

di Danilo Porro, Paola Branduardi,
Luca Brambilla, Lilia Alberghina
Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze
Università di Milano-Bicocca
danilo.porro@unimib.it

BIOTECNOLOGIE BIANCHE: UN'ESPERIENZA ITALIANA

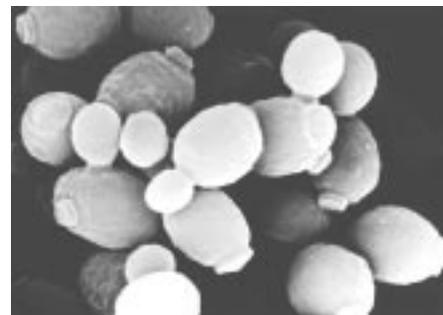
Dopo le biotecnologie farmaceutiche e quelle agricole, rispettivamente dette biotecnologie “rosse” e “verdi”, si parla ora da qualche anno di biotecnologie bianche o, negli Stati Uniti, di “terza ondata” delle biotecnologie, intendendo con questa definizione indicare le biotecnologie industriali. Esse trovano applicazioni in molti settori e, dal momento che utilizzano tipicamente materie prime ottenute da fonti rinnovabili, sono tecnologie ad elevata accettabilità sociale. La ricerca italiana ha dimostrato di poter competere in questo campo a livello internazionale.

Nello scenario attuale, gli interessi e gli sviluppi delle biotecnologie industriali (BI) [1, 2] si basano principalmente sull'uso di microrganismi o parti di essi, utilizzo reso possibile dai progressi ottenuti da microbiologia, biochimica, genetica, biologia molecolare, chimica delle fermentazioni, in sinergia con l'innovazione delle tecniche della chimica organica sintetica e dell'ingegneria di processo. Molti microrganismi producono naturalmente composti di interesse biotecnologico che sono difficili da sintetizzare o la cui produzione avrebbe delle ripercussioni negative per l'ambiente. Lo fanno però in quantità minime tali da rendere impraticabile una loro purificazione e/o un loro utilizzo. La produzione di un composto da parte di un microrganismo può essere influenzata modulando le condizioni ambientali esterne o interne della cellula, rispettivamente modificando le condizioni di crescita o

attraverso mutagenesi casuale e successiva selezione dei ceppi maggior produttori. Gli esempi più classici di queste strategie si riscontrano nella produzione di antibiotici, amminoacidi, vitamine, alcoli, acidi organici, solventi, prodotti nutraceutici, cosmetici, enzimi, materie plastiche biodegradabili, ecc. L'introduzione delle tecniche di DNA ricombinante ha consentito di ovviare alla casualità della mutagenesi consentendo di intervenire in modo mirato sul patrimonio genetico di questi microrganismi.

Alcuni Paesi stanno investendo molto sulle BI, primi tra tutti Stati Uniti e Giappone (fonti consultabili per una visione della problematica: [3-7]).

La prima importante e tangibile conseguenza di tali investimenti è stata lo sviluppo di bioprocessi e conseguente commercializzazione di due bio-materiali innovativi, entrambi prodotti a partire da materie prime rinnovabili, come il glucosio deri-



vato dal mais [1, 8]:

- a) Sorona 3GT, una nuova fibra sintetica poliesterica che utilizza come monomero l'1,3-propandiolo ottenuto per via fermentativa con un microrganismo opportunamente ingegnerizzato;
- b) NatureWorks, una plastica biodegradabile a base di PLA (acido polilattico), il cui monomero è invece ottenuto utilizzando ceppi selvatici.

Si è sviluppata inoltre la produzione di bioenergia a partire da materiale di scarto

derivante sia dall'industria agro-alimentare sia da rifiuti domestici (es. frutta, verdura, scarti del giardino), con l'ulteriore vantaggio di avere ridotto le emissioni di gas serra. Nell'aprile 2004 è stata annunciata la produzione di bioetanolo da substrati complessi, quali zuccheri pentosi, bagassa (residuo della lavorazione della barbabietola da zucchero) e cellulosa (paglia e carta). Il bioetanolo può essere usato anche nei motori a combustione in diverse forme, generalmente mescolato alla normale benzina [2, 4].

Le nostre ricerche

Quasi tutti i bioprodotti citati nell'introduzione possono essere ottenuti anche a partire dal greggio. Se analizziamo la quantità di riserve di petrolio dichiarate, ci troviamo di fronte ad una sorta di paradosso, con il petrolio che viene consumato ad una

naturale in sessantacinque, il carbone in circa duecento. La ricerca del nostro laboratorio è dedicata da alcuni anni allo sviluppo di prodotti e processi a partire da fonti rinnovabili. A tale scopo, ci siamo dedicati allo studio dell'espressione di geni eterologhi nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo ampiamente conosciuto dal punto di vista genetico, biochimico, metabolico e fisiologico, caratterizzato da un'elevata velocità di crescita e GRAS (Generally Recognized As Safe).

Di seguito una sintetica descrizione dei principali progetti e conseguenti risultati.

Durante i processi lattiero-caseari, la reazione fondamentale della trasformazione del latte è la fermentazione del

dotti ad alto valore aggiunto (es. bioetanolo), qualora il lievito sia stato a tale scopo ingegnerizzato (nel corredo proteico di *S. cerevisiae* non è infatti riscontrabile un'attività β -galattosidasi, indispensabile per idrolizzare il disaccaride lattosio).

Fermentazioni condotte con lieviti geneticamente modificati permettono la produzione di biomasse e/o etanolo da lattosio con alte rese di conversione ed elevate produttività [10]. Grazie alla simultanea espressione di attività eterologhe β -galattosidasi e glucoamilasi, è stato inoltre



velocità senza precedenti e le sue riserve che sono rimaste praticamente allo stesso livello di trent'anni fa, grazie alla scoperta di nuovi giacimenti. Tuttavia queste riserve di petrolio sono ubicate in posti sempre più difficili da raggiungere, difficoltà che si riflette in una continua ascesa del costo di estrazione, che a sua volta si ripercuote sul costo del petrolio. Sin dal 2003, le fonti di energia rinnovabili, confrontandone il prezzo in base al peso, costano circa la metà delle fonti di origine fossile (petrolio 175 euro/ton; mais 80 euro/ton; paglia 20 euro/ton; zucchero 180 euro/ton) ma, soprattutto, bisogna ricordare che le fonti di petrolio mondiale non sono destinate a durare per sempre. In uno studio approfondito sulla situazione energetica mondiale realizzato dal World Energy Council [9] vengono esaminati diversi scenari futuri. Si prevede che il petrolio si esaurirà in cinquant'anni, il gas

lattosio ad acido lattico, generalmente ottenuta con batteri lattici appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Leuconostoc*, in quanto provoca la formazione del caglio da parte della rennina, previene la crescita di microrganismi indesiderati, influenza i cambiamenti enzimatici che determinano le caratteristiche del prodotto finale e induce la separazione del siero (frazione idrosolubile). In seguito viene allontanato il siero, che costituisce il prodotto "secondario" più abbondante. Le vie di utilizzo del siero sono numerose, alcune già tradizionalmente sfruttate, quali alimentazione dei suini, essiccazione, recupero delle frazioni proteiche. Una delle prospettive più promettenti è quella di utilizzare il lievito *S. cerevisiae*, veicolando quindi una sostanza di scarto (il siero, ancora ricco di lattosio) nella produzione di biomasse (additivi delle derrate alimentari) o di pro-

sviluppati un ceppo di lievito *S. cerevisiae* in grado di crescere contemporaneamente su lattosio ed amido [11].

È stato più recentemente sviluppato nei nostri laboratori un processo potenzialmente competitivo a livello industriale per la produzione di acido L-lattico [12]. 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, farmaceutica, fitosanitaria e della chimica fine. La produzione industriale attuale di acido L-lattico sfrutta le capacità biosintetiche naturali di microrganismi batterici selvatici (*Lactobacillus lactis*). Purtroppo i bassi valori di pH conseguenti alla produzione dell'acido lattico ($pK_a = 3,78$) hanno un effetto negativo sulla crescita dei microrga-



nismi utilizzati, con conseguente limitazione della produzione stessa. Tale inconveniente viene aggirato mantenendo il pH del processo a valori relativamente alti (pH = 5-5,5). 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, unico prodotto con un interesse commerciale, dal suo sale richiede un ulteriore stadio di processo, costituendo quindi un costo aggiuntivo molto rilevante.

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 *S. cerevisiae* cresce e rimane metabolicamente attivo anche a bassi valori di pH (3-3,5). L'inserzione in cellule di lievito del gene eterologo LDH-A, codificante l'enzima lattico deidrogenasi bovina, consente nel microrganismo così ingegnerizzato la bioconversione del piruvato, un composto principale del metabolismo di ogni cellula, ad acido L-lattico [LA] (V. Figura a lato, attività 1). Al fine di poter incrementare la produzione (oltre 100 g/l), la produttività (fino a

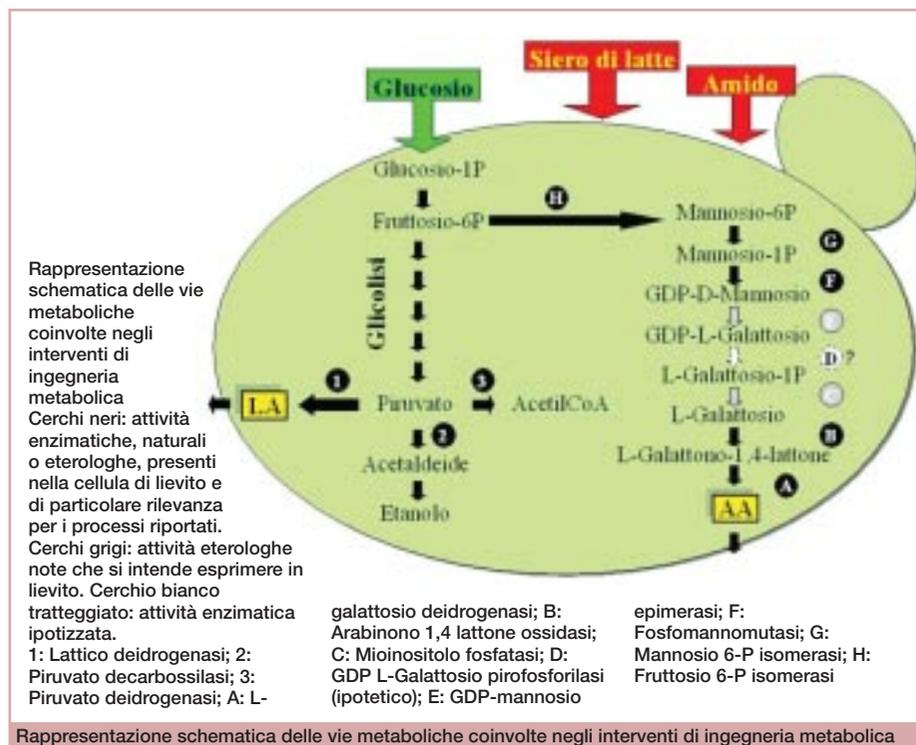
1 g/l/h), ma soprattutto la resa di conversione (fino all'85% del valore teorico, definito come grammo di acido lattico prodotto per grammo di glucosio consumato) è stato necessario sviluppare, studiare ed utilizzare lieviti ospite mancanti dell'attività piruvato deidrogenasi e/o piruvato decarbossilasi (Figura; attività 2 e 3) [13-14].

Sfruttando le stesse piattaforme scientifiche e tecnologiche sono attualmente in fase di sviluppo microrganismi ingegnerizzati per la produzione di acido ascorbico [AA], antiossidante naturale impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica, il cui mercato mondiale annuo supera le 80 mila tonnellate. L'acido ascorbico (vitamina C) è un metabolita indispensabile per diverse funzioni metaboliche e diventa un nutriente essenziale per quegli organismi, come l'uomo, incapaci di sintetizzarlo. Il processo produttivo che si intende sviluppare per la produzione di acido ascorbico (Figura) risulterebbe potenzialmente alternativo rispetto ai processi attualmente in uso. Tali processi si basano

su una sintesi (quasi) interamente di tipo chimico [15] o, in alternativa, su metodiche che risultano essere la combinazione di un processo fermentativo, realizzato con microrganismi ricombinanti che producono acido 2-cheto-L-gulonico, con stadi chimici convenzionali [16-17]. La via metabolica che porta alla sintesi di acido ascorbico in animali e piante produttrici non è stata ancora completamente delucidata.

Per confermare le diverse vie metaboliche naturali proposte [18] è necessario isolare alcune attività enzimatiche specifiche e/o identificare i geni che le codificano. Tali geni risultano essenziali per poter ingegnerizzare i lieviti per la produzione di acido ascorbico in quanto questi ultimi non ne producono naturalmente.

A tutt'oggi è stato possibile ottenere ceppi di lievito esprimenti differenti combinazioni di geni eterologhi di pianta (*Arabidopsis thaliana*), di eucarioti superiori (*Rattus norvegicus*) e microrganismi procarioti (*Zymomonas mobilis*), in grado di produrre acido ascorbico [19]. La produzione ottenuta, seppure di notevole importanza poi-



ché dimostra la fattibilità del processo, non può che essere ritenuta un punto di partenza in quanto il substrato fornito per tale bioconversione è L-galattosio, zucchero raro ed estremamente costoso. Gli attuali sforzi del laboratorio sono quindi rivolti al completamento dei passaggi ancora mancanti affinché la produzione di vitamina C possa avvenire da D-glucosio. Negli ultimi due anni alcuni di questi passaggi sono stati identificati in pianta [20-21] ed è attualmente in corso la valutazione della loro espressione eterologa in *S. cerevisiae* sul completamento del processo.

Conclusioni e prospettive

Le biotecnologie cosiddette "bianche" promettono di rivoluzionare l'intera industria manifatturiera, dalla scelta delle materie prime fino alla conservazione del prodotto finale. Anche in quei casi in cui un processo biotecnologico non è rivolto allo sviluppo di un nuovo prodotto, la riduzione dei costi di processo e la sostenibilità ambientale che ne possono derivare offrono spes-

so un vantaggio competitivo.

Uno studio della McKinsey [22] indica che la fetta di mercato delle BI aumenterà considerevolmente prima del 2010, soprattutto nella produzione di composti della chimica fine. Considerando l'industria chimica nel suo insieme, l'incidenza delle BI è attualmente intorno al 5%, valore destinato a crescere al 10-20% per il 2010, con prospettive di crescita future anche maggiori. Il grado di sviluppo delle BI dipenderà da un numero di fattori quali il prezzo del petrolio e degli scarti industriali, il grado di avanzamento tecnologico e le politiche di sviluppo in questo settore dei vari Paesi. Se tale sviluppo avverrà, come è auspicabile, si possono prevedere ripercussioni sull'economia, con un forte stimolo delle economie rurali, sull'ambiente, consentendo una riduzione delle emissioni di CO₂ e un allineamento al protocollo di Kyoto, sulla dipendenza dai Paesi produttori di greggio.

In questo contesto, il nostro laboratorio ha dedicato sforzi e risorse allo sviluppo di microrganismi ricombinanti che possano



costituire la base di partenza per lo sviluppo di nuovi processi biotecnologici. I risultati delle ricerche relative alla produzione di acido lattico ed ascorbico sono stati protetti da brevetti internazionali e/o domande di brevetto, la cui esclusività è stata successivamente ceduta, costituendo un esempio concreto di trasferimento tecnologico.

Ringraziamenti: Si ringrazia Carla Smeraldi per l'importante contributo editoriale alla stesura dell'articolo.

Bibliografia

- [1] Making waves in Biotechnology, Tonya Vinas, *Industry Week*, August 2004.
- [2] Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry, Vision paper of Royal Belgian Academy Council of Applied Science, January 2004 www.kvab.be/downloads/cawet/wg%2043%20-%20webstek.pdf
- [3] www.bioproducts-bioenergy.gov
- [4] Fostering the Bioeconomic Revolution in Biobased Products and Bio-energy: an Environmental Approach, Vision paper of the Biomass Research and Development Board, USA, January 2001 www.bioproductsbioenergy.gov/pdfs/strategicplan.pdf
- [5] A Survey of the Use of Biotechnology in US Industry. US Department of Commerce Technology Administration Bureau of Industry and Security, October 2003 www.technology.gov/reports/Biotechnology/CD120a_0310.pdf
- [6] Biomass Program, US Department of Energy www.eere.energy.gov
- [7] A European Technology Platform for Sustainable chemistry: the vision for 2020 and beyond document for the 9 November 2004 workshop to be held in Brussels www.cefic-sustech.org/files/Publications/ETP_sustainable_chemistry.pdf
- [8] BIO Biotechnology Industry Organisation www.bio.org
- [9] Global Energy Scenarios to 2050 and beyond, World Energy Council www.worldenergy.org
- [10] D. Porro *et al.*, *Biotechnol. Letters*, 1992, **14**, 1085.
- [11] C. Compagno *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **43**, 822.
- [12] D. Porro *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 1995, **11**, 294.
- [13] D. Porro *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4211.
- [14] M.M. Bianchi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 5621.
- [15] T.A. Reichstein Grussner, *Helv. Chim. Acta*, 1934, **17**, 311.
- [16] J.F. Grindley *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **54**, 1770.
- [17] T. Fowler, S. Causey, *WO 98/59054*.
- [18] V. Valpuesta, M.A. Botella, *TIPS*, 2004, **9**(12), 573.
- [19] M. Sauer *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 6086.
- [20] B.A. Wolucka, M. Van Montagu, *The Journal of biological chemistry*, 2003, **278**, 47483.
- [21] W.A. Laing *et al.*, *PNAS*, 2004, **101**, 16976.
- [22] R. Bachmann, *New Value Creation Opportunities, Industrial Biotechnology*, McKinsey & Co. 2002.