

Poliidrossialcanoati polimeri biodegradabili del futuro? (seconda parte)

di Marco Valera

Gli elevati costi da produzione batterica hanno di fatto reso improbabile una significativa penetrazione dei poliidrossialcanoati sul mercato. La possibilità di far produrre omo e copolimeri alle piante, cioè a fonti rinnovabili, ha aperto la via ad una significativa riduzione dei costi. Per ora le concentrazioni di copolimero raggiungibili sono ancora basse, ma la ricerca è seriamente impegnata a migliorare le rese delle vie biosintetiche. La sintesi batterica e da piante dei poliidrossialcanoati è stata oggetto di numerosi brevetti di prodotto e di processo da parte di qualificate aziende del comparto chimico e biologico. Nell'ultimo triennio si è andata sviluppando, in alcuni settori del mondo scientifico, una linea di pensiero critica, che propone alla riflessione il confronto tra i costi energetici delle produzioni di biopolimeri e di polimeri tradizionali di sintesi.

Una delle vie tentate, che in linea di principio godeva di ottime premesse per una produzione più economica, è quella della sintesi di poliidrossialcanoati (omo e copolimeri) ad opera delle piante coltivate [10].

Il punto forte di questa scelta era la constatazione che le piante coltivate sono in grado di produrre grandi quantitativi di prodotti chimici per uso industriale a costi molto interessanti. Fra questi spiccano l'amido (ricavato da mais o da patata) e i lipidi (ricavati da colza e soia). L'amido per usi industriali viene quotato intorno a 0,3 \$/kg, mentre il prezzo di mercato dell'olio di soia per usi industriali si aggira intorno a 0,5 \$/kg.

Gli sviluppi della biologia molecolare delle piante hanno reso possibile l'introduzione in esse di geni eterologhi, capaci di far esprimere caratteri nuovi. Si citano a scopo esemplificativo gli interventi di ingegneria genetica e metabolica su colza (inserimento ed espressione di geni di *Umbellularia californica*), per la produzione di acidi grassi a catena media (l'olio di colza così trattata è sul mercato con il nome commerciale di Laurical), e l'aumento del contenuto di amido in patata mediante inserzione ed espressione del gene batterico della ADP glucosio fosforilasi.

Proprio in relazione a questa capacità delle piante coltivate di accogliere ed esprimere geni che presiedono all'espressione di

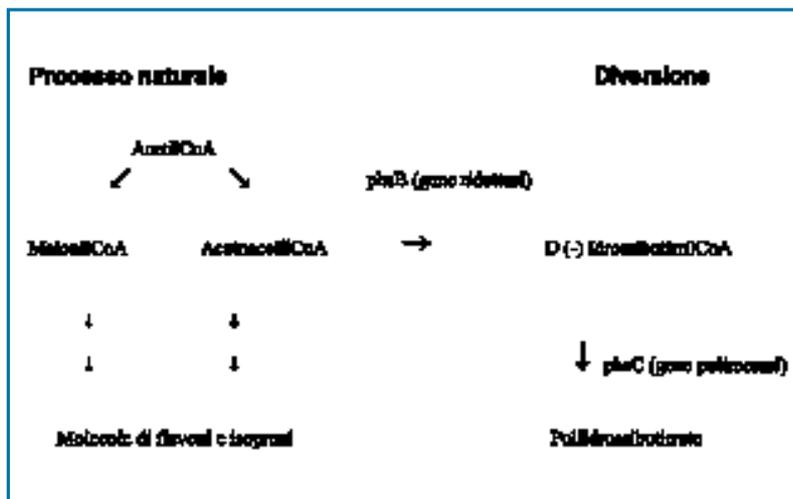


Figura 7

caratteristiche nuove, si è pensato fin dal 1992 ad inserire in esse i geni batterici dell'operone del poliidrossibutirrato.

Si pensava che in tal modo si sarebbero potuti produrre polimeri biodegradabili su scala agronomica.

Le prime stime facevano prevedere che se si fosse riusciti ad esprimere in oleaginose poliidrossialcanoati in concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quelle dei lipidi di riserva (20÷40% del peso secco), si sarebbero potuti abbattere i prezzi di mercato a livelli di 0,4÷0,6 \$/kg, cioè a livelli competitivi non solo con i polimeri biodegradabili del commercio (5 \$/kg),

M. Valera, Via Vigorelli, 3 - 20090 Segrate - valeam@libero.it.

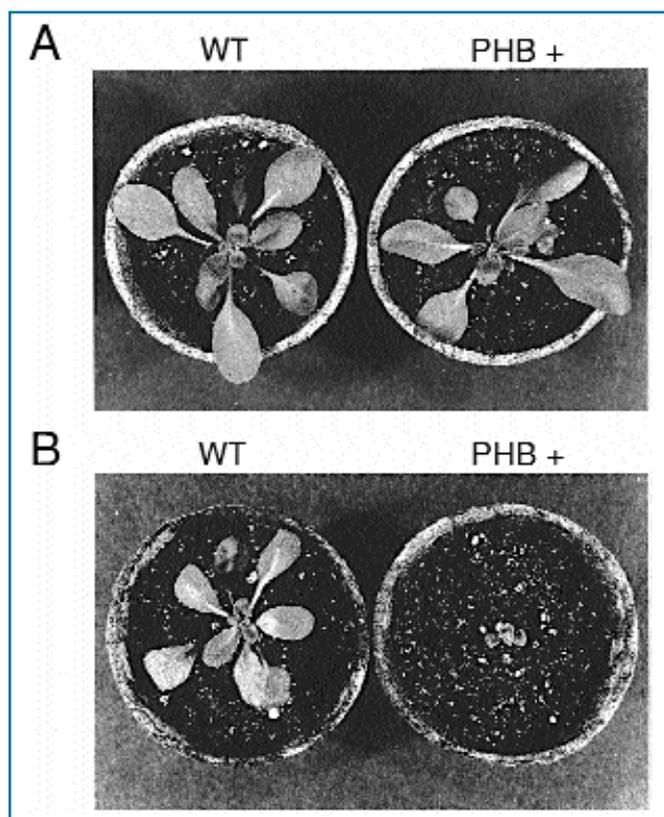


Figura 8 - A) piantine con poliidrossibutirrato nei plastidi; B) piantine con poliidrossibutirrato nel citosol (wt: piantine non ingegnerizzate, PHB+ piantine ingegnerizzate) (Figura gentilmente messa a disposizione da Chris Sommerville, Department of Plant Biology, Carnegie Institution)

ma addirittura dei polimeri di largo consumo (PP, PE \cong 1 \$/Kg). I primi lavori relativi alla produzione di piante transgeniche capaci di produrre poliidrossibutirrato sono opera del gruppo di lavoro coordinato da Sommerville e riguardano l'espressione dei geni biosintetici per poliidrossibutirrato di *Ralstonia* nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* [11].

Poiché nel citoplasma la pianta possiede già il gene della tiolasi, furono introdotti in *Arabidopsis* solo i geni che codificano per la riduttasi (phaB) e per la polimerasi (phaC). Tali geni indussero una diversione nei processi metabolici, utilizzando acetil e acetoacetilCoA delle piante, come schematizzato in Figura 7.

Il risultato principale di queste prime esperienze fu la conferma della possibilità di ottenere poliidrossibutirrato con interventi di ingegneria metabolica. Tuttavia le percentuali di polimero ottenute erano molto basse (0,14% sul secco), e l'intervento biotecnologico, sottraendo molecole ad altri processi e/o introducendo nuove molecole nella pianta transgenica, ne danneggiava la vitalità e la resa in semi (Figura 8 B).

Il secondo passo fu quello di fare avvenire il processo di sintesi in un ambito particolare della cellula vegetale, ricco di per sé di acetilCoA e capace di ospitare quantità rilevanti di materiali polimerici di riserva (come ad es. l'amido) senza mostrare segni di malessere. Fu così scelto di orientare il processo nei plastidi (Figura 9), utilizzando come peptide di trasporto una porzione di un enzima tipico del processo fotosintetico, come suggerito dalle tecniche ormai consolidate della bioingegneria vegetale. I primi risultati, apparsi nel 1994, portano ancora la firma del

gruppo di Sommerville [13]. Essi mostrano che è possibile far produrre ad *Arabidopsis* poliidrossibutirrato nei plastidi, in ragione massima del 14% sul peso secco (quindi con un aumento di 100 volte rispetto ai precedenti risultati), senza per questo arrecare significativi danni alla pianta (Figura 8 A).

La terza fase del lavoro fu quella di realizzare la sintesi del polimero in semi di piante erbacee coltivate di uso commerciale. Furono scelte allo scopo colza e soia, che, come produttrici di elevate quantità di oli nei semi, garantivano un'ottima disponibilità di una molecola base del processo (acetilCoA).

Poiché per la produzione di polimeri verrebbero impiegate colza e soia destinate esclusivamente all'estrazione di oli per uso industriale, non sorgerebbero problemi riguardanti le proprietà commestibili. Inoltre è da ritenere possibile che l'estrazione del polimero possa avvenire contestualmente alle o in combinazione con le lavorazioni cui le piante erbacee di cui sopra vengono sottoposte per i loro utilizzi tradizionali.

Per evitare il rischio che la riduzione del livello di oli conseguente all'utilizzo alternativo di acetilCoA per la produzione di poliidrossibutirrato possa avere effetti negativi sulla germinazione dei semi, le biotecnologie offrono la possibilità di controllare l'espressione dei geni in modo da farla avvenire nel momento più opportuno durante la crescita della pianta.

I risultati dei lavori condotti in Monsanto alla fine degli anni Novanta, mostrano in sintesi che è possibile accumulare polimero in semi maturi di colza transgenica fino a un livello dell'8% sul secco [12].

Interessanti risultati sono anche stati ottenuti con mais transgenico, nel quale si è riusciti a orientare la sintesi di poliidrossibutirrato in organuli particolari (perossisomi), sfruttando come molecole base i prodotti della degradazione degli acidi grassi. La concentrazione di polimero raggiunta in questi esperimenti è però dello 0,2% circa, ancora assai bassa per i fini pratici.

Copolimeri da piante

Come più sopra anticipato, le proprietà fisico meccaniche e di lavorabilità del poliidrossibutirrato omopolimero non sono però tali da soddisfare le esigenze applicative pratiche. Allo scopo di superare queste difficoltà, furono tentate soluzioni varie, basate sulle conoscenze tecnologiche tradizionali dei polimeri: cioè la messa a punto di mescole di poliidrossibutirrato con polimeri compatibili, che avessero come risultato una sorta di "plastificazione" del poliidrossibutirrato stesso.

La soluzione vera e radicale del problema sarebbe però stata

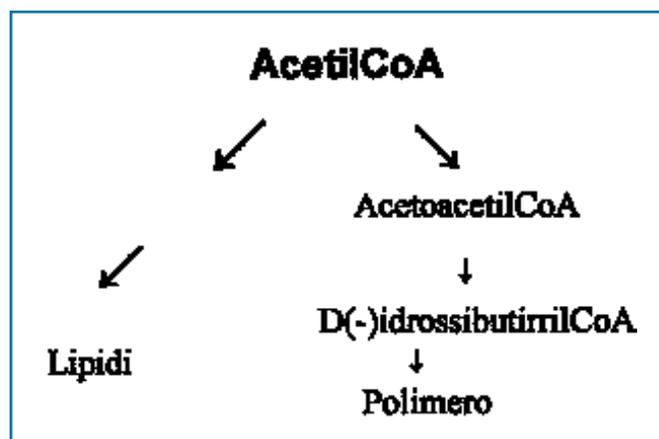


Figura 9

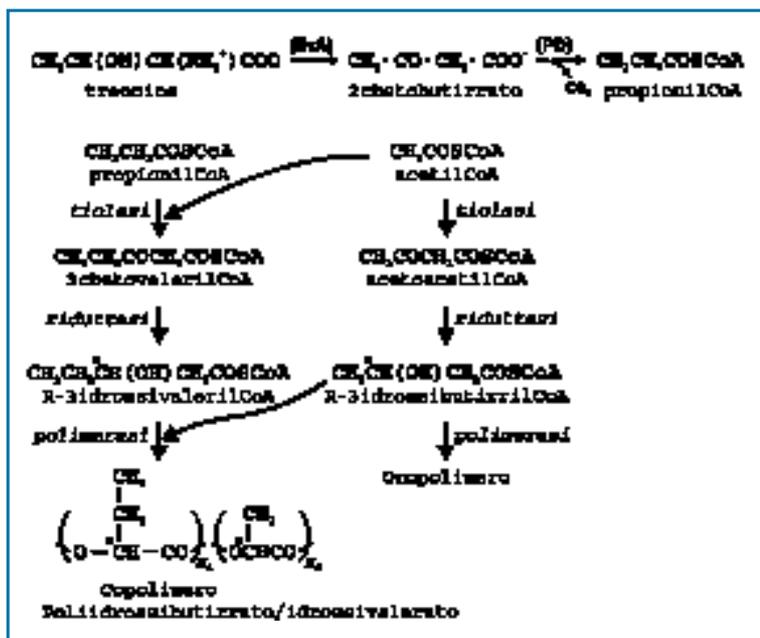


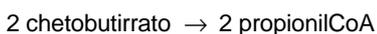
Figura 10

quella della produzione diretta di copolimero in piante. Questo obiettivo è stato raggiunto nel 1998 in Monsanto e riguarda risultati relativi ad Arabidopsis e a colza. Era da tempo noto un gene mutato della treonina deaminasi batterica (ilvA) che esprimeva un enzima capace di catalizzare la reazione:



senza subire effetti di retrocontrollo negativo da parte del prodotto finale del percorso metabolico.

Era anche noto che nelle piante esiste un gene endogeno (piruvato deidrogenasi:PD) capace di presiedere alla reazione:



Si è così pensato di trasformare piante erbacee (Arabidopsis e colza) con il gene della treonina deaminasi e con i geni che presiedono alla sintesi del poli-idrossibutirrato (utilizzando in particolare una forma di tiolasi dotata di alta affinità sia per idrossibutirilCoA sia per idrossivalerilCoA), come mostrato in Figura 10.

Nelle piante transgeniche di Arabidopsis così ottenute si è riscontrata presenza nelle gemme di copolimeri idrossibutirrato/idrossivalerato (% molare di idrossivalerato variabile da 4 a 17%) in ragione dello 0,2÷0,8% sul peso secco.

In colza si è riusciti ad orientare la sintesi di copolimero ai semi e si sono ottenuti accumuli fino al 2÷2,5% (% molare di idrossivalerato = 6,5).

Il copolimero ottenuto in Arabidopsis ha una struttura casuale, una massa molecolare di 5,5x10⁵ Da e una polidispersità di 1,8; quello ottenuto in colza ha anch'esso struttura casuale, una massa molecolare di 1x10⁶ Da e una polidispersità di 2,4. Contemporaneamente presso l'Institut de Biologie et Physiologie Végétale dell'Università di Lausanne, un gruppo di ricercatori facenti capo a Yves Poirier ha esplorato nuove vie per la sintesi nelle piante erbacee di copolimeri di idrossiacidi a media catena [12, 14].

Il più significativo risultato ottenuto riguarda la trasformazione di Arabidopsis con il gene di una polimerasi di Pseudomonas (Pps), indirizzando l'espressione del gene stesso al comparto cellulare specializzato nella demolizione per β ossidazione degli acidi grassi (il perossisoma). In questo contesto, l'enzima espresso dal gene esogeno presiede alla sintesi di copolimeri a struttura casuale di idrossiacidi diversi con 6÷16 atomi di carbonio provenienti dalla β ossidazione. La resa in copolimero risulta però ancora bassa (0,4% del peso secco dei semi).

Il processo sopra descritto è sintetizzato nella Figura 11. È interessante notare che dalla β ossidazione si ottengono S+ idrossiacidi, mentre la polimerasi di Pseudomonas è in grado di polimerizzare solo monomeri R-. Per spiegare quanto sopra sono state fatte due ipotesi:

- presenza di una epimerasi, che dovrebbe operare a monte del processo di polimerizzazione, catalizzando la trasformazione della forma S+ in R-;
- vie metaboliche alternative di produzione di 3-idrossiacidi R- utilizzabili dalla polimerasi, quali ad esempio una enoil-CoA-idratasi (R-) specifica e una chetocil-CoA riduttasi (R-) specifica.

Sembra che l'ipotesi 1 abbia trovato riscontri sperimentali.

Considerazioni conclusive

La produzione di copolimeri in piante rappresenta uno tra i più complessi problemi di ingegneria metabolica, in quanto viene richiesta l'espressione stabile di 4 geni eterologhi, e il coinvolgimento di percorsi metabolici diversi.

Le difficoltà sono messe in chiara evidenza dalle basse concentrazioni di copolimero finora ottenute (≤2,5% sul secco), in confronto alla sintesi dell'omopolimero (≈15% sul secco). Quest'ultima percentuale sembrerebbe essere quella che è opportuno raggiungere per poter seriamente pensare a realizzazioni commerciali.

È ragionevole pensare che per aumentare le rese e riuscire a controllare contemporaneamente la percentuale molare di comonomero si debbano fare anche interventi sul genoma della pianta, oltre che ottimizzare l'introduzione e l'espressione dei geni eterologhi.

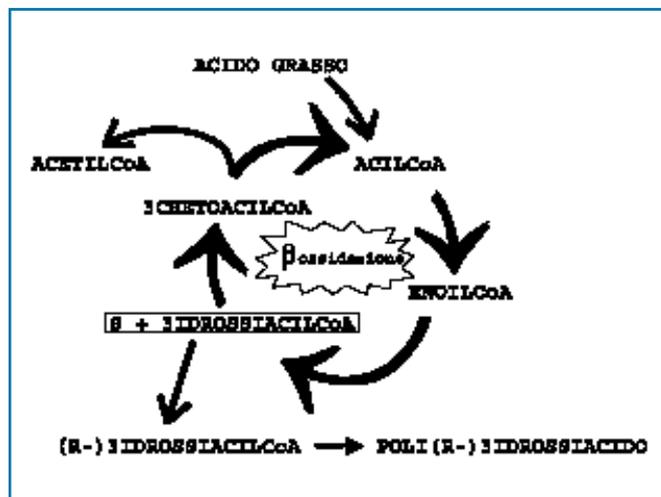


Figura 11

C'è tuttavia la convinzione che i progressi che devono essere realizzati siano comunque alla portata degli sviluppi che la biologia molecolare e le biotecnologie stanno facendo registrare. A fronte di queste affermazioni ottimistiche, si pone il calo di interesse per la sintesi di polioidrossialcanoati da piante (così come da batteri) da parte di grossi gruppi attivi nel settore delle biotecnologie agrarie. Zeneca prima e Monsanto recentemente hanno infatti dichiarato ufficialmente di ritirarsi da questa attività.

Una possibile chiave di lettura della situazione di scollamento che si è venuta a creare tra la comunità scientifica e l'industria potrebbe risiedere nei risultati degli studi riguardanti gli aspetti energetici dei diversi processi produttivi e le riflessioni sui reali vantaggi offerti dai polimeri biodegradabili a fronte dei polimeri tradizionali di largo consumo (PP e PE in particolare), comparati nella letteratura scientifica negli ultimi 3-4 anni [3, 15, 16, 17, 18]

In sostanza tali lavori e riflessioni pongono l'accento sul fatto che comunque l'impiego di materie prime rinnovabili comporta il consumo contemporaneo di risorse non rinnovabili. In particolare, se si esamina un processo produttivo nella sua globalità, può anche risultare che il consumo di energia non rinnovabile nella produzione di materie plastiche da fonti rinnovabili sia superiore a quello di un processo petrolchimico utilizzato per produzioni affini.

I dati disponibili, e in particolare quelli elaborati separatamente da Heyde e da Gerngross e Slater sono riassunti nella Tabella 5.

Tipo di produzione	Consumo energetico	
	MJ/kg polimero	kg eq. petrolio kg polimero
Polioidrossibutirrato da fermentazione batterica (su zucchero da mais)	66 - 93	1,7 - 2,4 - 3,73
Polioidrossibutirrato da mais transgenico	90	2,3
PE	74 - 86	1,9 - 2,2
PS	92	2,4
PET	76	2,0
Poliammide	142	3,7

Per la produzione di polioidrossibutirrato da fermentazione batterica il consumo energetico di Tabella 5 è dato da: energia sussidiaria per la crescita e trasporto di mais alla fabbrica + energia per la produzione di zucchero + energia per la fermentazione + energia per il recupero del polimero.

Per la produzione di polioidrossibutirrato da mais transgenico il consumo energetico è dato da: energia sussidiaria + energia per l'estrazione del polimero + energia per il recupero del polimero. La concentrazione di polimero nel mais transgenico si presume collocarsi tra il 10 e il 15%.

A complemento dei dati illustrati in Tabella 5, si ritiene opportuno aggiungere le seguenti considerazioni:

- tutti gli equivalenti di petrolio utilizzati per la produzione di polimeri naturali sono consumati per produrre energia, mentre parte degli equivalenti di petrolio consumati nei processi di polimerizzazione della petrolchimica vengono incorporati nel prodotto;

- solo un accurato lavoro di ottimizzazione dei processi può modificare la situazione. Ciò è però vero in entrambi i casi, anche se nel campo della petrolchimica si è ormai raggiunto un livello di notevole ottimizzazione.

Alle considerazioni puramente energetiche sono poi da aggiungere considerazioni di tipo ecologico. Non è infatti detto che l'impiego di materiali biodegradabili abbia necessariamente effetti benefici sull'ambiente. Gli effetti dipendono infatti in gran misura dai sistemi di smaltimento messi in essere dalle diverse realtà socio-politico-economiche esistenti.

Una sintesi numerica significativa del problema ecologico associato allo smaltimento è riportata nella Tabella 6, relativa alla gestione dello smaltimento di imballaggi.

Tipo di smaltimento	Effetto serra complessivo (kg CO ₂ svil./kg rifiuti)		
	PE	PS	Polioidrossibutirrato
Convenzionale (30% incener./ 70% interr.)	0,52	0,72	5,1
Incenerimento	3,3	3,5	0,09
Raccolta separata e compostaggio	-	-	0,03

Senza entrare nel dettaglio dei problemi connessi con lo smaltimento dei rifiuti, si potrebbe sintetizzare il problema dicendo che la biodegradabilità si dimostra un vantaggio quando si faccia ricorso a sistemi di raccolta e smaltimento selettivi o quando il requisito di biodegradabilità sia esplicitamente richiesto dalla specifica applicazione.

Si rammenta inoltre che, come anticipato nella prima parte dell'articolo (al capitolo), "Il polioidrossibutirrato", pubblicata nello scorso numero di giugno de *La Chimica e l'Industria*, per i polimeri biodegradabili in genere vengono stimati consumi in consistente crescita. In questo contesto ogni prodotto potrà trovare il suo più adatto collocamento in funzione delle caratteristiche specifiche di biodegradabilità e di proprietà in funzione delle prestazioni richieste.

Bibliografia

- [10] Y. Poirier et al., *Biotechnology*, 1995, **13**, 142.
- [11] Y. Poirier et al., *Science*, 1992, **256**, 520.
- [12] Y. Poirier, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**, 181.
- [13] C. Nawrath et al., *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1994, **91**, 12760.
- [14] V. Mittendorf et al., *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1998, **95**, 13397.
- [15] M. Heyde, *Polymer Degradation & Stability*, 1998, **59**, 3.
- [16] T. U. Gerngross, S. C. Slater, *Scientific American*, 2000, **August**, 36.
- [17] T.U. Gerngross, *Nature Biotechnology*, 1999, **17**, 541.
- [18] K. Kasuya et al., *Polymer Degradation & Stability*, 1998, **59**, 327.

Ringraziamenti

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