

La **Biotecnologia** è l'insieme delle conoscenze e/o studio dei processi vitali che conducono allo sviluppo di attività manuali ed intellettuali indirizzate a trasformare una materia prima per produrre beni o prodotti che possono essere commercializzati e diffusi.

(Accademia dei Lincei ed Accademia Nazionale delle Scienze)

Si definiscono **Biotecnologie** quelle tecniche e quegli approcci sperimentali capaci non solo di generare nuove sostanze o prodotti, ma anche di migliorarli rendendoli più appetibili, più sofisticati, meno deperibili e più desiderabili.

Le **Biotecnologie** sono definite, in genere, **microbiche** poiché le **fabbriche biologiche** in cui avvengono le produzioni di **nuovi prodotti biotecnologici** sono proprio i **microrganismi**, che voi ben conoscete per averli studiati in Microbiologia, Biologia Applicata, Biologia Molecolare e Biochimica.

I **microrganismi** nel corso dei millenni si sono evoluti e si sono **differenziati** in numerosissime specie che hanno costruito la loro diversità attraverso lo sviluppo di specifiche attività metaboliche basate su un repertorio di attività enzimatiche differenti.

I **microrganismi** si sono **adattati** a vivere in ambienti diversissimi, da quelli più ricchi di nutrienti a quelli più estremi, e così hanno dovuto dotarsi di strutture cellulari adeguate, per proliferare in ambienti ostili o per competere in habitat ricchi di nutrienti, e di vie metaboliche opportune.

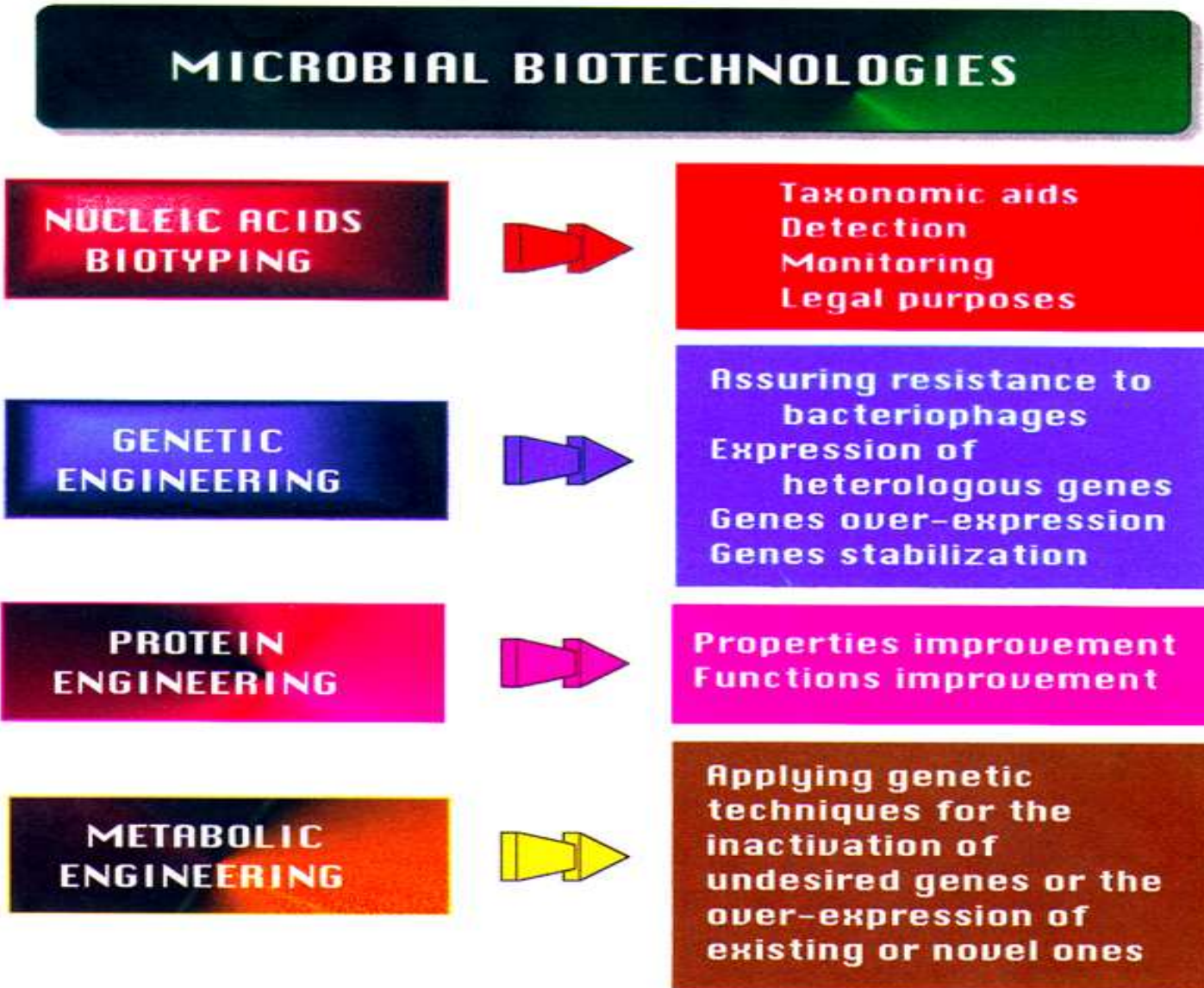
Recenti applicazioni dei microrganismi

- 1) **Bioleaching** o estrazione di metalli dai materiali di risulta delle miniere attraverso microrganismi che “lavorano” nel campo della **Geomicrobiologia**;
- 2) Sviluppo di radici delle piante da parte dei funghi micorrizi, microrganismi che “**lavorano**” per il **benessere** di organismi superiori;
- 3) Contributo al miglioramento e integrazione della **dieta** degli insetti da parte degli **endosimbionti**;
- 4) Ruolo del **Microbioma** nell'intestino (flora intestinale) dell'uomo.

Alcune applicazioni “ consolidate “ dei microrganismi nelle Biotecnologie:

- 1) Industria alimentare**
- 2) Industria farmaceutica**
- 3) Trattamento delle acque reflue**
- 4) Trattamento dei rifiuti e loro compostaggio**
- 5) Industria chimica**
- 6) Energia**
- 7) Protezione ambientale**

Alcune applicazioni “ specifiche “ dei microrganismi nelle Biotecnologie:



Le **Biotecnologie microbiche** nascono soprattutto dall'applicazione del concetto di **fermentazione**.

Si distinguono due tipi di fermentazione :

1) Fermentazione tradizionale

- Processi fermentativi per la produzione del vino, birra...
- Processi fermentativi per la lievitazione del pane
- Processi fermentativi per la conversione del latte in derivati

2) Fermentazione industriale

- Processi fermentativi in anaerobiosi per la produzione di etanolo, acido lattico, acetone, butanolo, glicerina
- Processi fermentativi in aerobiosi per la produzione di acidi organici (acido gluconico, acido glutammico)
- Processi fermentativi per la produzione di vitamine
- Processi fermentativi per la trasformazione di steroidi
- Processi fermentativi per la produzione di antibiotici

Alcuni capisaldi storici nel passaggio dall'empirismo al metodo sperimentale

- Nel 1856 **Louis Pasteur** deduce che la fermentazione alcolica è effettuata dai lieviti.
- Fra il 1877 e il 1881 **Robert Koch** introduce nuove tecniche per ottenere colture pure (terreni solidi, agar...).
- Nel 1877 **John Tyndall** scopre che alcuni bacilli danno origine a spore.
- Nel 1883 **Emil Christian Hansen** scopre diversi ceppi di lievito e tra questi alcuni particolarmente adatti alla produzione della birra lager (*Saccharomyces carlsbergensis*).
- Nel 1878 **Marcelin Berthelot** dimostra che il mezzo di coltura del lievito è capace di convertire il saccarosio in glucosio e fruttosio.
- Nel 1897 **Eduard Buchner** pubblica un lavoro fondamentale in cui definisce che la fermentazione è dovuta alla presenza dei lieviti, ma che è realizzata attraverso reazione catalizzate da enzimi. Fu questo passo decisivo nel determinare l'inizio della disciplina scientifica che oggi chiamiamo Biochimica.

Le fermentazioni anaerobiche

Trasformazione di processi fermentativi artigianali in fermentazioni industriali

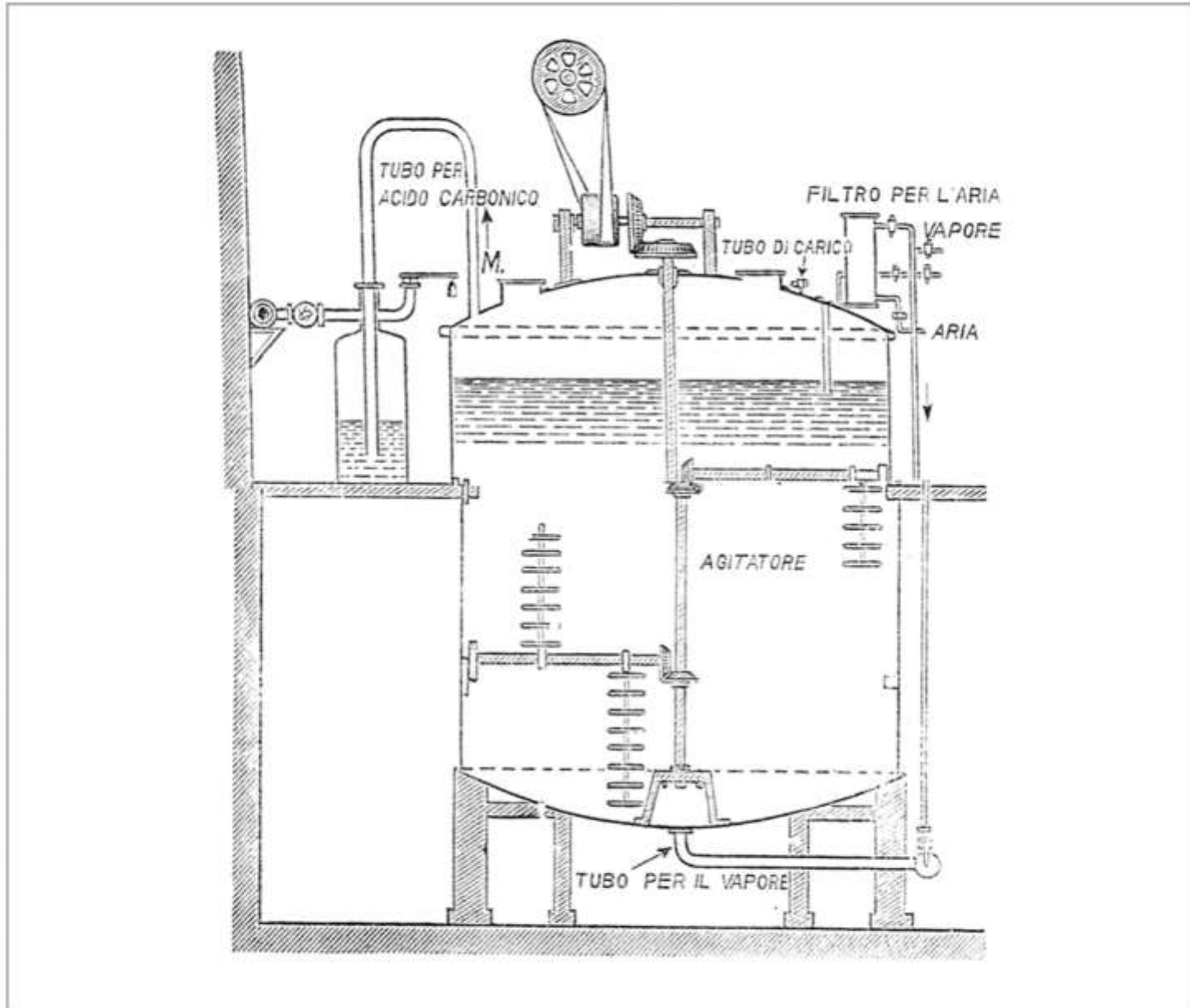
1) Etanolo

Nell'Ottocento veniva prodotto dalla barbabietola da zucchero, ma è nel Novecento che la produzione viene fortemente incrementata mediante l'uso di ceppi di lieviti molto produttivi e di terreni selettivi molto economici che consentivano una rapida crescita.

L'incremento della produzione di materie prime da cui produrre etanolo (in America dalle barbabietole, in Germania dalle patate) ha dato un enorme spinta alla produzione di etanolo. In Brasile e negli Stati Uniti, è a tutti noto, che l'etanolo, che viene prodotto a partire dall'eccesso di granturco dall'agricoltura, viene utilizzato come carburante, soddisfacendo così una notevole domanda interna di prodotti energetici per autotrazione.

La disponibilità di materia prima in surplus in campo agroalimentare ha permesso di aumentare la produzione di etanolo con il metodo Amylo che utilizza una cocoltura di lieviti e funghi (*Rhizopus*) in un unico fermentatore.

Fermentatore per la produzione di etanolo da granturco (Metodo Amylo)



Le fermentazioni anaerobiche

Trasformazione di processi fermentativi artigianali in fermentazioni industriali

2) **Acido lattico e lievito alimentare**

In Germania, nel primo conflitto mondiale, la richiesta di acido lattico era enorme per scopi bellici ed anche per necessità alimentari. Lo sviluppo del primo processo fermentativo industriale si deve a **Max Delbruck** che identificò nel *Lactobacillus delbrueckii* il miglior produttore di acido lattico.

Lo stesso **Delbruck** ideò un metodo per produrre composti azotati (necessari per la sintesi delle proteine) partendo dall'isolamento ed utilizzo di ceppi di lieviti capaci di fissare l'azoto inorganico presente come sali di ammonio nel mezzo di cultura. Mediante questo metodo fu possibile venire incontro alle esigenze del momento e ben il 60 % di proteine per l'alimentazione animale proveniva dalle colture di lievito durante la guerra.

Le fermentazioni anaerobiche

3) Produzione di acetone-butanolo

La necessità di produrre acetone per l'industria bellica in Inghilterra diede un impulso notevole alla ricerca biotecnologica applicata.

Chaim Weizmann isolò ed utilizzò un ceppo di clostridio, il *Clostridium acetobutylicum*, che idrolizzava e fermentava l'amido di mais producendo acetone e butanolo necessari per la produzione di esplosivi.

Gli impianti industriali in Inghilterra, Canada e stati Uniti furono poi riconvertiti, dopo la guerra, per la produzione di acetato di butile utilizzato come solvente nella preparazione delle vernici per automobili.

Le fermentazioni anaerobiche

4) Fermentazione glicerica

Nel 1911 **Neuberg**, nel cercare di identificare gli intermedi della fermentazione da glucosio ad etanolo e CO_2 , riscontrò un accumulo di piruvato che veniva poi convertito in acetaldeide e CO_2 . Ipotizzò che l'acetaldeide veniva infine ridotta a etanolo.

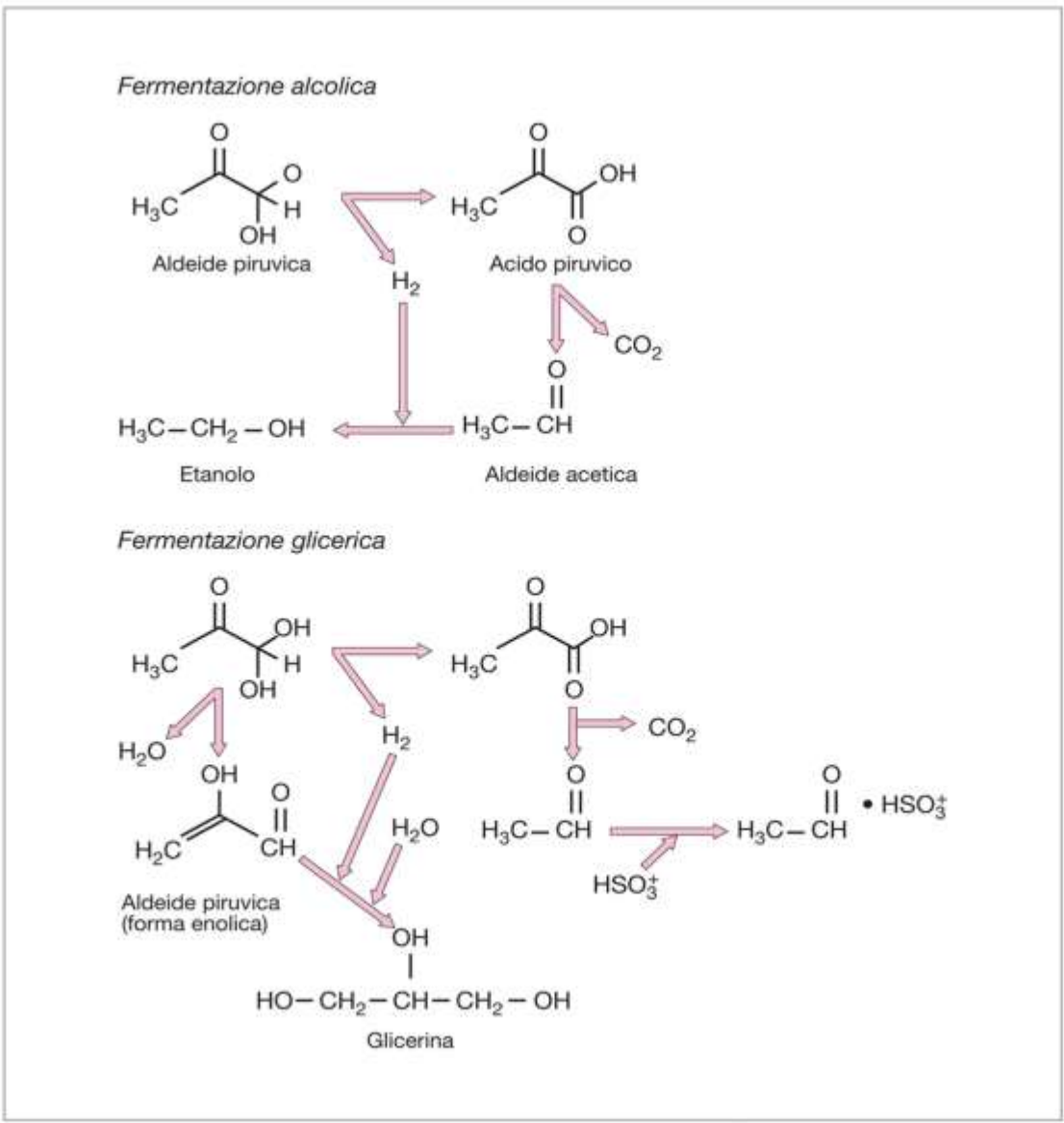
Aggiungendo una soluzione di bisolfito al sistema, **Neuberg** dimostrò che una parte dell'acetaldeide veniva dirottata verso la formazione di glicerina con una conseguente diminuzione dell'etanolo come prodotto finale.

A quel tempo, in Germania, all'indomani del primo conflitto mondiale c'era una grande richiesta di glicerina per la produzione di nitroglicerina che fino a quel momento era stata prodotta dalla saponificazione dei grassi.

Ecco perché nel 1915 **Connestain** e **Ludecke** realizzarono la fermentazione industriale di glicerina.

Una buona idea (modificare il metabolismo intermedio di un microrganismo) per uno scopo sbagliato (la guerra!!!).

Fermentazione alcolica e glicerica secondo Neuberg



Le fermentazioni aerobiche

- 1) Enzimi**
- 1) Produzione di acidi organici**
- 2) Vitamine**
- 3) Biotrasformazione degli steroidi**
- 4) Produzione di aminoacidi**
- 5) Produzione di metaboliti secondari**

Le fermentazioni aerobiche

1) Produzione di enzimi

Già nel 1890 un biochimico giapponese, **Jokichi Takamine**, fondatore della moderna industria biotecnologica giapponese, usando ceppi di *Aspergillus oryzae* riuscì ad ottenere un ottimo sostituto del malto e di questo più ricco di enzimi utili alla fermentazione nel campo della produzione di bevande a base di alcol.

Sull'onda di questi studi poi sono stati isolati e purificati enzimi quali **glucoamilasi** da aspergilli e **amilasi** da batteri da usare nella conversione dell'amido a glucosio da usare nei processi di fermentazione per la produzione di bevande alcoliche.

Nel campo dell'industria lattiero-casearia, poi, furono utilizzati batteri e funghi capaci di produrre **proteasi** necessari alla produzione di derivati del latte.

Un problema non secondario è stato quello di eliminare gli effetti collaterali dovuti all'uso di questi enzimi che scatenavano allergie sia negli addetti che nei consumatori. Gli enzimi venivano inclusi in granuli cerosi che non rilasciavano polveri.

Le fermentazioni aerobiche

2) Produzione di acidi organici

a. Acido citrico

Nel 1917 **James Currie** pubblicò un lavoro nel quale poneva le basi della moderna fermentazione industriale, avendo scoperto alcune specie di aspergilli che erano capaci di acidificare i mezzi di cultura e, in assenza di nutrienti quali azoto o fosfati.

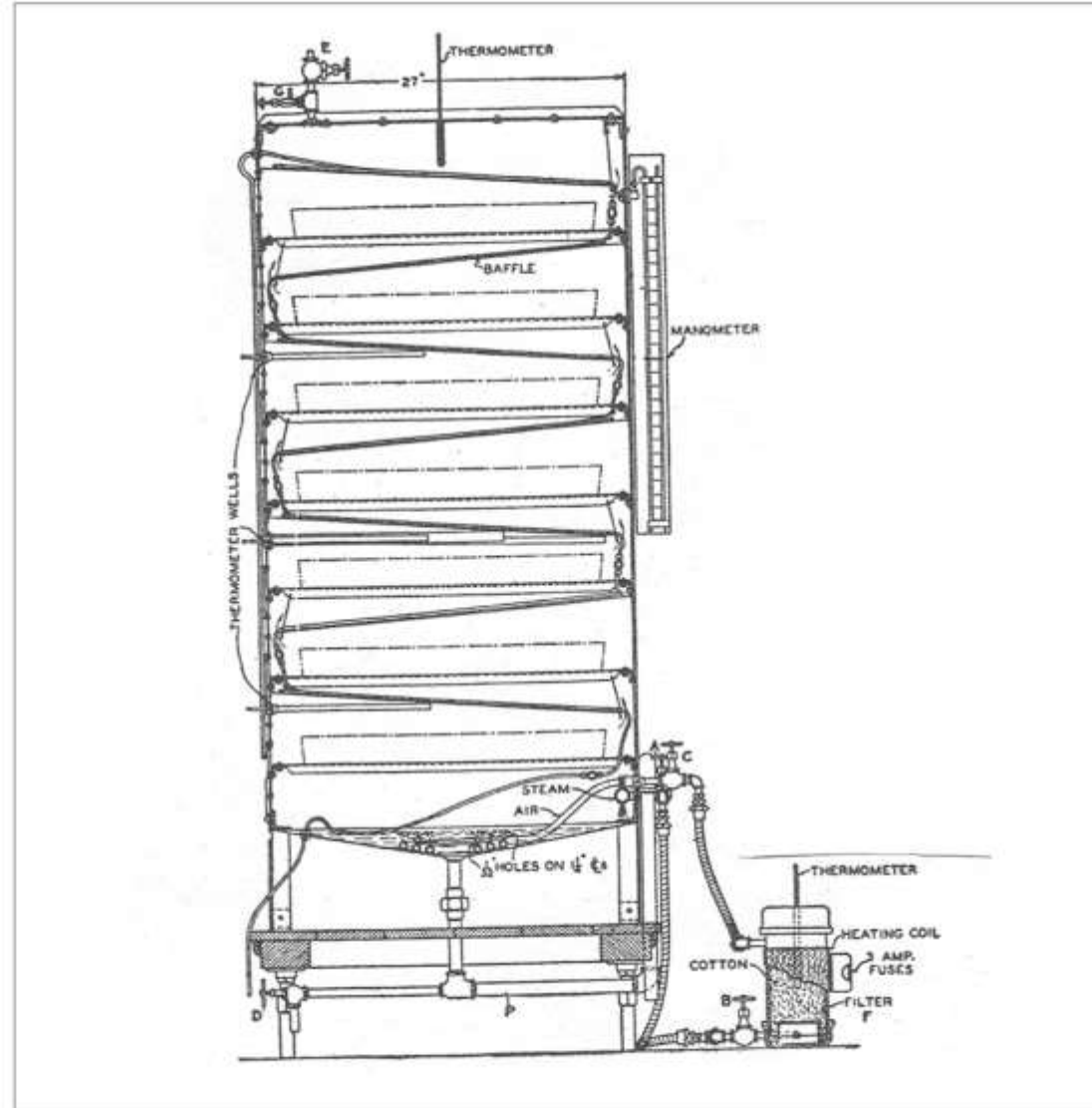
La maggior parte del prodotto era costituito da acido citrico la cui richiesta da parte dell'industria era notevolissima.

b. Acido gluconico

Successivamente **Oliver May** osservò che alcuni ceppi di aspergilli erano capaci di produrre acido gluconico in certe condizioni controllate (pH, presenza di azoto e forte aerazione). Sulla base di queste esigenze **May** ideò un particolare fermentatore industriale di tipo rotante con la possibilità di insufflare aria all'interno e quindi O_2 .

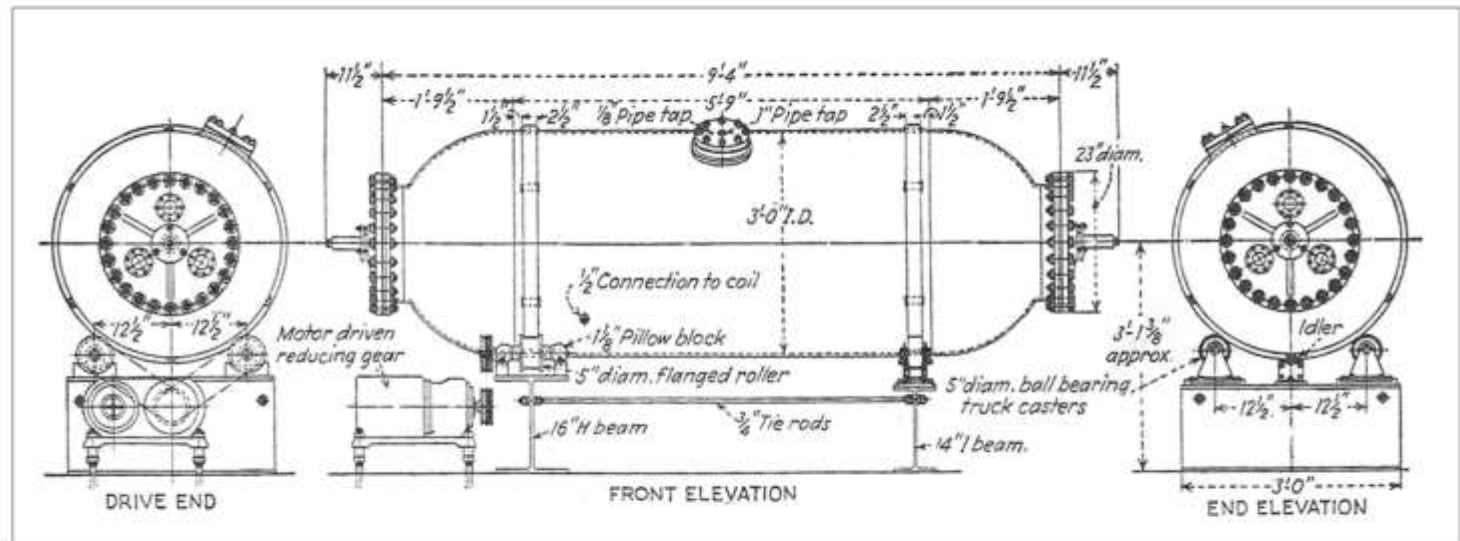
Le fermentazioni aerobiche

Fermentatore su superficie semisolida ideato da Currie



Le fermentazioni aerobiche

Fermentatore orizzontale rotante in coltura sommersa ed areata ideato da May



Le fermentazioni aerobiche

3) Vitamine

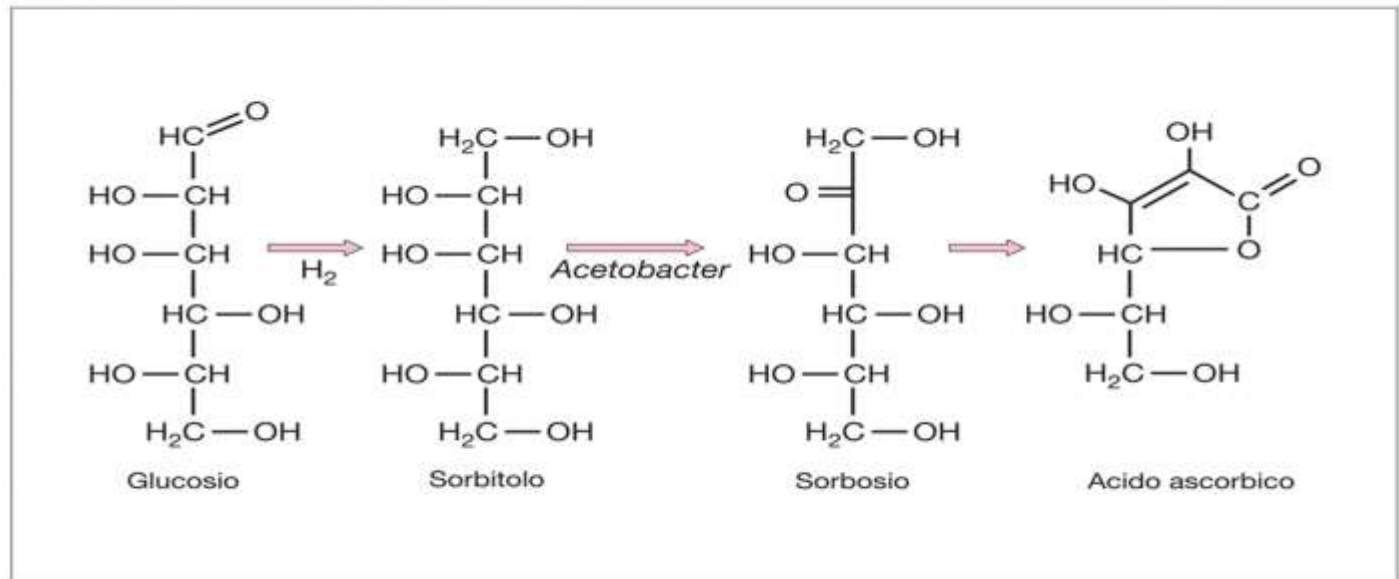
a. Vitamina B12

Dopo aver ottenuto la purificazione di Vit.B12 da fegato bovino, che comportava un costo eccessivo per un limitato ammontare di prodotto (mezzo grammo di vitamina partendo da una tonnellata di materiale !!!), gli scienziati hanno cercato di produrre per fermentazione questa vitamina. Le prime fermentazioni industriali furono condotte con diversi tipi di microrganismi (*Streptomyces olivaceus*, *Bacillus megatherium*). Il processo industriale di fermentazione nelle sue fasi (produzione di estratti, purificazione, analisi per spettrofotometria...) è stato sempre più implementato e le rese sono aumentate. Infine, la selezione di ceppi mutanti capaci di incrementare la produzione è stato l'atto finale che per es. ha portato i laboratori Merck ad utilizzare un ceppo di *Pseudomonas* particolarmente adatto. Il prezzo del prodotto nel giro di pochi anni e grazie a questi successi è stato diminuito di due ordini di grandezza.

Le fermentazioni aerobiche

b. Vitamina C

Dopo che **Szent-Gyorgy** aveva scoperto la struttura della vitamina C e verificato l'identità con l'acido ascorbico, **Tadeus Reichstein** propose una sintesi della vitamina C in cui il passaggio fondamentale, e cioè l'ossidazione da sorbitolo a sorbosio, era operato dall'*Acetobacter*.



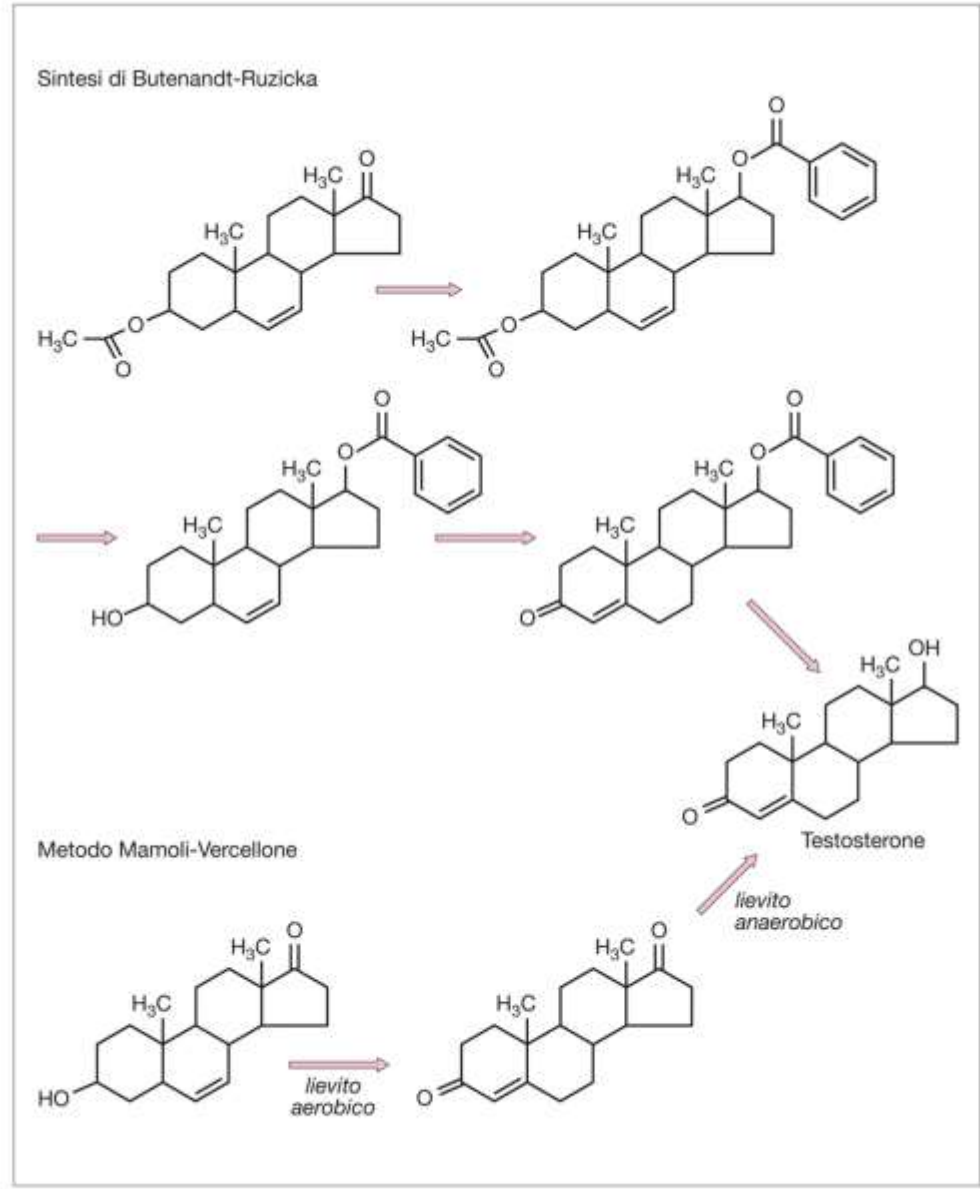
Le fermentazioni aerobiche

4) **Biotrasformazione degli steroidi**

Nel 1937 **Mamoli** e **Vercellone** dimostrarono che colture di lievito potevano portare alla produzione di ormoni steroidei ed in particolare di testosterone. Successivamente, studi sono stati condotti per produrre altri ormoni steroidei a funzione biologica da fermentazione industriale (cortisone, idrocortisone..) utilizzando microrganismi in presenza di ossigeno (*Rhizopus arrhizus*).

In questo modo **Peterson** e **Murray** riuscirono a trasformare il progesterone in 11alfa-idrossiprogestrone, rendendo ancor più facile la formazione di cortisone e idrocortisone che hanno proprio la caratteristica della presenza dell'O₂ sul carbonio in pos.11.

Le fermentazioni aerobiche



Le fermentazioni aerobiche

5) **Produzione di aminoacidi**

Già nel 1944 l'utilizzo di ceppi mutanti per la produzione di molecole complesse quali antibiotici, vitamine... producevano quantità minimali di aminoacidi (lisina e treonina).

Successivamente, la conoscenza delle vie biosintetiche di aminoacidi e dei meccanismi regolatori ha fornito gli strumenti più adatti per sviluppare ceppi mutanti e selezionati su terreni selettivi.

Infatti, attraverso l'eliminazione di meccanismi di regolazione ed il blocco delle diramazioni che utilizzavano intermedi comuni per produrre aminoacidi, si riusciva ad ottenere un numero crescente di nuovi aminoacidi.

Le fermentazioni aerobiche

6) Produzione di metaboliti secondari : gli antibiotici.

Dopo gli studi di **Fleming** su *Penicillium notatum* ed altri scienziati che hanno posto le basi per l'uso industriale di microrganismi per la produzione di antibiotici, si deve aspettare l'avvento degli anni '50 per realizzare in quantità industriale questi composti così essenziali in medicina.

L'uso di fermentatori sterili, con agitazione meccanica e con analizzatori in fase per monitorare i prodotti e la loro qualità facilitò estremamente il lavoro. Un passo decisivo fu compiuto nella direzione di una maggiore e diversificata produzione di antibiotici quando **Selman Waksman** mise a punto la tecnica dello screening. Essa consisteva nell'isolare dal suolo streptomiceti, che, su un terreno di coltura solido, avevano la capacità di interferire con la crescita di microrganismi patogeni cresciuti sulla stessa piastra di agar.

Le fermentazioni aerobiche

Il procedimento di screening diede risultati eccezionali, poiché negli anni si riuscì a scoprire e a produrre :

- 1945-1950 : cloramfenicolo, clorotetraciclina, ossitetraciclina;
- 1951-1955 : eritromicina, tetraciclina, spiramicina, amfotericina B;
- 1956-1960 : kanamicina, mitomicina, novobiocina, vancomicina, rifamicina B.

La maggior parte degli antibiotici fu scoperta grazie a ceppi di *Streptomyces*, ma anche grazie a batteri e funghi.

Dopo un decennio furono circa 2000 gli antibiotici che furono scoperti. Di questi solo una parte minoritaria diedero vita a prodotti degni di essere usati per scopi clinici.

Ingegneria genetica e DNA ricombinante

Tabella 1.1 Prodotti ricombinanti approvati e commercializzati negli anni ottanta.

Approvazione FDA	Prodotto	Azienda	Uso
1982	Insulina umana	Genentech	Cura sintomatica del diabete
1985	Ormone umano della crescita	Genentech	Cura del nanismo
1986	α -interferone	Biogen	Antivirale (epatite C)
1986	Primo vaccino ricombinante	Chiron	Immunizzazione da virus epatite B
1987	TPA-attivatore del plasminogeno	Genentech	Trombolitico
1989	Eritropoietina	Amgen	Stimolazione produzione eritrociti
1991	G-CSF fattore stimolazione granulociti	Amgen	Neutropenia indotta da chemioterapia antitumorale

Che cosa si fa oggi con le Biotecnologie microbiche ?

- 1) Metaboliti secondari utilizzati in medicina
(antibiotici, antibiotici antitumorali, immunosoppressivi, statine)**
- 2) Metaboliti secondari utilizzati in zootecnia (antiparassitari, adiuvanti della crescita, antibiotici)**
- 3) Acidi organici (acido citrico, acido lattico)**
- 4) Aminoacidi (acido glutammico, lisina, treonina, fenilalanina)**
- 5) Vitamine (acido ascorbico, riboflavina)**
- 6) Enzimi**
- 7) Farmaci da DNA ricombinante**
- 8) Etanolo**