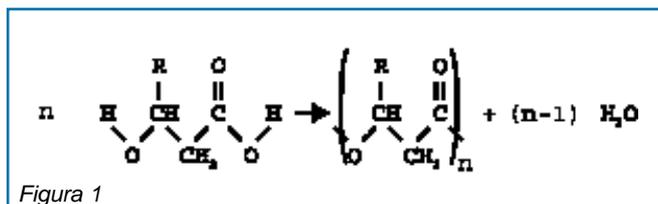


Figura 1

La composizione precisa dei poliidrossialcanoati dipende dal tipo di batterio da cui sono sintetizzati e dal mezzo di coltura.

Per la sintesi dei poliidrossialcanoati i diversi tipi di batteri utilizzano monomeri provenienti da percorsi metabolici diversi.

I batteri del gruppo *Ralstonia* producono poliidrossialcanoati a catena laterale corta, mentre quelli del tipo *Pseudomonas* producono poliidrossialcanoati a catena laterale media.

I batteri che producono polimeri a catena laterale corta utilizzano come monomeri l'acetil-CoA, l'esenoil-CoA, il crotonil-CoA (dal processo di degradazione degli acidi grassi), il metilmalonil-CoA.

Per la produzione di poliidrossialcanoati a catena laterale media, i monomeri più ricorrenti sono quelli derivati dalla β ossidazione di acidi grassi (3 idrossiacil-CoA di acidi con $C \leq 16$).

L'estrema variabilità della natura chimica delle catene laterali è alla base di una notevole varietà di proprietà dei poliidrossialcanoati (si va da polimeri tipicamente termoplastici, quale il poliidrossibutirrato, a gomme quale il poliidrossiottanoato) e di possibilità di interventi chimici secondari (ad esempio reticolazioni). La massa molecolare dei polimeri sintetizzati dai batteri varia da $5 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^6$ Da.

Una descrizione della struttura chimica dei principali poliidrossialcanoati prodotti in natura è riassunta nella Tabella 1.

Un elenco più completo dei circa 100 monomeri finora individuati si trova in [1]. Storicamente il poli β (R-) idrossibutirrato è il poliidrossialcanoato che è stato più studiato sia dal punto



Tabella 1 - Struttura chimica dei principali polioidrossialcanoati prodotti in natura

	<i>n</i> =1	<i>n</i> =2	<i>n</i> =3	<i>n</i> =4
R=H	poli (3-idrossipropionato)	poli(4-idrossibutirrato)	poli(5-idrossivalerato)	
R=CH ₃	poli (3-idrossibutirrato)	poli (4-idrossivalerato)	poli (5-idrossiesanoato)	
R=C ₂ H ₅	poli (3-idrossivalerato)			
R=C ₃ H ₇	poli (3-idrossiesanoato)			
R=C ₅ H ₁₁	poli (3-idrossiottanoato)			
R=C ₆ H ₁₃				poli (6-idrossidodecanoato)
R=C ₉ H ₁₉	poli (3-idrossidodecanoato)			

n = numero di CH₂ nella catena lineare

di vista dei meccanismi di sintesi biologica sia da quello delle proprietà e impieghi.

Il polioidrossibutirrato

Il polioidrossibutirrato era stato individuato nel 1926 da Lemoigne all'Istituto Pasteur come costituente del microrganismo *Bacillus Megaterium*.

Da allora sono stati individuati molti altri polioidrossialcanoati, che inizialmente erano studiati soprattutto in relazione all'approfondimento dei processi metabolici del microrganismo di provenienza, alla funzione da essi svolta nel contesto della cellula batterica e alla possibilità di utilizzarli a scopo tassonomico. Un forte interesse di tipo tecnologico a questi polimeri nacque negli anni settanta in funzione della possibilità di disporre di materiali polimerici sostitutivi delle poliolefine, sia in relazione alla crisi petrolifera, che faceva ritenere prossima la fine delle scorte, sia in relazione alla crescente avversione di gruppi ecologisti e dell'opinione pubblica nei confronti di prodotti ritenuti fonte di inquinamento ambientale.

Superato il timore dell'esaurimento delle scorte, rimase invece aperto e sempre più marcato il problema dell'inquinamento. Un aspetto particolarmente preoccupante dell'inquinamento consiste nello smaltimento dei materiali plastici, che ad esempio negli Stati Uniti rappresentano il 20% in volume dei rifiuti solidi urbani.

Si cercavano cioè polimeri in grado di sostituire quelli di origine petrolchimica dal punto di vista delle proprietà e impieghi, senza presentare il collaterale problema ecologico: cioè polimeri biodegradabili. La definizione di polimeri biodegradabili secondo Iso recita: "polimeri progettati per andare incontro a cambiamenti di struttura chimica, ad opera di organismi viventi come batteri, funghi, alghe, che hanno come risultato la perdita di alcune proprietà".

I polimeri biodegradabili facevano registrare nel 1998 una domanda di circa 18 mila tonnellate (Stati Uniti+Europa occidentale+Giappone), per un valore compreso tra 90 e 100 milioni di dollari.

Le previsioni di consumo dei polimeri biodegradabili fanno stimare una crescita annua maggiore del 35% nel periodo 1998-2003.

Fra i polimeri biodegradabili figurano: i polimeri a base di amido, i polilattidi, i polilattoni (fondamentalmente come componenti dei polimeri a base di amido), i poliesteri alifatici/aromatici di policondensazione di un biacido con un bialcool e i polioidrossialcanoati.

I polioidrossialcanoati hanno per ora fatto registrare consumi modesti, nonostante il loro insieme di interessanti proprietà, a causa del prezzo elevatissimo (superiore a 15\$/Kg). Vedremo in seguito i tentativi fatti per ridurre i costi di produzione ricorrendo a soluzioni diverse.

Proprietà

Il polioidrossibutirrato estratto con cloroformio da colture batteriche cresciute su carboidrati è stato accuratamente caratterizzato sia sotto il profilo chimico-fisico, sia sotto il profilo delle proprietà meccaniche e di lavorabilità. Per la maggior parte i dati riportati si riferiscono al prodotto commerciale Biopol (Zeneca/Monsanto).

Si tratta di un polimero termoplastico, isotattico, ortorombico, ad elevata cristallinità, otticamente attivo, con una massa molecolare di circa 0,5·10⁶ Da (polidispersità espressa come M_w/M_n≅1,8). La cristallinità del polimero, così come sintetizzato

Tabella 2 - Proprietà fisico-meccaniche

	<i>PHB</i>	<i>PHB/HV_{20%}</i>	<i>PP</i>
Densità (g/cm ³)	-	1,25	0,90
Tg (°C)	+15	-1	-10
Tf (°C)	175	145	176
Cristallinità (%)	80	42	70
Resistenza a trazione (Mpa)	40	30	38
Allungamento a rottura (%)	8	50	40
Resistenza a flessione (Gpa)	3,5	1,0	-
Resistenza all'urto Izod-n. (J/m)	60	300	100
Costante dielettrica a 1 MHz	3	3	-
Resistività (ohm-cm)	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶	≥10 ¹⁶
Temperatura superiore di impiego (°C)	130	99	135
<i>Resistenza chimica</i>			
Acidi	1	1	4
Alcali	1	1	4
Alcoli	2	2	4
Oli e grassi	3	3	2/3
Resistenza agli UV	2	2	1

Tg=temperatura di transizione vetrosa; *Tf*=temperatura di fusione; *Resistenza chimica e agli UV*: 1=scarsa, 2=discreta, 3=buona, 4=ottima; *PHB*=polioidrossibutirrato; *PHB/HV*=copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato; *PP*=polipropilene.

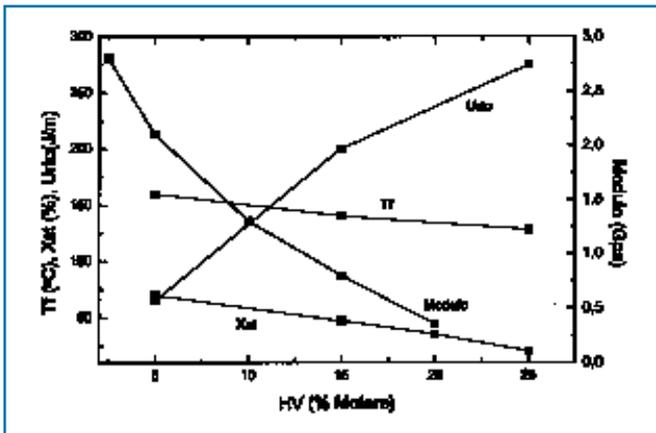


Figura 2 - Proprietà in funzione della % molare di idrossivalerato (HV). Tf=temperatura di fusione; Xst=cristallinità; Urtc=zod-notched; Modulo=a flessione

dai batteri, è inferiore a quella che si misura dopo estrazione. È stata in proposito avanzata l'ipotesi che nel contesto batterico le molecole polimeriche siano allo stato plastificato ad opera di fluidi cellulari o si trovino in equilibrio tra due forme: la forma chetonica e la forma enolica [2, 2a].

Le proprietà fisico-meccaniche sono riportate in Tabella 2. Come risulta dalla Tabella 2, il poli-idrossibutirrato è per molti aspetti simile al polipropilene, ma a differenza di questo ha una temperatura di transizione vetrosa (Tg) troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa. Inoltre, la temperatura di fusione è molto vicina a quella di degradazione, il che rende problematica, se non impossibile, la lavorazione con le tecniche convenzionali in uso per i polimeri termoplastici.

È stato peraltro possibile ottenere, con modalità che vedremo successivamente, copolimeri con idrossivalerato a disposizione casuale. Come mostra la Tabella 2, il copolimero con il 20% di idrossivalerato possiede un insieme di proprietà che complessivamente consentono ancora di affiancarlo al polipropilene e nel contempo riducono il problema della fragilità e della lavorabilità. La temperatura di degradazione termica dei copolimeri rimane, infatti, uguale a quella degli omopolimeri, mentre la temperatura di fusione diminuisce, senza peraltro scendere al di sotto di valori che ne limitino significativamente gli impieghi.

Variando le percentuali molarie di comonomero, è possibile modificare le proprietà in un campo abbastanza ampio (Figura 2). Ciò consente di mettere sul mercato prodotti adattati alle varie esigenze.

In accordo con le previsioni suggerite dalla biologia, il poli-idrossibutirrato (così come il suo copolimero con idrossivalerato) è risultato essere un polimero altamente biodegradabile.

Parecchi microrganismi (batteri, funghi) presenti nel terreno, negli scarichi urbani e industriali, negli estuari dei fiumi, possono degradare extracellularmente il poli-idrossibutirrato e i suoi copolimeri. Allo scopo sono provvisti di opportuni enzimi di secrezione (depolimerasi) che aderiscono alle particelle di polimero e ne catalizzano la demolizione a molecole semplici idrosolubili. A loro volta queste molecole sono utilizzate dai microrganismi stessi nel loro metabolismo. I prodotti finali della demolizione biochimica sono risultati essere H_2O+CO_2 in ambiente aerobico e CO_2+CH_4 in ambiente anaerobico [3].

La biodegradabilità è stata misurata in ambienti diversi (aerobici e anaerobici) con metodologie diverse. I risultati sono riassunti nella Tabella 3.

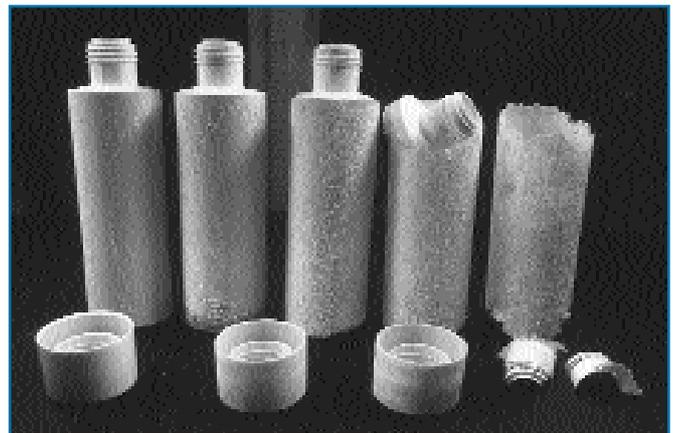


Figura 3 - Bottiglie soffiate di poli-idrossibutirrato dopo esposizione di 0, 2, 4, 6, 8 settimane. Figura gentilmente messa a disposizione da D. Jendrossek: Institut für Mikrobiologie Universität Stuttgart

La Figura 3 evidenzia lo stato di bottiglie soffiate di copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato dopo tempi diversi di esposizione a liquidi di scarico urbano in condizione aerobica.

Misure condotte in acque sterili hanno dimostrato che in queste condizioni il polimero è molto resistente all'idrolisi.

Il poli-idrossibutirrato ad elevato grado di purezza è inoltre risultato essere dotato di elevata biocompatibilità.

L'insieme delle proprietà del copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato suggerisce un'ampia gamma di possibili applicazioni, alcune di nicchia, altre di largo consumo:

- imballaggi (pellicole per sporte e sacchi, bottiglie soffiate, carta accoppiata);
- prodotti a perdere per l'igiene personale;
- prodotti per uso medico e chirurgico;
- posateria usa e getta;
- reti e corde per la pesca industriale.

Il copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato ha finora trovato prevalentemente applicazioni di nicchia, a causa del suo alto prezzo.

Alcuni impieghi di potenziale maggior consumo sono stati realizzati in contesti legislativi particolari, per applicazioni che richiedevano abbinamenti di buone caratteristiche meccaniche e assoluta biodegradabilità. Ad esempio la Wella (D) ha usato a partire dai primi anni novanta bottiglie per shampoo in Biopol. Per analoghi impieghi il Biopol ha fatto registrare discreti consumi in Giappone.

L'assegnazione a Grace & Co. di brevetti relativi al poli-idrossibutirrato nel 1962 e nel 1965 segna l'inizio del riconoscimento dell'importanza commerciale dei poli-idrossialcanoati.

Tabella 3 - Biodegradabilità di omo e copolimeri

Indice di biodegradabilità	Tempo richiesto
100% perdita in peso *	
- scarichi anaerobici	40-45 giorni
- scarichi aerobici	circa 1 anno
- suolo (interramento)	circa 1,5 anni
80% perdita in peso (compostaggio controllato)**	100 giorni
60% perdita in peso (interramento)**	280 giorni
Sviluppo CO_2 anaerobico (80%)	30 giorni

*Su provini di spessore 1 mm; **Su pellicole sottili

Successivamente, nel 1975 Ici iniziò a interessarsi alla sintesi batterica del copolimero idrossibutirrato/idrossivalerato. Ad essa subentrò Zeneca, che mise sul mercato il copolimero con il marchio commerciale Biopol. A Zeneca subentrò Monsanto, che, nell'intento di ridurre i costi di produzione, iniziò a studiare la produzione di polimeri da piante.

Contemporaneamente altre società industriali e numerosi centri di ricerca negli Stati Uniti, in Europa e in Giappone lavoravano all'ottimizzazione di processi e all'individuazione di nuove tecniche di produzione, sempre allo scopo di ridurre i costi.

Metabolix ha ottenuto numerosi brevetti relativi alla produzione di tipi diversi di poliidrossialcanoati.

Ultimamente, mentre Monsanto è uscita dal business, altre Industrie e Istituti di ricerca statunitensi ed europei stanno ancora lavorando all'ottimizzazione della produzione di poliidrossialcanoati da piante.

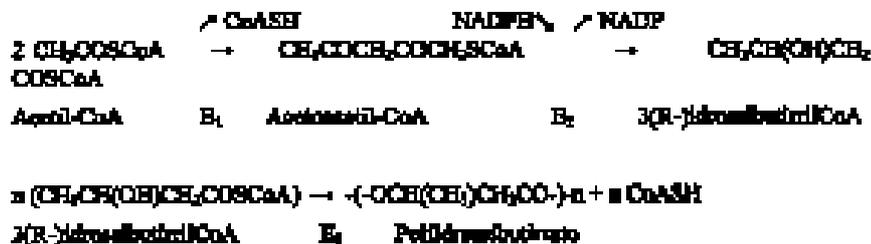
Nel contesto dei progetti Cordis della Comunità Europea, hanno dimostrato interesse ai poliidrossialcanoati varie organizzazioni di ricerca e industrie italiane.

La sintesi batterica

Il processo di sintesi batterica è stato approfonditamente studiato, sia utilizzando informazioni provenienti da vie metaboliche di specie diverse, sia operando in vitro, sia trasferendo i geni di *Ralstonia* in *Escherichia coli* [4, 5]. Quest'ultimo organismo offre il vantaggio di essere molto ben conosciuto dai biologi, sia sotto l'aspetto delle modalità ottimali di crescita, sia sotto l'aspetto della struttura delle sue principali vie metaboliche. Fra l'altro *Escherichia coli* non dispone di vie metaboliche di demolizione dei poliidrossialcanoati, il che consente di avere a disposizione dati di resa di polimerizzazione non alterati da contemporanei eventi di degradazione.

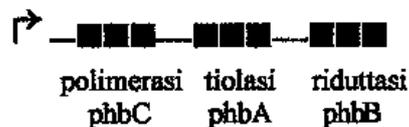
Nella maggior parte degli organismi finora studiati, il poli-idrossibutirrato è sintetizzato a partire dall'acetilcoenzima A (acetilCoA), attraverso una serie di tre reazioni catalizzate dagli enzimi:

- 3-chetotiolasi (acetilCoA acetiltrasferasi, EC 2.3.1.9)-E₁
- acetoacetilCoA riduttasi (idrossibutirrilCoA riduttasi, EC 1.1.1.36)-E₂
- poli(3idrossibutirrato polimerasi)-E₃



Il percorso indicato è sostanzialmente uguale in tutti i microrganismi studiati; le differenze possono riguardare l'origine delle molecole che entrano a far parte della via metabolica. I tre enzimi che presiedono alla sintesi del poliidrossibutirrato sono l'espressione di altrettanti diversi geni, che in *Ralstonia* e in molte altre specie batteriche si trovano associati nel genoma a costituire un "operone".

I singoli stadi della biosintesi del poliidrossibutirrato sono stati studiati approfonditamente solo per alcune specie batteriche [6, 7].



Il primo stadio della formazione di poliidrossibutirrato è catalizzato dalla β chetoacilCoA tiolasi, che presiede alla reazione reversibile di condensazione.



La chetotiolasi appartiene a una famiglia di enzimi che presiedono alla tiolisi di substrati vari, con la formazione di acilCoA+acetilCoA e intervengono sia nella demolizione degli acidi grassi che nella biosintesi dei corpi chetonici, degli isoprenoidi e dei poliidrossibutirrati.

Ralstonia possiede due tipi di chetotiolasi (A e B), delle quali la A (omotetramero 4x44 kD) è prevalentemente coinvolta nella sintesi di poliidrossibutirrato, mentre la B (omotetramero 4x46 kD) presiede sia alla degradazione degli acidi grassi sia alla produzione di idrossivalerato nella sintesi del copolimero.

La costante di equilibrio della reazione è espressa da:

$$K_{eq} = \frac{[\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COSCoA}][\text{CoASH}]}{[\text{CH}_3\text{COSCoA}]^2}$$

I valori di K_{eq} trovati sperimentalmente variano da 1,5x10⁻⁵ a 1,0x10⁻⁴ a seconda della temperatura e del pH di prova.

Da questi valori risulta evidente che all'equilibrio la reazione è molto spostata verso i reagenti, cioè nel senso opposto a quello utile per la sintesi. Tuttavia in fase di accumulo del polimero l'enzima catalizza la reazione in senso opposto a quello termodinamicamente favorito, se gli enzimi successivi (riduttasi e polimerasi) trascinano la reazione di sintesi sottraendo prodotto alla prima reazione.

Il meccanismo della chetotiolasi consiste in due semireazioni:

- 1^a semireazione: un sito attivo dell'enzima, contenente una funzionalità -SH di cisteina, si lega a una molecola di acetilCoA per formare un intermedio acetil-S-enzima
- 2^a semireazione: una seconda cisteina deprotona un'altra molecola di acetilCoA, dando origine a un intermedio acetilCoA⁺ attivato capace di legarsi all'acetil-S-enzima per formare acetoacetilCoA.

Si tratta di un classico meccanismo di reazione enzimatica "ping-pong" tipo Bi-Bi.

Il secondo stadio della biosintesi è catalizzato dall'acetilCoA riduttasi NADPH dipendente, che presiede alla reazione



La costante di equilibrio di questa reazione è

$$K_{eq} = \frac{[CH_3CH(OH)CH_2COSCoA][NADP^+]}{[NADPH][CH_3COCH_2COSCoA][H^+]}$$

I valori di K_{eq} variano da $4,6 \times 10^9$ a $16 \times 10^9 \mu M^{-1}$ e sono fortemente dipendenti dal pH.

Per un valore di $pH=7,2$ (valore mediamente osservato durante la fermentazione di *Ralstonia*) e una temperatura di $25^\circ C$ i valori di

$$K'_{eq} = K_{eq}/[H^+] = K_{eq}/10^{-7,2}$$

osservati variano da 290 a 1.010.

La forza trainante della reazione risiede nei livelli di disponibilità di equivalenti riducenti (NADPH). Gli equivalenti riducenti provengono da altri ambiti della rete metabolica complessiva del batterio.

La riduttasi di *Ralstonia* è attiva solo sul R (-) idrossibutirilCoA e pertanto la sua azione sull'acetoacetilCoA porta alla forma ridotta con la struttura sterica suddetta.

Chetotilasi e riduttasi forniscono la molecola substrato per la sintesi di poliidrossibutirrato ad opera dell'enzima polimerasi (conosciuto anche come sintasi). Nei batteri si trovano una polimerasi solubile e una polimerasi associata ai granuli di polimero in crescita. Quest'ultima è soprattutto presente nei microrganismi ad alto contenuto di polimero. In *Ralstonia* è stato rilevato sperimentalmente che, durante le prime fasi di crescita, è attiva la sintasi solubile, mentre nelle successive fasi, in carenza di un nutriente, è attiva principalmente la polimerasi insolubile associata ai granuli.

Le polimerasi di *Ralstonia* sono specifiche per la forma enantiomerica R (-) dell'idrossiacilCoA, per cui il polimero risulta stericamente ordinato.

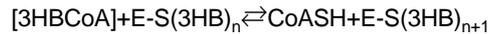
Sono state rilevate analogie tra la modalità di lavoro della polimerasi e quella della lipasi. In questo contesto è stata avanzata l'ipotesi che nel processo catalitico cui sovrintende la polimerasi siano coinvolti due gruppi -SH (cisteina), uno intrinseco alla struttura genica dell'enzima e l'altro come gruppo prostetico proveniente da modificazioni della struttura enzimatica successive alla produzione dell'enzima stesso (modificazioni post-traduzionali). Un gruppo -SH legherebbe la catena in crescita, mentre l'altro porterebbe l'unità monomerica che si aggiunge alla catena in crescita [8]. Il modello catalitico della polimerasi è quello di una catalisi covalente (transesterificazione acida), come rappresentato nella Figura 4.

Sempre sulla scorta delle analogie di attività tra polimerasi e lipasi, è stata elaborata l'ipotesi qui di seguito schematizzata (Figura 5) relativa alla formazione dei granuli di polimero.

Nella fase (a) ogni enzima genera e veicola una catena in crescita; nella fase (b) le catene di polimero coalescono, in forza della loro idrofobicità, a formare micelle submicroscopiche; nella fase (c) un ulteriore stadio del processo di polimerizzazione provoca un accrescimento delle micelle fino a dimensioni visibili al microscopio in contrasto di fase.

Questa ipotesi del meccanismo di crescita dei granuli polimerici consente di dare una ragionevole spiegazione del fatto che durante la sintesi del polimero non si trovano mai oligomeri di basso peso molecolare in crescita, liberi nel citosol batterico e quindi non si verificano i conseguenti effetti osmotici.

L'equilibrio per la reazione di polimerizzazione



potrebbe essere stimato sulla scorta dei valori di energia libera di formazione dei legami estere e tioestere. Poiché comunque in pratica il poliidrossibutirrato precipita, si può considerare la reazione come irreversibile.

Quando si progettano le condizioni di coltura per una ottimizzazione delle rese, devono essere tenute presenti le diverse esigenze di crescita dei ceppi batterici impiegati. A questo scopo si è ritenuto operativamente opportuno suddividere i batteri in due gruppi:

- gruppo di batteri che hanno bisogno di una fonte di Carbonio in eccesso e di una carenza di nutrienti (P,N,S) in una data fase della crescita per avviare la polimerizzazione (ad esempio *Ralstonia eutropha*, *Proteomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*);
- gruppo di batteri che non richiedono carenza di nutrienti essenziali e polimerizzano poliidrossialcanoati durante tutta la crescita (ad esempio *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli* transgenica).

Con i batteri del primo gruppo si fa ricorso spesso, ma non necessariamente, alla tecnica della coltura discontinua. Le colture sono fatte crescere fino a una data concentrazione in condizioni ottimali di nutrienti e poi è generata una situazione di carenza di un nutriente essenziale. In questa fase della coltura il numero di cellule batteriche rimane pressoché costante, mentre la concentrazione (g/litro coltura) cresce per effetto della produzione di poliidrossialcanoato.

In queste condizioni *Ralstonia eutropha*, il batterio normalmente impiegato per la produzione di poliidrossibutirrato e copoli-

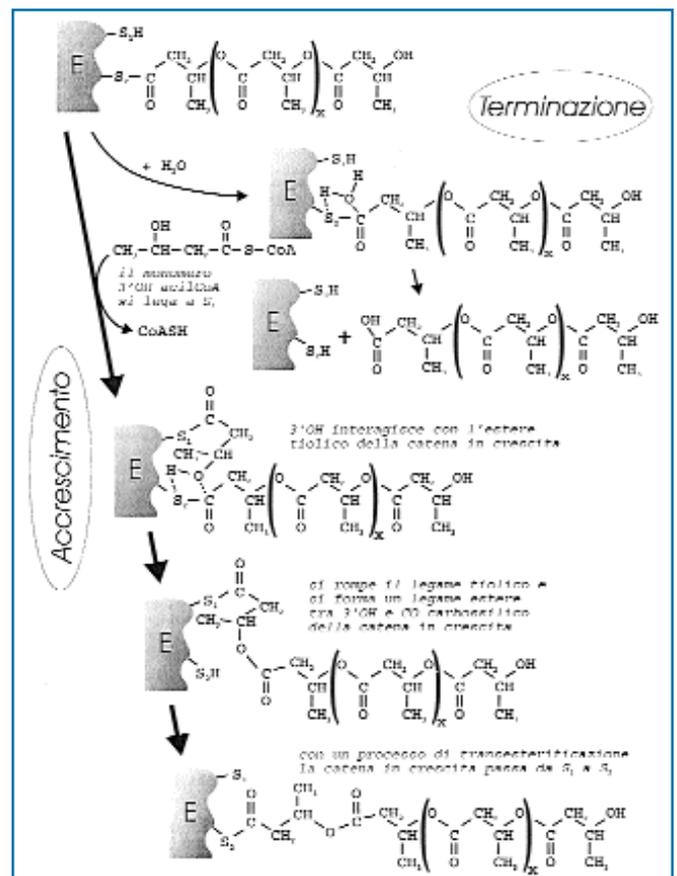


Figura 4 - Meccanismo catalitico della polimerasi

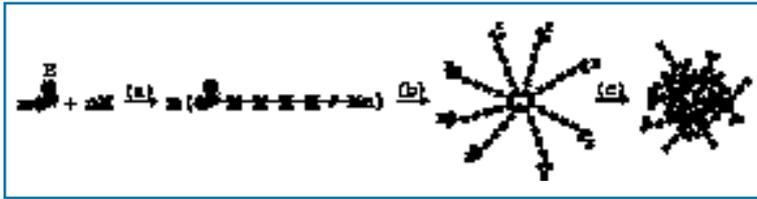


Figura 5 - Ipotesi di accrescimento dei granuli di polimero

mero idrossibutirrato/idrossivalerato, accumula polimero fino all'80% del suo peso secco. Lo stadio della crescita in cui si deve attuare la riduzione di un nutriente essenziale ha notevole influenza sulla resa di polimero, come evidenziato dalla Tabella 4, riferita a *Ralstonia* e ad azoto come nutriente limitante. La coltura discontinua dei batteri del secondo gruppo è molto più critica e richiede dosaggi di nutrienti in funzione della crescita più accurati.

Tabella 4 - Riduzione nutriente e resa in polimero

Stadio della crescita (cellule/ml x 10 ¹⁰)	Resa polimero (g/l)
3	71
5,5	92
7	121
9	circa 110

Sulle colture in continuo non sono disponibili molti dati. Sembrerebbe che la resa in polimero sia inferiore mentre aumenterebbe la produttività. Se nel mezzo di coltura è introdotto acido propionico in opportuna concentrazione (0,1% massimo), il batterio è in grado di assumere l'acido propionico e di farlo partecipare alla via metabolica di sintesi, con produzione di copolimero idrossibutirrato/ idrossivalerato.

Poiché un contenuto di propionato superiore allo 0,1% risulta tossico per *Ralstonia*, la sua somministrazione ai microrganismi fermentanti deve essere controllata con molta precisione.

Lo schema di sintesi del copolimero è riportato in Figura 6.

Lavorando in vitro o con *Escherichia coli*, alla quale erano stati conferiti, con opportuni accorgimenti, i geni per la produzione di poli-idrossibutirrato, sono state ottenute utili informazioni riguardanti l'effetto della polimerasi su peso molecolare e polidispersità del polimero. I risultati sperimentali disponibili starebbero ad indicare che il peso molecolare è inversamente proporzionale alla concentrazione di enzima (polimerasi).

Sono stati condotti studi molto dettagliati sulle condizioni di crescita fermentativa di *Ralstonia*. Nella fermentazione discontinua su glucosio sono state raggiunte produttività di 2,42 g/litro-ora in condizioni di azoto limitante e di 3,14 g/litro-ora in condizioni di fosforo limitante con rese di 0,3 kg polimero/ kg glucosio. Una volta raggiunta la concentrazione ottimale di batteri nel mezzo di coltura e di polimero nei batteri, si blocca per shock termico il processo biosintetico (si ha contemporaneamente lisi cellulare), si concentra la sospensione e si procede al recupero e purificazione del polimero per estrazione. Inizialmente sono stati impiegati per il recupero solventi clorurati. Per la produzione del polimero

commerciale Biopol, Ici aveva messo a punto un processo (brevetto europeo 124309 del luglio 1983) basato su una preventiva estrazione di lipidi e fosfolipidi mediante reflusso a caldo con metanolo. A questo stadio faceva seguito un'estrazione, sempre a caldo, con cloroformio o cloruro di metilene. La soluzione era poi sottoposta a filtrazione per eliminare i prodotti in sospensione; il polimero era poi precipitato per raffreddamento ed essiccato sotto vuoto. Successivamente, allo scopo

di ridurre la complessità del processo (necessità di recupero del solvente) e quindi di ridurre i costi, sono stati utilizzati procedimenti di estrazione e di purificazione a base di tensioattivi ed enzimi.

Si ottiene in ogni caso un polimero sotto forma di polvere bianca, che è successivamente granulata per estrusione a caldo secondo la tecnologia tradizionale dei polimeri di sintesi petrolchimica. È opportuno far rilevare che a seconda delle modalità di estrazione e purificazione impiegate si ottengono valori di peso molecolare e polidispersità diversi.

I copolimeri poli-idrossibutirrato/idrossivalerato sono prodotti mediante fermentazione di *Ralstonia* in un processo a due stadi, nel secondo dei quali, assieme a glucosio, si somministra anche un sale dell'acido propionico. Il contenuto di idrossivalerato nel polimero è stabilito dal rapporto glucosio/propionato.

Sono stati ovviamente anche studiati metodi diversi per introdurre idrossivalerato nel polimero e sono stati individuati validi sistemi alternativi, utilizzando vie metaboliche interne ai batteri, evitando così di modificare le condizioni dei mezzi di coltura.

In questo contesto sono state sperimentate con successo le vie biosintetiche degli aminoacidi treonina, isoleucina e valina.

La produzione di poli-idrossibutirrati, omo e copolimeri, è stata finora realizzata industrialmente da Zeneca/Monsanto (copolimeri) e da Chemie Linz GmbH (omopolimeri).

La produzione Zeneca/Monsanto (marchio commerciale Biopol) si basa sulla fermentazione di un mutante di *Ralstonia* su glucosio, con l'aggiunta di propionato in carenza di fosforo. Sono stati ottenuti copolimeri con un contenuto di idrossivalerato fino al 30% molare. Il contenuto di copolimero nella massa fermentante è risultato variabile dal 70 all'80% del peso secco. Agli inizi degli anni Novanta la produzione annua era di circa mille tonnellate. Il prezzo di mercato del Biopol si aggirava intorno ai 15\$/Kg. Si stimava che, portando la produzione a dieci mila tonnellate annue, il prezzo sarebbe potuto scendere a circa 5\$/Kg. Per i motivi che cercheremo di indagare più avanti, Monsanto ha recentemente sospeso l'attività di produzione di copolimero. Non sono disponibili dati ufficiali sulla situazione produttiva della Chemie Linz: notizie indirette

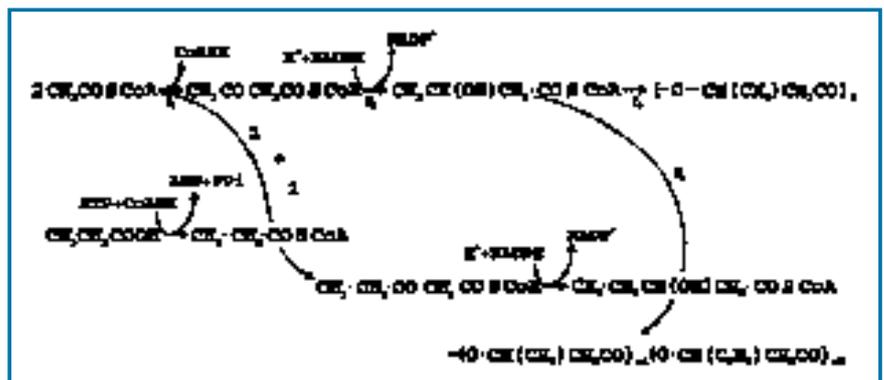


Figura 6 - Sintesi batterica di copolimero

confermerebbero la sospensione dell'attività. Nel tentativo di ridurre i costi di produzione da fermentazione, oltre alla già citata sostituzione del cloroformio con enzimi e tensioattivi per l'estrazione del polimero, sono state tentate numerose altre vie, che però non hanno portato a risultati significativamente interessanti. Fra queste citiamo la sostituzione del glucosio come fonte di carbonio con molasse di barbabietola e sieri di latte, l'impiego di ceppi batterici diversi in associazione con composizioni di terreni di coltura arricchiti di particolari molecole, capaci di essere utilizzate dai batteri nel loro metabolismo.

Nel contesto dei tentativi di abbattimento dei costi di produzione è interessante esaminare, a scopo illustrativo, il conto economico elaborato da Lee e Choi [9], per la produzione batterica di poliidrossibutirrato utilizzando saccarosio come fonte di carbonio e azoto come nutriente limitante. Per il recupero del polimero gli autori hanno fatto ricorso all'impiego di trattamenti a base di tensioattivi in soluzione di ipoclorito sodico.

Conto economico

Elementi del conto: produzione 100 mila t/anno; investimento 396 milioni \$ (1997)

- Materie prime	1,26 \$/Kg
- Servizi	0,44 \$/Kg
- Lavoro	0,11 \$/Kg
- Spese generali	0,06 \$/Kg
- Ammortamenti	0,73 \$/Kg
- Totale	2,60 \$/Kg

Al costo totale di fabbrica vanno poi aggiunte le spese di marketing e il ritorno sugli investimenti, che complessivamente non dovrebbero superare l'importo di 1 \$/Kg. Si noti però che l'entità dell'ammortamento è probabilmente parecchio sottostimata (non è improprio assumere un importo pari ad almeno 1,5 volte il valore indicato dagli autori).

Bibliografia

- [1] B. Witholt, B. Kessler, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**, 279.
- [2] A.J. Anderson, E.A Dawes, *Microbiol. Rev.*, 1990, **54**, 450.
- [2a] S. Cornibert, R.H. Marchessault, *Journal of Molecular Biology*, 1972, **71**, 735.
- [3] D. Jendrossek, *Polymer Degradation & Stability*, 1999, **59**, 317.
- [4] S. Fiddler, D. Dennis, *Fems Microbiol. Rev.*, 1992, **103**, 231.
- [5] S.J. Sun *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1997, **15**, 63.
- [6] T. A. Leaf, F. Srienc, *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **57**, 557.
- [7] L. Madison, G. W. Huisman, *Microbiological and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63**, 21.
- [8] Y. Kawaguchi, Y. Doi, *Macromolecules*, 1992, **25**, 2324.
- [9] S.Y. Lee, J. Choi, *Polymer Degradation & Stability*, 1998, **59**, 387.

Ringraziamenti

L'autore ringrazia il Alfredo Salvi per i preziosi consigli e l'aiuto per l'elaborazione grafica di Figure e Tabelle.