

Ingegneria metabolica

La nuova frontiera per l'industria chimica italiana?

di Danilo Porro e Oreste Piccolo

Il presente lavoro è finalizzato a far conoscere le principali problematiche tecniche e scientifiche dell'ingegneria metabolica, ad elencare le potenzialità offerte per la preparazione di prodotti chimici su scala commerciale, a discuterne i vantaggi e gli svantaggi rispetto alle sintesi tradizionali e a presentare quindi nuove opportunità per l'industria chimica italiana.

Dalla metà degli anni Settanta, la capacità di isolare un singolo e specifico gene di un genoma, grazie alle tecniche di Dna ricombinante (rDna), ha profondamente influenzato l'approccio con cui ricercatori di varie discipline, tra cui biologi, chimici, farmacologi, medici ecc., sviluppano le proprie ricerche. Molti settori della ricerca di base sono stati positivamente trasformati dall'uso di tali tecniche e ciò è dimostrato dal fatto che tutti noi siamo oggi testimoni di un rapidissimo ed affascinante accumulo di nuove conoscenze e leggi biologiche. Tali capacità di manipolare ed inserire geni eterologhi in organismi ospiti hanno inoltre drasticamente contribuito allo sviluppo delle biotecnologie industriali [1], consentendo ad esempio di sintetizzare composti che altrimenti sarebbero stati disponibili solo in limitate quantità, oppure la cui preparazione e/o purificazione sarebbero state un procedimento lungo, costoso, rischioso o dipendente da materie prime non rinnovabili. Le biotecnologie industriali forniscono le conoscenze scientifiche e gli strumenti tecnologici per le diverse applicazioni della "bioindustria" [2], che è costituita da tutte le imprese che usano materiali e processi biologici sia per lo sviluppo di nuovi prodotti e servizi sia per migliori produzioni degli stessi. La "bioindustria" copre vari settori merceologici, che spaziano dal farmaceutico all'agro-alimentare, dalla chimica di base a quella specialistica, dall'energetica al risanamento e alla salvaguardia ambientale. La determinazione della sequenza nucleotidica di numerosi genomi (ad oggi circa 1.000, di organismi, virus ed organelli appartenenti a tutti i Regni [3]) ha inoltre allargato gli orizzonti scientifici dei ricercatori, fornendo informazioni su un vasto numero di geni codificanti proteine/enzimi. I prodotti di tali geni possono costituire interessanti candidati, non solo per dettagliati studi sulle relazioni tra struttura e funzione, ma anche per la ricerca applicata. Grazie alla tecnologia del Dna ricombinante è infatti possibile produrre, da organismi naturalmente non produttori, una volta che siano stati opportunamente modificati, una vasta gamma di peptidi, proteine ed enzimi (Figura 1). Nella Figura 1 lo schema A identifica in colore blu un gene eterologo che deve essere clonato in un vettore di espressione per poter essere introdotto in un organismo

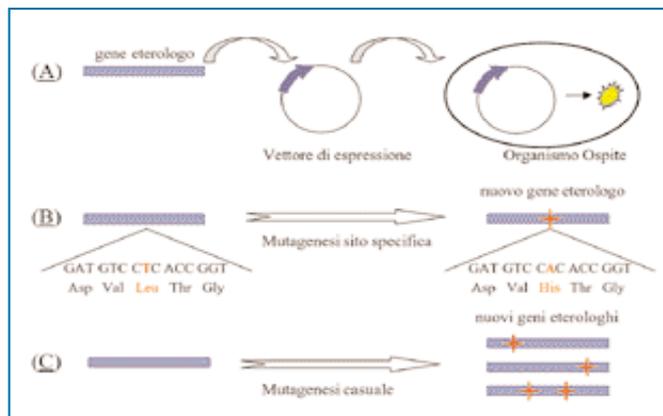


Figura 1 - La produzione di proteine eterologhe

ospite adatto per la sintesi della proteina di interesse (in giallo); lo schema B illustra come la sequenza nucleotidica di un gene, e conseguentemente la sequenza amminoacidica della proteina da cui essa deriva, possa essere modificata in modo mirato grazie alle tecnologie derivanti dall'ingegneria proteica per dare origine ad un nuovo gene che possa poi essere utilizzato secondo lo schema A. Mutazioni casuali, rappresentate nello schema C, possono essere introdotte sia durante la normale duplicazione del gene da parte della cellula ospite, così come durante l'amplificazione del gene stesso in laboratorio prima del clonaggio nel vettore di espressione. Ogni singola mutazione, casuale o mirata, potrebbe avere effetti nulli, negativi o positivi sui livelli qualitativi (per esempio una differente attività del prodotto genico finale) e/o quantitativi di produzione.

La tecnologia del Dna ricombinante, che ha ormai quasi trent'anni, sta assumendo un ruolo primario tra quelle sviluppate nel ventesimo secolo. Prodotti di interesse farmaceutico (per esempio insulina, interferoni, vaccino contro l'epatite B ecc.) ed enzimi industriali (utilizzati, ad esempio, nell'industria alimentare umana ed animale, nei settori della detergenza, della carta, dei tessuti ecc.) sono stati i primi risultati tangibili, frutto di questa tecnologia, ad essere immessi sul mercato mondiale. A partire dai primi anni Ottanta, il maggior impegno nello sviluppo della tecnologia del Dna ricombinante è stato finalizzato alla salvaguardia della salute pubblica. A riprova di ciò, l'insulina umana è stato il primo prodotto di origine ricombinante introdotto sul mercato (1982, Stati Uniti). Nell'anno 2000, il mercato mondiale dei primi 20 prodotti farmaceutici ricombinanti è stato stimato attorno ai 13 miliardi di euro, mentre quello degli enzimi ad uso industriale attorno ai 2; le proiezioni prevedono che quest'ultimo possa raggiungere, nel 2008, gli 8 miliardi di euro.

A completare il quadro, le proiezioni prevedono che la bioindustria nel suo complesso possa raggiungere nel 2005 i 150 miliardi di euro nel mondo e circa 7 miliardi in Italia [4]. Il valore economico di questa tecnologia è destinato a rafforzarsi ed incrementare, visto il crescente numero di prodotti potenzialmente inseribili nelle fasi di ricerca e sviluppo di carattere industriale.

D. Porro, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze - Università di Milano-Bicocca; O. Piccolo, Studio di Consulenza Scientifica - Sirtori (LC). danilo.porro@unimib.it, orestepiccolo@tin.it, www.scsop.it

Inoltre, come già accennato, i diversi programmi di sequenziamento genomico permetteranno di identificare sia nuovi target cellulari sia nuove proteine di potenziale interesse.

Microrganismi ingegnerizzati come "microreattori industriali"?

Recentemente, dagli inizi degli anni Novanta, la crescente e pressante richiesta di utilizzare processi che siano simultaneamente selettivi, efficienti e rispettosi dell'ambiente, ha favorito lo sviluppo di una nuova sfida: la capacità di manipolare le vie metaboliche di una cellula. Mediante un insieme di tecniche che sono indicate con il nome di *ingegneria metabolica* [5] e che traggono origine dalla tecnologia del Dna ricombinante, ci si propone di ottenere molteplici scopi. Attraverso l'attivazione e/o repressione di vie metaboliche endogene di organismi viventi (essenzialmente cellule di microrganismi, ma anche cellule di origine animale o vegetale) oppure mediante la possibilità di costruire nuove vie metaboliche si mira a sintetizzare nuovi composti, ad ottenere elevate produzioni di metaboliti di interesse, a semplificare procedimenti complessi ecc. In altre parole si vogliono utilizzare microrganismi ingegnerizzati come "microreattori industriali" per produzioni competitive ed alternative rispetto a procedimenti sintetici più tradizionali. Volendo schematizzare al minimo indispensabile, i processi di ingegneria metabolica offrono due alternative possibili. Se il composto desiderato esiste in natura, può quindi essere prodotto da un organismo vivente e/o parte di esso (da uno o più enzimi); in questo caso, il processo può essere portato a termine almeno tramite tre diversi approcci:

- i) tramite l'inserzione di nuove o parziali vie metaboliche in un organismo ospite adatto;
- ii) direzionando il flusso metabolico verso il prodotto di interesse;
- iii) mediante l'azione catalitica di uno o più di enzimi.

In questo ultimo caso, un organismo può essere ingegnerizzato con il solo scopo di produrre l'enzima o gli enzimi di interesse in quantità sufficienti per il processo. Se invece il composto desiderato non esiste in natura, l'uso di substrati ottenuti mediante sintesi non biologica e la loro trasformazione mediante enzimi possono rappresentare ottime alternative a processi produttivi più tradizionali. In effetti il mondo biologico offre un'enorme fonte di diversi enzimi ed è quasi sempre possibile trovare un enzima che catalizzi la trasformazione chimica desiderata. Le tecniche da Dna ricombinante dovrebbe in questo caso permettere di disporre dell'enzima desiderato a costo conveniente. Scopo del presente lavoro è quello di presentare alcuni esempi attuali o futuribili di produzione di intermedi e/o prodotti finiti ottenuti attraverso procedimenti che fanno uso di organismi ingegnerizzati. Ci si propone di individuare punti di forza e di debolezza di tale approccio e di offrire eventualmente spunti di riflessione per scenari futuribili dell'industria chimica italiana.

Le applicazioni dell'ingegneria metabolica

La Tabella 1 riporta i più significativi, secondo gli autori, processi sviluppati su scala laboratorio, pilota o indu-

striale mediante ingegneria metabolica. Il microrganismo ospite indicato è stato ingegnerizzato per favorire a) la produzione del metabolita di interesse oppure b) l'uso da parte dell'organismo stesso di substrati di crescita (fonte di carbonio) alternativi.

Da un'analisi dettagliata dei processi riportati [per una più completa visione delle produzioni ad oggi sviluppate, si consiglia la lettura delle referenze bibliografiche 6-12], si evince che molteplici sono le possibilità offerte dall'ingegneria metabolica: a) la produzione di metaboliti eterologhi mediante l'uso di organismi ospite naturalmente non produttori; b) una più efficiente produzione di metaboliti endogeni da organismi ospiti già produttori; c) l'uso di materie prime alternative per sintesi organiche. Nella Figura 2 sono schematizzati i principali approcci dell'ingegneria

Tabella 1 - Processi sviluppati su scala laboratorio, pilota o industriale mediante ingegneria metabolica

Prodotto	Settori principali di applicazione ¹	Fase progetto ²	Microrganismo ingegnerizzato ³
<i>Amino acidi (e derivati)</i>			
Arginina	A, B, C, D	P, I	CG, EC
Fenilalanina	A, B, C, D	P, I	C, EC
Glutazione	A, B, C, D	P, I	EC
Isoleucina	A, B, C, D	P, I	C, SM
Lisina	A, B, C, D	P, I	C, EC
Prolina	A, B, C, D	P, I	CG, EC, SM
S-adenosilmetionina	A, B, C, D	P, I	SC
Treonina	A, B, C, D	P, I	C, EC, SC, SM
Triptofano	A, B, C, D	P, I	C, EC
<i>Acidi</i>			
Acido ascorbico	A, B	P, I	SC
Acido lattico	A, B, C, E	P, I	KL, SC, ZB
Acido succinico	B, C	P	EC
Acido adipico	C	P	EC
Acido 2 cheto-L-gulonico	A, B	P, I	E
Acido vanillico	B, C	R	EC
<i>Metaboliti primari/solventi</i>			
Acetone	F	P	CA
Butanolo	F	P	CA
Etanolo	B, F	P	EC, KO, KPI, ZM
Fruttosio 1,6-difosfato	B, C	P	SC
Glicerolo	A, C, F	P	EC, KPn, SC
1,3-propandiolo	C, E	P	EC
<i>Metaboliti secondari</i>			
Benzochinoni e idrochinoni	A, C	R	EC
Catecolo	A, C	R	EC
Indaco	C, E	P	EC
Isoprenoidi	B, C	R	EC
Melanina	A, B, C	R	EC, SC
Poli-beta-idrossialcanoati	C, E	P, I	EC, KA, KO
<i>Antibiotici</i>			
Beta-lattami	A	P, I	AC, PC
Polichetidi	A	P	S

¹ Farmaceutico e cosmetico (A), alimentare (B), chimica fine (C), agrochimico (D), polimeri e coloranti (E), pluriuso (F); ² I = industriale, P = pilota, R = ricerca;

³ AC = *Acremonium chrysogenum*, C = *Corynebacterium spp.*, CA = *Clostridium acetobutylicum*, CG = *C. glutamicum*, E = *Erwinia spp.*, EC = *Escherichia coli*, KA = *Klebsiella aerogenes*, KO = *Klebsiella oxytoca*, KPI = *Klebsiella planticola*, KPn = *Klebsiella pneumoniae*, KL = *Kluyveromyces lactis*, PC = *Penicillium chrysogenum*, SC = *Saccharomyces cerevisiae*, S = *Streptomyces spp.*, SM = *Streptomyces marcescens*, ZB = *Zygosaccharomyces bailii*, ZM = *Zymomonas mobilis*.

metabolica. Lo schema indicato con A è quello di un organismo non manipolato e rappresenta una via metabolica endogena esistente che conduce da un substrato [S] a un prodotto [P] grazie all'opera di diverse attività enzimatiche e_1 - e_4 . Nello schema B un diverso prodotto di interesse [Y] può essere ottenuto mediante l'inserzione nel medesimo organismo di una nuova o parziale via metabolica (enzimi e_x - e_y). Nello schema C elevati livelli del prodotto di interesse [Y] possono essere ottenuti eliminando nell'organismo le attività enzimatiche secondarie (in questo caso e_3) e direzionando quindi il flusso metabolico verso il prodotto di interesse. Infine lo schema D vuole rappresentare sia la possibilità di far metabolizzare all'organismo un substrato alternativo, naturale o sintetico, [S₁], mediante l'introduzione di nuove attività enzimatiche (e_n), per la produzione di [Y] ovvero di utilizzare detto organismo per la sovrapproduzione a più basso costo di un richiesto enzima e_z che viene quindi impiegato in una sintesi chimica come biocatalizzatore per trasformare [S₁] in [Z], nel caso in cui quest'ultimo composto non esista in natura. Per evidenti ragioni di spazio vengono qui omesse tutte le problematiche scientifiche e tecnologiche associate allo sviluppo di questi bioprocessi. Tali problematiche includono, il clonaggio o la distruzione dei geni di interesse, la scelta dell'ospite adatto, il controllo del flusso metabolico, la ricerca e sviluppo di nuovi enzimi, la crescita dell'organismo modificato, la purificazione del prodotto ecc. È quindi evidente che ulteriori sviluppi della biologia molecolare, biochimica, fisiologia cellulare, tecniche e tecnologie fermentative, in sinergia con l'innovazione delle tecniche della chimica organica sintetica e della ingegneria di processo non potranno che aprire nuovi, inaspettati ed industrialmente interessanti scenari applicativi.

Alcune applicazioni "made in Italy"

È stato recentemente sviluppato nel nostro Paese un processo industrialmente competitivo per la produzione di acido L-lattico [13-16]. Tale prodotto, il cui mercato è in rapida crescita ed è stimato valere annualmente parecchie centinaia di milioni di dollari, viene utilizzato nell'industria alimentare (quale conservante, aromatizzante ed acidulante in bevande), nell'industria farmaceutica e fitosanitaria (quale additivo o, sottoforma di polimero, quale supporto per il rilascio controllato di farmaci), nell'industria della chimica fine (quale sintone chirale e, soprattutto, quale precursore di omo- e di co-polimeri biodegradabili). La produzione industriale attuale di acido L-lattico sfrutta le capacità biosintetiche di microrganismi naturali (*Lactobacillus lactis*). Purtroppo i bassi valori di pH conseguenti alla produzione dell'acido lattico (pKa=3,87) hanno un effetto negativo sulla crescita dei microrganismi utilizzati, con conseguente limitazione della produzione stessa. Tale inconveniente viene aggirato mantenendo il pH del processo a valori relativamente alti (pH=5-5,5) mediante aggiunte di CaCO₃, NaOH o NH₄OH. In questo modo viene favorita la crescita batterica e la produzione, ma, come inconveniente, il prodotto finale è sotto forma di sale alcalino, alcalino-terroso o di ammonio. Il recupero dell'acido L-lattico, l'unico prodotto avente un interesse commerciale, dal suo sale richiede quindi un ulteriore stadio di processo che ovviamente ha un suo costo aggiuntivo. L'idea inventiva di partenza è stata quella di utilizzare un organismo produttore capace di crescere e di rimanere attivo a bassi valori di pH, evitando in questo modo la produzione di lattati. Il lievito gemmante *Saccharomyces cerevisiae*, organismo non patogeno ampiamente utilizzato per applicazioni biotecnologiche tradizionali [produzione di biomasse ("single cell

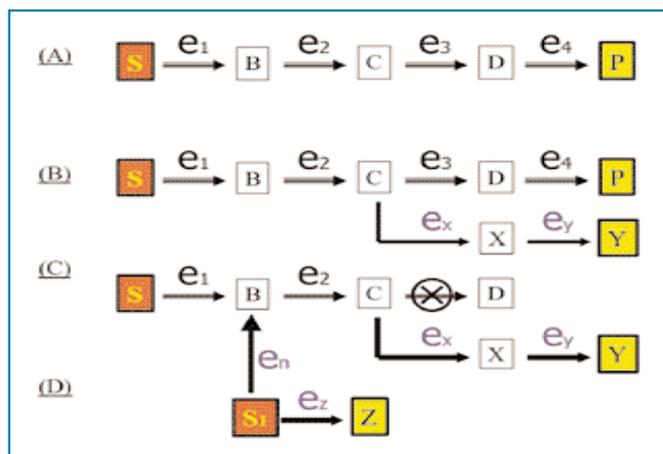


Figura 2 - Le possibilità dell'ingegneria metabolica

proteins") usate come derrate alimentari, di bevande e di etanolo quale solvente] ed avanzate [produzione di ingredienti attivi farmaceutici, enzimi e vaccini grazie alle tecniche da Dna ricombinante], cresce e rimane metabolicamente attivo anche a bassi valori di pH (3-3,5). Nuove interessanti opportunità sono offerte dalla possibilità di modificare i suoi cammini metabolici. In particolare l'espressione del gene eterologo LDH-A, codificante l'enzima lattico deidrogenasi bovina, in cellule di lievito consente nel microrganismo così ingegnerizzato la bioconversione (attività 1) del piruvato, di per sé composto principale intracellulare del metabolismo di ogni cellula, ad acido L-lattico (Figura 3). Tale metabolita è in grado di attraversare le membrane plasmatiche e si accumula nel mezzo di crescita [14]. Elevate produzioni di acido L-lattico sono state ottenute anche da altri lieviti quali *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueki* e *Zygosaccharomyces bailii* [14-16]. Per trasformare l'idea in reale innovazione industriale era tuttavia necessario andare oltre nella ricerca. Al fine di poter incrementare la produzione (oltre 100 g/L), la produttività (fino a 1 g/l/h), ma soprattutto la resa di conversione (fino al 90% del valore teorico, definito come grammo di acido lattico prodotto per grammo di glucosio consumato) è stato necessario studiare, sviluppare ed utilizzare lieviti ospite mancanti dell'attività piruvato deidrogenasica e/o piruvato de-

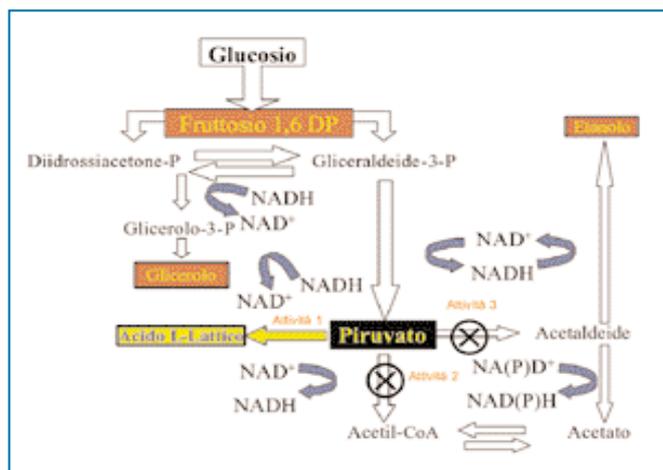


Figura 3 - La via metabolica normale semplificata del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (freccie bianche) e quella di una cellula di lievito ingegnerizzato per la produzione di acido L-lattico (freccia gialla)

no essenzialmente una fonte di carbonio, idrogeno ed energia (glucosio, generalmente ottenuto da amido di mais, colza ecc.), di azoto (ammonio, urea, idrolizzati proteici ecc.) ed ossigeno (aria per i processi aerobici). Tutti i componenti del substrato di crescita sono fondamentali per la crescita della biomassa, il suo mantenimento e per la sintesi del prodotto di interesse. Essendo nota la formula bruta del prodotto finale, così come la via metabolica che ad esso conduce partendo dalla fonte di carbonio, è facilmente ottenibile la resa teorica massima (espressa, come consuetudine, come grammo di prodotto/grammo di substrato). A semplice titolo di esempio (cfr. Figura 3) si consideri che partendo da una mole di glucosio $C_6H_{12}O_6$ (PM 180,18) è possibile ottenere due moli di gliceraldeide-3-fosfato (il diidrossiacetone fosfato viene infatti convertito in gliceraldeide 3P) e da questa si ottengono 2 moli di piruvato e quindi due moli di acido lattico $C_3H_6O_3$ (PM 90,11); ne consegue che la massima resa teorica ottenibile è di circa 1 grammo di acido lattico prodotto per grammo di glucosio consumato.

Affinché i processi sviluppati possano essere considerati competitivi è necessario che le rese di conversione siano prossime ai massimi valori teorici ottenibili. È inoltre auspicabile l'uso di substrati di crescita definiti e non derivati da scarti dell'industria agro-alimentari. Questi ultimi sono generalmente reperibili a bassi costi, ma contengono moltissimi elementi che influiranno sui processi ed i costi di purificazione del prodotto finale. Il costo del processo di purificazione, in dipendenza del prodotto in esame, può rappresentare anche il 50% dei costi globali. Il primo processo di purificazione è sempre dipendente dalla localizzazione del prodotto finale. A tale proposito è auspicabile che quest'ultimo possa essere secreto/rilasciato nel mezzo di crescita liquido; in caso contrario è indispensabile estrarre lo stesso dall'organismo produttore mediante rottura chimica o fisica delle cellule stesse. Oltre a ciò, a seconda delle caratteristiche del processo e del prodotto, si dovranno utilizzare apparecchiature di centrifugazione e di filtrazione (micro-, ultra- o nano-filtrazione), estrazioni liquido-liquido, purificazioni cromatografiche e/o mediante elettrodialisi, distillazioni o cristallizzazioni per ottenere il prodotto finale nelle specifiche desiderate, strettamente dipendenti dal settore di applicazione e dalle normative vigenti. Il processo fermentativo è essenzialmente di tipo "batch" o di tipo "fed-batch". Il primo tipo prevede che tutti i nutrienti necessari alla crescita e produzione (ad eccezione dell'ossigeno per i processi aerobici) siano forniti sin dall'inizio del processo stesso, mentre nel secondo tipo, nutrienti e/o induttori di produzione diversi possono essere addizionati a tempi diversi sotto stretto controllo in dipendenza dell'andamento del processo fermentativo stesso. Le rese di conversione, la produzione (grammo di prodotto/litro di fermentazione) e produttività (grammo di prodotto/litro/ora di fermentazione) sono strettamente dipendenti dal tipo di processo di fermentazione. Generalmente la metodologia "fed-batch" offre migliori garanzie, ma non è comunque possibile stabilire a priori quale tipo di processo possa essere considerato migliore. La fermentazione generalmente richiede bioreattori da 10-50 litri di volume operativo per produzioni ad elevato valore aggiunto, da 5.000-50.000 litri fino a 1.000.000 litri per prodotti con medio o basso valore aggiunto, relative quantità di substrato di crescita, elevate quantità di aria/ossigeno e conseguentemente anche elevate quantità di energia elettrica per il funzionamento dell'impianto stesso. Il metabolismo microbico e la crescita in bioreattore sono considerati nel loro complesso un processo esoergonico e quindi viene generata una considerevole quantità di calore. Elevati costi di conduzione potrebbero

essere associati anche al mantenimento della temperatura ottimale di processo (generalmente compreso tra i 20-40 °C). Ovviamente le stesse problematiche debbono essere affrontate qualora si desideri ingegnerizzare un microrganismo per ottenere la sovrapproduzione di uno o più enzimi di interesse da utilizzarsi poi per processi di bioconversione.

I tempi richiesti per lo sviluppo di un microrganismo ingegnerizzato e del relativo processo produttivo in un laboratorio di ricerca sono direttamente proporzionali al potenziale offerto dai ritorni della ricerca stessa. Generalmente si va da un minimo di tre anni ad un massimo di otto-dieci anni, mediamente quindi cinque-sei anni. Proprio in considerazione dei lunghi tempi e relativi costi richiesti, se paragonati ai tempi/costi richiesti per una sintesi chimica classica, appare evidente che gli approcci di ingegneria metabolica e le tecniche di Dna ricombinante, descritti in queste pagine, possono essere giustificati solo se:

- 1) il processo finale consente la produzione di enormi quantità del metabolita di interesse a più basso costo rispetto alle metodiche esistenti;
- 2) il processo è versatile e quindi facilmente adattabile per altre produzioni similari;
- 3) l'enzima sovrapprodotta ha ampia applicabilità;
- 4) non esistono strategie alternative che possano condurre allo stesso prodotto;
- 5) il prodotto ha un alto valore aggiunto.

Nel confronto con metodologie più tradizionali, i processi qui descritti possono risultare inferiori in produzione e produttività, ma assai spesso risultano superiori per la selettività (regio- o enantio-selettività), per la qualità e purezza del prodotto finito, per l'utilizzo di materie prime a basso costo e normalmente non tossiche, per l'impiego dell'acqua come solvente, per i minori, o molto spesso inesistenti, problemi associati allo smaltimento dei sottoprodotti del processo. Sin dalla metà degli anni Novanta l'industria chimica americana ha elaborato il concetto di sostenibilità globale ("sustainability impact factor") come criterio di confronto e di scelta di nuovi processi produttivi rispetto a quelli tradizionali esistenti, includendo quindi in questo concetto gli impatti economici, energetici ed ambientali e la disponibilità di materie prime rinnovabili. Non appare quindi una coincidenza il fatto che le potenzialità dell'ingegneria metabolica abbiano spinto nell'ultimo decennio i più grossi colossi dell'industria chimica tradizionale ad abbracciare le nuove tecnologie biotecnologiche, anche trasformando interi settori produttivi già in essere. A solo titolo di esempio vanno citate le grosse operazioni di ristrutturazione interna e/o di acquisto di "piccole medie industrie biotech" da parte di colossi quali Zeneca, Novartis, Monsanto, Aventis, Rhodia, Du Pont, Dow Chemical's, Bayer, Basf, Adm, Cargill, Tate and Lyle, Merck ecc. [23]. Per quanto riguarda l'Italia la situazione attuale evidenzia l'esistenza di centri di ricerca di base ed orientata (università e Cnr) e di una cinquantina di piccole aziende biotecnologiche [4] che operano principalmente nei settori della ricerca e sviluppo. Di fatto esiste solo un limitato contatto ed impatto con le industrie chimiche tradizionali (fatta eccezione per taluni settori della industria farmaceutica), mentre a parere degli autori, sarebbe opportuno ed auspicabile una verifica delle reciproche esigenze/possibilità, un'individuazione di obiettivi comuni ed un confronto tra i costi/impatti dei diversi approcci. Nella Tabella 2 sono indicate, ad esempio, alcune opportunità industriali dove potrebbe essere vantaggiosa la ricerca e l'applicazione dell'ingegneria metabolica e delle tecniche di Dna ricombinante. Ovviamente non si può pensare che l'ingegneria metabolica possa essere la panacea di tutti i problemi e difficoltà dell'industria chimi-

Tabella 2 - Possibili opportunità di applicazione della ricerca a applicazione dell'ingegneria metabolica delle tecniche del Dna ricombinante

<i>Alcune opportunità industriali</i>	<i>R & D</i>	<i>Prodotti/Attività</i>	<i>Settori principali di applicaz.¹</i>	<i>Indice di rischio²</i>	<i>Tempi ritorno investim.³</i>	<i>Fatturato in Italia 1994-1998-2005⁴</i>
<i>Sovrapproduz. di enzimi</i>			A, B, C, D, E, F	B, M	B, M	n.d., n.d., n.d.
	Individuazione nuovi enzimi	Enzimi con nuova attività catalitica				
	Nuovi organismi ospite	Enzimi con nota attività catalitica a più alta disponibilità				
	Studio microrganismi "estremofili"	Enzimi più stabili vs. T, pH, solventi, forza ionica ecc.				
<i>Cura della salute</i>			A	M	M, A	415, 960, 3200
	Individuaz. nuove cure	Nuovi farmaci Vaccini				
	Ottimizzazione processi	Prodotti diagnostici "Custom synthesis"				
<i>Alimentaz./Aromi/Fragranze</i>			B	M, A	M, A	n.d., n.d., 900
	Nuovi processi sintetici	Prod. "natural simili", a costi più bassi				
<i>Chimica di base e Chim. fine</i>			A, B, C, D, E, F	A	M, A	45, 190, 1300
	Utilizzo di materie prime rinnovabili	Solventi/ Commodities Coloranti Polimeri biodegradabili				
	Nuovi processi sintetici	Intermedi chirali				
<i>Ambiente/Energia</i>			F	M, A	M	n.d., n.d., n.d.
	Nuovi processi	Smaltimento rifiuti, Depurazione reflui Bonifica siti contaminati Biosensori Produzione biogas Riduzione CO ₂				

¹ Farmaceutico e cosmetico (A), alimentare (B), chimica fine (C), agrochimico (D), polimeri e coloranti (E), pluriuso (F); ² B = Basso, M = Medio, A = Alto; ³ B = Basso, M = Medio, A = Alto; ⁴ in milioni di euro (Fonte: Assobiotech, IMS, varie).

ca italiana, e più in generale dell'industria chimica occidentale, nella sfida con la controparte asiatica, costituita non tanto dal Giappone ma soprattutto da Cina, India e da numerosi altri paesi emergenti, né che la sintesi industriale di uno specifico prodotto chimico possa essere risolta convenientemente sempre e solo con gli approcci descritti nel presente lavoro. Tuttavia l'analisi dei problemi va effettuata con uno sguardo panoramico, non tralasciando alcuna possibilità; solo così, se una soluzione esiste, essa apparirà semplice e realizzabile.

Bibliografia

- [1] <http://www.governo.it/Presidenza/biotecnologie/saperne.html>
 [2] L. Alberghina, V. Chiesa, *Economia & Management*, **6**, dicembre 2002.
 [3] <http://www.tigr.org>.
 [4] Ministero delle Attività Produttive. D.G.S.P.C. Osservatorio per il Settore Chimico. Le piccole imprese biotecnologiche in Italia: le tecnologie, i prodotti, i servizi, 2000 (cfr. http://www.osservatoriochimico.it/italiano/osservatorio_informa/annuari_osservatorio.asp).
 [5] J.E. Bailey, *Science*, 1991, **252**, 1668.

- [6] J.D. Stewart, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1997, **14**, 67.
 [7] G. Chotani *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1543**, 434.
 [8] S.Y. Lee *et al.*, *Metabolic Engineering*, Chapters 12 & 13, 1999, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
 [9] F. Randez-Gil *et al.*, *TIBTECH*, 1999, **17**, 237.
 [10] S. Ostergaard *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, **64**, 34.
 [11] A.L. Demain, *TIBTECH*, 2000, **18**, 26.
 [12] D.E. Stafford *et al.*, *Proc. of the Natl. Acad. of Sciences USA*, 2002, **99**(4), 1801.
 [13] D. Porro *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 1995, **11**, 294.
 [14] D. Porro *et al.*, *WO 9914335*.
 [15] D. Porro *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4211.
 [16] M.M. Bianchi *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 5621.
 [17] D. Porro, M. Sauer, *WO 0210425*.
 [18] L. Brambilla *et al.*, *WO 0041477*.
 [19] K. Li, J. Frost, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10545.
 [20] M. Hasslacher *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 1997, **11**, 61.
 [21] H.J.M. Gijzen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 8422.
 [22] G. DeSantis *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9024.
 [23] A.M. Thayer, *C&EN*, 1998, November 23, **76**, 17.