Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
127° (2009), Vol. XXXIII, P. II, t. I, pp. 235-246

GIOVANNI SCHIPPA*

Potenziale di innovazione delle biotecnologie nel settore agroindustriale

Nel 1980 la «Cassa del Mezzogiorno» affidò ad un team di ricercatori dell'Università degli Studi dell'Aquila, di Roma e dell'Università di Milano, prevalentemente appartenenti all'area dell'Ingegneria Chimica e delle Scienze Biologiche, nonché ad esperti dell'Ente Regionale di Sviluppo Agricolo (ERSA) oggi ARSSA[1], il compito di eseguire una analisi di fattibilità per la localizzazione in Abruzzo di un *Centro Biotecnologico* e questo quando in quegli anni il termine *Biotecnologia* non aveva ancora una precisa definizione. Quella oggi largamente accettata l'ha formulata l'Assemblea Generale dell'EFB (European Federation of Biotechnology) nel 1989 che così suona:

«*La Biotecnologia è l'integrazione di scienze biologiche e dell'ingegneria allo scopo di utilizzare organismi, cellule, loro componenti o analoghi molecolari per l'ottenimento di beni e servizi*».

Da questa definizione emergono chiaramente due concetti fondamentali: il primo stabilisce che l'area scientifica coperta dalle biotecnologie è fortemente interdisciplinare, il secondo stabilisce che i risultati delle ricerche nel settore delle biotecnologie possono avere ricadute in prodotti e servizi di ampio respiro.

Le ricerche e le intuizioni degli addetti ai lavori avevano evidenziato, fin dagli anni settanta, che le ricadute potevano interessare vasti settori delle attività umane: da quelle legate ai processi di produzione di prodotti del *primario* e degli alimenti in particolare, nei quali le biotecnologie vantavano antichissime tradizioni, a quelle legate alla produzione di prodotti e sistemi utilizzati per preservare la salute di tutti gli esseri viventi.

* Professore Emerito Università dell'Aquila. Consulente del Centro di Ricerche Applicate alla Biotecnologia di Avezzano. E-mail: schippa.crab@tuttopmi.it

[1] Agenzia Regionale per i Servizi di Sviluppo Agricolo.

Oggi le biotecnologie sono largamente utilizzate anche per la produzione di prodotti industriali come materie plastiche, farmaci, detergenti, surfattanti, compost, attivatori biologici, biogas, bioalcol etc. il cui utilizzo è spesso legato alla protezione dell'ambiente.

Non era certo facile in quel periodo fare scelte per stabilire lo specifico settore di competenza di un Centro di Ricerche che doveva operare in un settore scientifico fortemente interdisciplinare, che per di più stava tumultuosamente evolvendo e dove ogni giorno nuove scoperte sembravano indirizzare le attività produttive in una direzione piuttosto che in un'altra.

Il Team, dopo una attenta indagine estesa ai centri di ricerca dei paesi industrializzati e dopo i necessari approfondimenti, arrivava alla conclusione che l'istituendo *Centro Biotecnologico* doveva operare in un settore, allora trascurato negli altri Paesi, ovvero nel settore della *Ingegnerizzazione dei Processi Biotecnologici* in particolare in quelli più strettamente legati al settore Agroindustriale.

L'Analisi di Fattibilità fu portata a termine nel 1981 ed accolta positivamente dagli Enti preposti alla sua valutazione (CNR, Cassa del Mezzogiorno).

La realizzazione del Centro e la formazione dei ricercatori che dovevano operare presso il Centro stesso fu finanziata con il Piano di Intervento PS 35/Ricerca, approvato dal CIPE il 29 gennaio 1983. La progettazione e la costruzione del Centro fu affidata ad un Consorzio (Consorzio di Ricerche Applicate alla Biotecnologia - CRAB) i cui soci erano, oltre all'Università degli Studi dell'Aquila, l'ARSSA, la Provincia dell'Aquila, il Comune di Avezzano e la Comunità Montana Marsica 1.

La gestione effettiva di tutta l'operazione fu delegata ad un gruppo di Docenti dell'allora Istituto di Chimica Applicata ed Industriale, oggi Dipartimento di Chimica, Ingegneria Chimica e Materiali, alcuni dei quali ebbero, successivamente, anche l'onere della gestione del Centro di Ricerca. Tutti avevano collaborato alla redazione dell'Analisi di Fattibilità ed avevano quindi ben chiaro l'obiettivo da raggiungere e gli ostacoli da superare per realizzare un Laboratorio che permettesse di ricavare tutti i valori dei parametri termodinamici, cinetici ed economici necessari per progettare e dimensionare tutte le apparecchiature necessarie per la messa a punto di un processo produttivo nel settore delle biotecnologie cioè un *Laboratorio per l'Ingegneria di Processo*. Non bastava certo la sola conoscenza e padronanza delle cosiddette *Operazioni Unitarie* tipiche dell'ingegneria chimica ma occorrevano anche profonde conoscenze dei meccanismi delle reazioni legate alle trasformazioni biocatalizzate, comprese le trasformazioni ottenute con l'ausilio di microrganismi, ingegnerizzati o meno, la cui attività è strettamente legata alla loro sopravvivenza durante i bioprocessi. Infatti durante le biotrasformazioni, mediate da microrganismi, per garantire la vitalità di questi ultimi durante il processo, oltre alla materia prima da trasformare, vanno anche immessi i necessari nutrienti e ricreato nel bioreattore l'ambiente fisico/chimico ideale per la loro sopravivenza. I parametri di processo da controllare diventavano quindi numerosi e spaziavano dal tempo alla

temperatura e alla pressione, dal pH alla concentrazione dei singoli nutrienti, dalla pressione parziale dell'ossigeno o altri gas alla qualità e concentrazione delle sostanze in circolo etc.; il controllo di questi parametri diventava poi ancor più complesso nei processi continui. Questo ovviamente complicava anche l'utilizzo dei formalismi matematici che descrivono le operazioni di trasferimento di massa e di energia e la stessa valutazione dei parametri di processo.

Di tutto questo si doveva tenere conto per arredare il Laboratorio per l'Ingegneria di Processo del CRAB, che di seguito verrà indicato come *Laboratorio di Processo*, con Biorettori Pilota.

Altrettanto complesso e delicato era il dimensionamento delle Unità Operative Pilota (UOP) necessarie per il pretrattamento (*Upstream*) e la estrazione e purificazione (*Downstream*) rispettivamente delle materie prime di alimentazione e dei prodotti ottenuti dalla bioreazione. Tutti gli impianti e le apparecchiature di questo originale laboratorio dovevano essere strumentate per permettere non solo il controllo delle operazioni che dovevano avvenire al loro interno ma anche il rilevamento in continuo dei dati di processo e la loro trasmissione ad un Centro di Elaborazione Dati e di Sviluppo di Processo (CAD, CAM).

Poiché lo scopo del Centro era quello di realizzare nuovi prodotti e nuovi processi principalmente nel settore agroalimentare tutte le apparecchiature e gli impianti da acquisire dovevano essere quelle tipiche delle cosiddette *Mild Tecnologies* dovevano cioè operare in condizioni di temperatura, pressione ecc. tali da non alterare o inquinare le sostanze biologiche che fluivano al loro interno. C'erano poi due condizioni fondamentali da rispettare; quella che le singole Unità Operative Pilota da inserire nel Laboratorio di Processo avessero un ampio margine di flessibilità e l'altra che fossero compatibili e collegabili fra di loro onde simulare un numero teoricamente infinito di bioprocessi.

Ho accennato solo ad alcuni dei problemi che è stato necessario risolvere per definire tutte le specifiche necessarie per indire le numerose gare per acquisire tutte le Unità Operative Pilota che occorrevano per realizzare il Laboratorio di Processo, che oggi rappresenta il «*core*» del Centro di Ricerche Applicate alla Biotecnologia di Avezzano.

Nella fig. 1 il Centro è rappresentato sottoforma di *diagramma di flusso*. L'area cerchiata in rosso rappresenta il Laboratorio di Processo. Esso interagisce sia con i laboratori necessari alla caratterizzazione della sostanze che fluiscono all'interno delle singole UOP nonchè alla raccolta dei valori ed alla elaborazione dei parametri di processo e sia con tutti i servizi necessari al buon funzionamento degli impianti.

Come evidenziato nella figura nel Laboratorio di Processo è possibile utilizzare tutte o parte dell'Unità Operative Pilota in esso presenti. Questa flessibilità degli impianti ha permesso di sviluppare ricerche oltre che nel settore delle biotecnologie anche in quello delle Mild Technologies oggi largamente utilizzate per la preparazione di nuovi alimenti e nuovi farmaci.

Nelle figure 2, 3, 4 sono illustrate le immagini di alcune delle Unità Operative Pilota utilizzate nel Laboratorio di Processo.

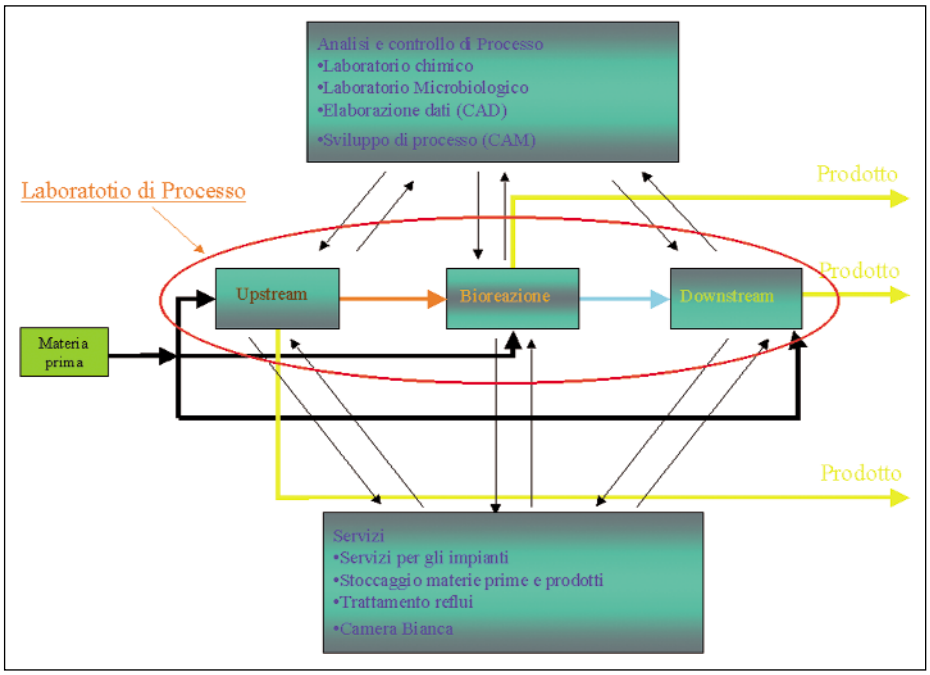

Fig. 1. Diagramma di flusso del Laboratorio di Processo.

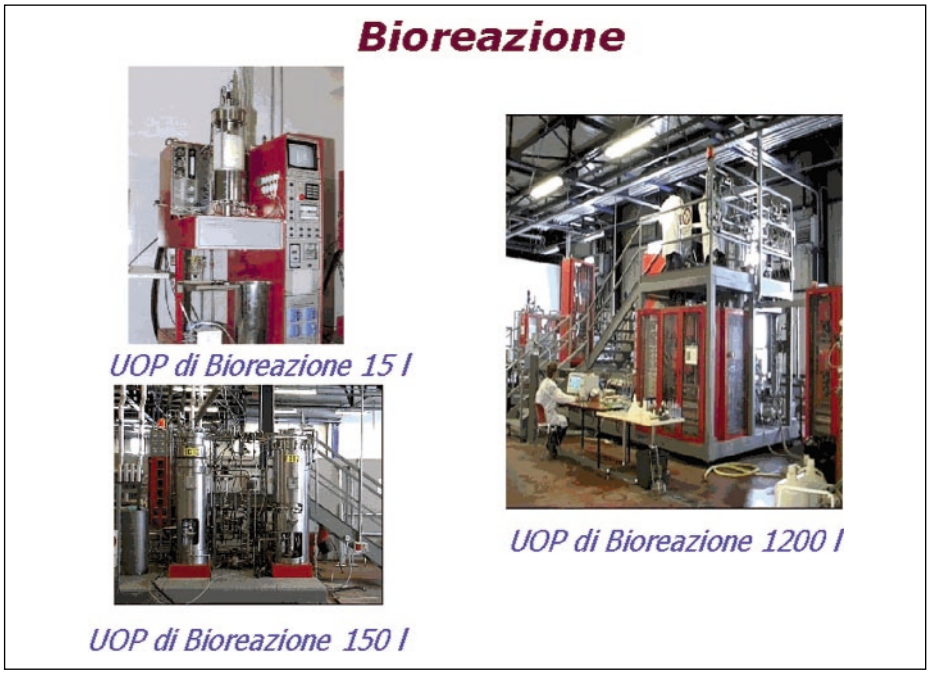

Fig. 2. Esempi di UOP presenti nel «Laboratorio di Processo» (Bioreazione).

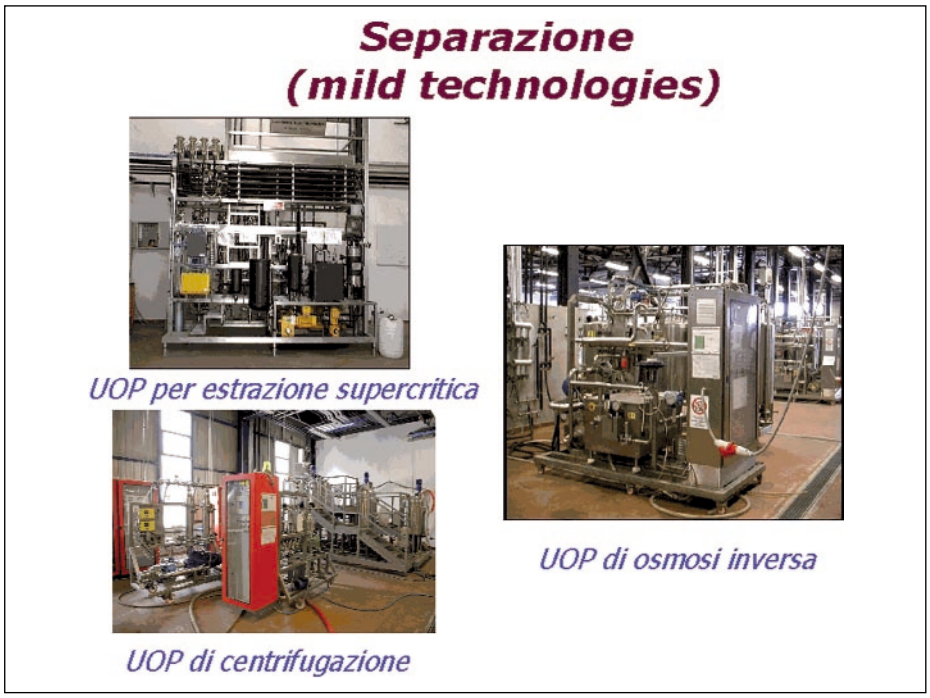

Fig. 3. Esempi di UOP presenti nel «Laboratorio di Processo» (upstream/downstream).

Fig. 4. Esempi di UOP presenti nel «Laboratorio di Processo» (upstream/downstream).

Da quando ha iniziato ad operare concretamente, circa 13 anni fa, Il CRAB ha acquisito complessivamente commesse da Enti pubblici (attraverso Bandi nazionali ed europei) e da numerosi Enti privati per un totale di euro 18.123.644,6 ed ha cofinanziato ricerche per euro 3.265.242,88 aiutando così l'Abruzzo ad utilizzare al meglio le risorse provenienti dall'Europa.

Nelle figure 5, 6 e 7 che seguono vengono sinteticamente illustrati i risultati di tre esempi di ricerche condotte dal CRAB. Nella figura 5 è riportato lo schema di processo per la produzione di una bevanda a base di vino dealcolato. E' interessante notare che in questo caso si utilizza la sola UOP che realizza l'arricchimento del prodotto nelle molecole di interesse mediante l'operazione di *Osmosi Inversa*, semplificando così l'ottimizzazione delle variabili di processo. Rispetto al diagramma di flusso riportato nella figura 2 l'alimentazione passa attraverso il solo blocco di Downstream ed esce sottoforma di uno sciroppo che può essere utilizzato sia per la produzione di vino dealcolato che per la produzione di formulati ricchi in biomolecole con attività nutraceutica (Polifenoli etc).

Nella fig. 6 è riportato il processo per la produzione di una polvere vitale contenente batteri da utilizzare in agricoltura in sostituzione di prodotti di sintesi notoriamente inquinanti. I microrganismi potenzialmente utili, mediante un processo di

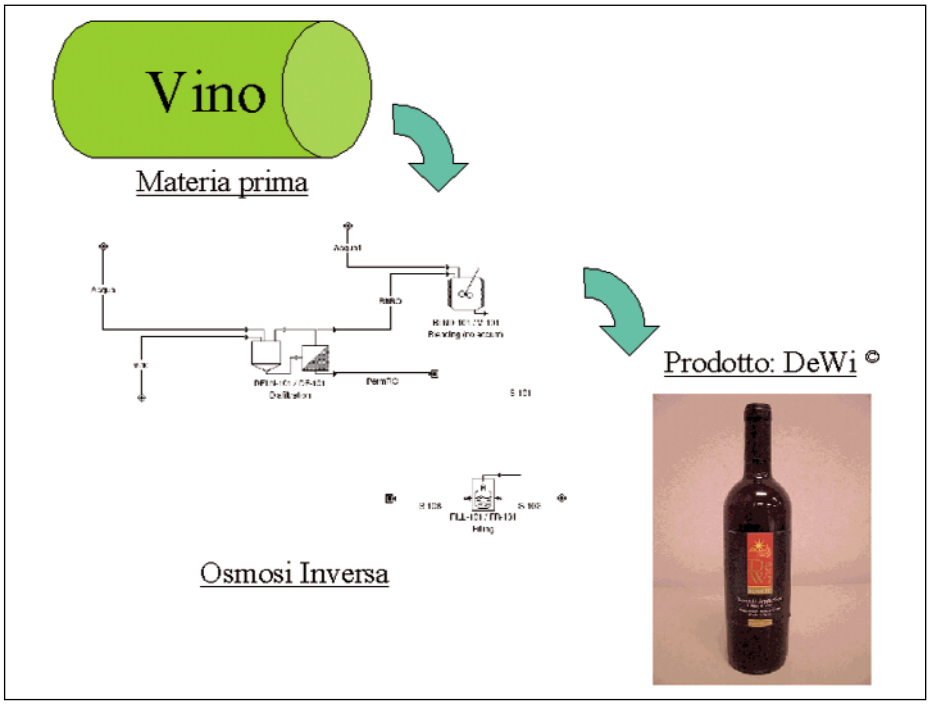

Fig. 5. Schema di processo per la produzione di Vino dealcolato (DeWi).

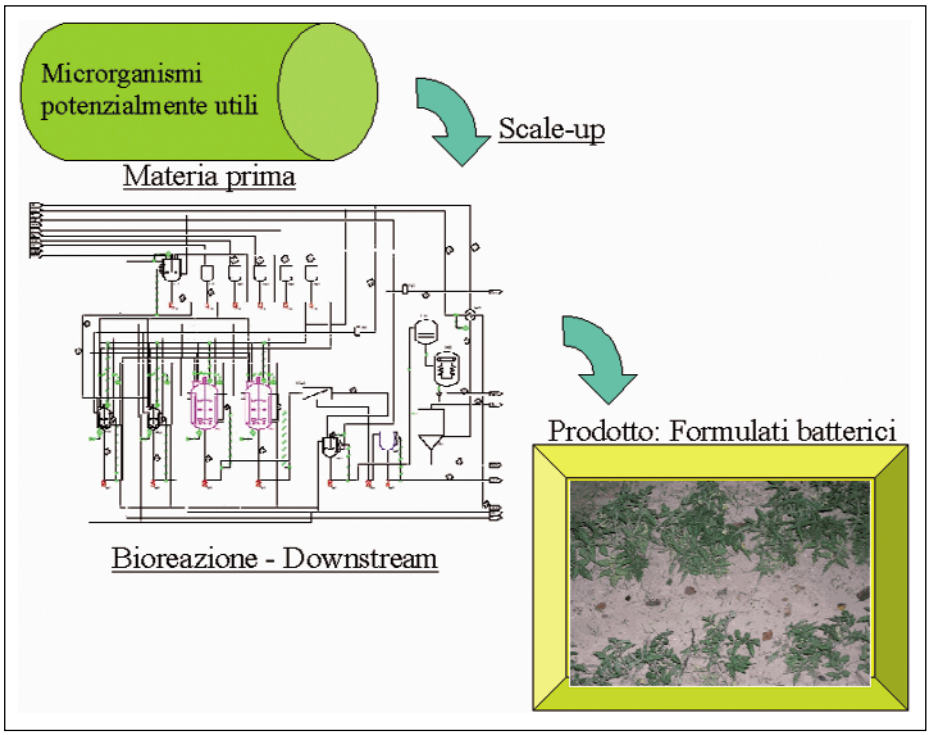

Fig. 6. Schema di processo per la produzione di attivatori biologici per il comparto agro-ambientale.

scale-up, vengono fatti crescere passando dalla piastra ad un reattore di 5 lt e successivamente ad uno di 200 lt ed infine in uno da 1200 lt. Il brodo contenente i batteri viene poi centrifugato e il sedimento trasformato in farina vitale mediante liofilizzazione o micronizzato mediante spry-dryer.

La raccolta e l'ottimizzazione dei numerosi parametri di processo è stata in questo caso abbastanza complessa in quanto l'alimentazione è costituita oltre che dalla materia prima anche da tutti gli ingredienti necessari per realizzare un ambiente favorevole alla crescita dei microrganismi nel bioreattore. Rispetto al diagramma di flusso riportato in fig. 2 l'alimentazione entra questa volta nel blocco «Bioreazione» ed entra successivamente nel blocco «Downstream» dal quale esce sottoforma di farina vitale che andrà opportunamente formulata per il suo impiego finale.

Nella fig. 7 è infine illustrato un processo per la produzione di glucosilonati, molecole naturali ad alto potere antiossidante, attraverso un processo biotecnologico.

Attualmente queste molecole vengono ottenute a partire dalle «Brassicacee» mediante un processo chimico basato sulla estrazione e successiva purificazione. L'industrializzazione di tale processo ha costi elevati in quanto, data la bassa con-

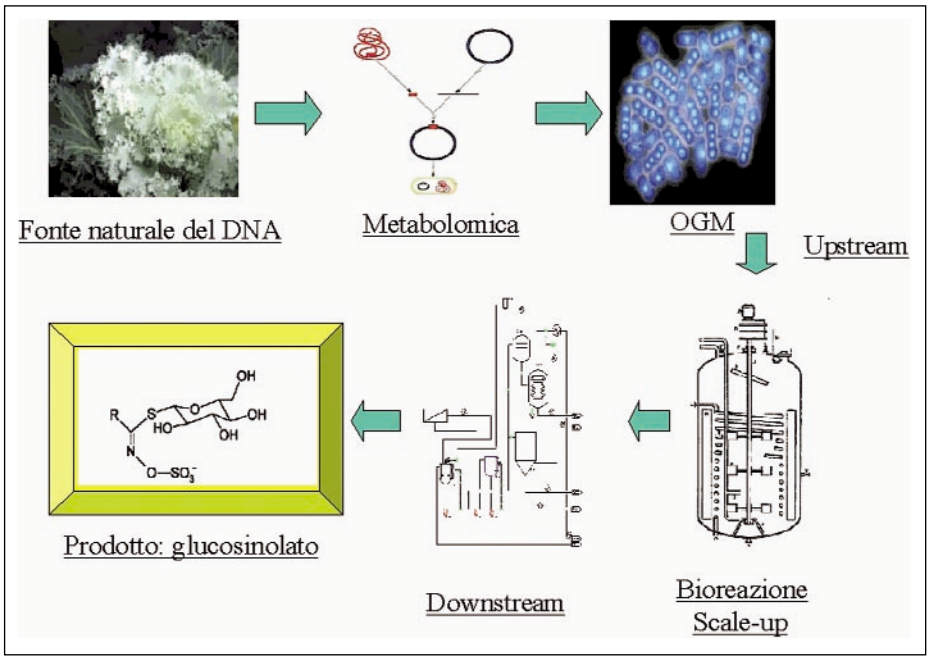

Fig. 7. Schema di processo per la produzione di glucosinolati per via biotecnologica.

centrazione dei glucosinolati nella pianta, è necessario trattare grandi quantità di vegetali, la purificazione della biomolecole è complessa ed infine la produzione è legata alla stagionalità delle brassicacee.

Il progetto di ricerca in itinere prevede invece la messa a punto di un processo che utilizza un lievito OGM ottenuto previa analisi della via metabolica della produzione delle molecole di interesse all'interno delle brassicacee, l'isolamento e il successivo sequenziamento dei geni coinvolti. I geni isolati e caratterizzati vengono inseriti nei vettori di espressione che a loro volta vengono integrati nel genoma di un microrganismo idoneo per la produzione di glucosinati. Questa sequenza di operazioni è stata realizzata dal Dipartimento Biotecnologia e Bioscienze, dell'Università Milano Bicocca in collaborazione con l'Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Urbino e con il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Genova. In questi giorni è iniziato presso il CRAB il lavoro per la raccolta e ottimizzazione di tutti i parametri cinetici termodinamici ed economici necessari per la messa a punto del processo produttivo.

Sempre facendo riferimento al diagramma di flusso di figura 2 si può rilevare che l'alimentazione (lievito OGM) insieme a tutto quello che è necessario per far crescere il microrganismo entra nel blocco upstream, passa nel blocco bioreazione per lo scale up e dopo il blocco downstream esce come glucosilato sotto forma di polvere.

Quanto esposto dimostra come un'area scientifica, quella dell'ingegneria chimica, solo in apparenza lontana dai filoni tipici delle scienze biologiche può contribuire a rendere industrialmente utilizzabili le "scoperte" che i ricercatori che lavorano nella genomica, nella proteomica, nella metabolomica etc. mettono a disposizione dei ricercatori che lavorano allo sviluppo di nuovi e processi nuovi prodotti compatibili con un corretto sviluppo delle attività umane.

Il CRAB ha potuto realizzare autonomamente fino al 2004 quanto finora esposto senza usufruire di contributi finanziari oltre quelli elargiti dallo Stato per la costruzione del Centro e per la formazione dei Ricercatori. L'introito, derivante da commesse acquisite da privati e dall'ARSSA e gli utili provenienti dalle attività di analisi conto terzi e di formazione, hanno permesso infatti al Consorzio di sostenere i costi per il cofinanziamento dei progetti, di pagare gli stipendi e di investire quanto necessario per la manutenzione ordinaria e straordinaria del Centro.

Da alcuni anni però le condizioni al contorno che avevano permesso al CRAB di raggiungere importanti obiettivi e di acquisire riconoscimenti tangibili per l'attività svolta, come risulta ad esempio dai numerosi rapporti fin qui allacciati con importanti Aziende italiane e con Enti di Ricerca pubblici e privati, italiani e non, sono profondamente mutate e hanno reso difficile la stessa sopravvivenza del Centro di Ricerca di Avezzano. L'entrata in vigore del Decreto del Ministero della Economia e delle Finanze del 10 ottobre 2003, allineandosi all'Europa, ha infatti portato il contributo a fondo perduto per i Progetti di Ricerca finanziati con Bandi nazionali dal 75% del costo complessivo del progetto ad una quota inferiore al 50%. Nella «Relazione sulla gestione» allegata ai progetti di Bilancio degli anni 2006, 2007, 2008 è ben evidenziato il danno economico e finanziario che il Decreto ha determinato.

L'altro elemento negativo che ha creato e crea serio intralcio alle attività del Centro di Avezzano è quello contenuto nella Legge Regionale n° 6 del 16 marzo 2001 che nell'art. 1. sostanzia: «*…l'applicazione del principio di precauzione nelle decisioni che riguardano l'uso per qualunque fine di OGM…*»; che nell'art. 2 commi 1 e 2 impedisce di allevare e coltivare, nelle aree regionali, OGM: «*…anche a fini sperimentali*» e che nell'art. 3 comma 2 esclude: «*… dall'erogazione di finanziamenti regionali le ricerche che utilizzano tecniche di manipolazione genetica finalizzate alla creazione varietale e/o alla selezione animale …*».

Tutto ciò impedisce cosi ai Centri di Ricerca Regionali di svolgere attività di *ricerca in campo* utilizzando OGM considerati in tutto il mondo uno strumento ad altissimo potenziale di innovazione e ha reso difficile l'acquisizione di commesse in molti settori in particolare in quelli legati alla produzione di biocarburanti a partire da materiali lignocellulosici.

Da studi e ricerche già finanziate il CRAB (insieme all'ENEA) ha simulato diversi processi per la produzione di bioalcol nel tentativo di produrre questo carburante a costi compatibili o addirittura concorrenziali con i carburanti da petrolio. Il processo preconizzato (vedi figura 8) prevede la trasformazione in alcol eti-

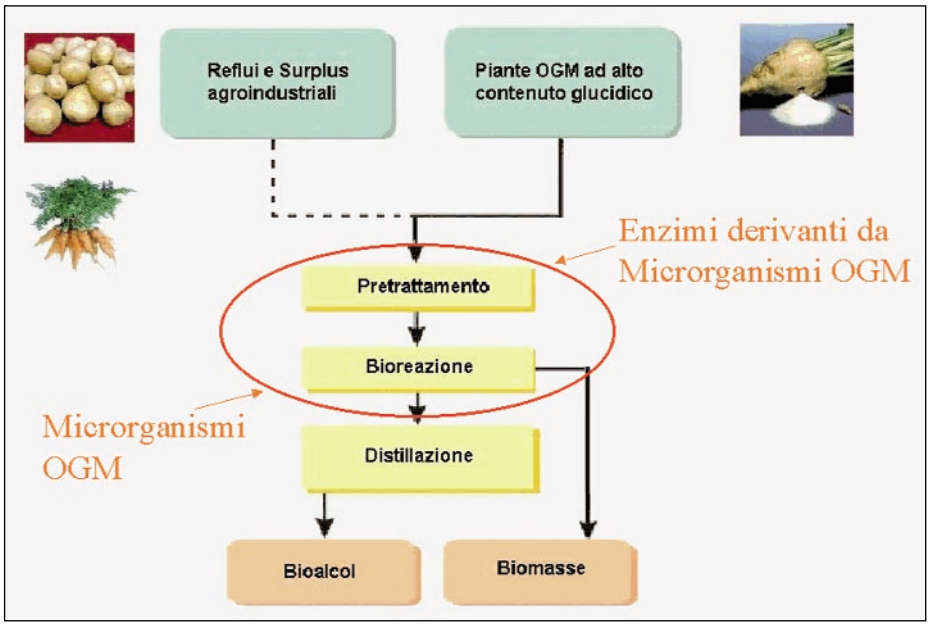

Fig. 8. Processo ipotizzato per la produzione di bioalcol.

lico non solo degli zuccheri (come oggi avviene) ma anche delle cellulose e della lignina contenute sia in vegetali opportunamente ingegnerizzati, coltivabili anche in terreni aridi o comunque oggi scarsamente utilizzati, sia in scarti o surplus del primario. L'area cerchiata in rosso prevede un prettrattamento di tipo sia meccanico(sfibratura) che tipo biologico capace di trasformare le cellulose e le emicellulose in molecole facilmente fermentescibili e nella successiva biotrasformazione in alcol etilico. Massimizzare la resa del processo è compito del CRAB. Per quanto fin qui acquisito tale ricerca potrà avere successo soltanto utilizzando gli strumenti più avanzati della ricerca nel settore delle biotecnologie sia di quelli utilizzati per il miglioramento genetico delle piante che di quelli utilizzati per il miglioramento dei processi produttivi. Non a caso negli USA si sta alacremente lavorando su queste tematiche come dimostrano gli esempi di seguito riportati:

– Ricercatori americani, in collaborazione con la Syngenta, hanno depositato nell'aprile del 2008 negli USA il brevetto di una intera via metabolica, potenzialmente applicabile a qualsiasi pianta, per la produzione nel vacuolo di cellulasi che potrebbero essere attivate nella fase di post raccolta facilitando così la saccarificazione per autodigestione delle cellulose endogene (Fonte: Brevetto Syngenta, depositato in USA, aprile 2008).

– Ricercatori della Michigan Technolgical University hanno ricevuto nel luglio del 2009 un grant di 900,000 US$ da parte della USDA per lo sviluppo di pioppi,

anche geneticamente modificati, in grado di crescere su terreni marginali (aridi e con scarsa presenza di nutrimenti) per la produzione di biocombustibili (Fonte: Cropbiotech - Biofuels Supplements, luglio 2009).

– La Zymetis ltd, uno spin-off dell'Università del Maryland, ha da poco completato le prime produzioni pilota di Saccharophagus degradans geneticamente modificato per aumentarne le capacità di degradazione in zuccheri delle cellulosa, arrivando a convertirne 1 tonnellata in circa 72 ore in fementatore. (Fonte: Technology Review. 22/03/2009);

– la Novozymes, azienda produttrice di enzimi per applicazioni industriali, ha lanciato sul mercato due enzimi in grado di convertire cellulose ed emicellulose in glucosio (rispettivamente «CellicTM CTec» e «CellicTM HTec») permettendo di ridurre sia la biomassa residua che le temperature di esercizio ed arrivando ad una resa di circa l'80% con una conseguente riduzione dei costi di produzione (da 2 USD nel 2007 a 0.50 USD nel 2010).(Fonte: Novozymes. 2009);

– Il Caltech (California Institute of Technology), in collaborazione con la DNA 2.0, società privata di ricerca in genetica, ha messo a punto un processo di produzione di enzimi (cellulasi) cosiddetti «chimerici», in grado di funzionare, nella trasformazione di cellulosa ed emicellulosa in zuccheri, a temperature superiori ai 75 gradi raggiungendo rese vicine al 100% (Fonte: California Institute of Technology. 23/03/2009).

Lo Stato Italiano allo scopo di incentivare lo sviluppo del nostro Paese investì nel lontano 1984 ventotto miliardi delle vecchie lire per realizzare il Centro di Ricerche di Avezzano; il compito di tutti dovrebbe essere perciò, oggi, quello di trovare soluzioni atte a ribaltare i problemi economico/finanziari originati dal Decreto ministeriale del 10 ottobre 2003 e di impedire che leggi, come la Legge Regionale del 16 marzo 2001, possano creare ostacolo alla libertà di Ricerca.

Il 2 settembre scorso il Presidente dell'Associazione Italiana Maiscoltori Marco Aurelio Pasti in una «lettera aperta» al Ministro per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, dopo aver denunciato il grave danno economico subito dai produttori di mais e la drastica riduzione degli ettari coltivati a mais che si è verificata nella Pianura Padana in seguito agli impedimenti vigenti nel nostro Paese per la coltivazione dell'unico mais OGM resistente alla Piralide approvato in Europa, fa un accorato appello al Ministro affinché firmi i provvedimenti per riaprire le sperimentazioni in campo onde mettere l'Italia alla pari con i paesi che hanno adottato le innovazioni offerte dalle Biotecnologie.

È ora che il Parlamento e l'Esecutivo assumano responsabilmente i provvedimenti necessari affinché vengano rimossi tutti gli impedimenti che limitano o addirittura impediscono il progredire della Scienza se non vogliamo vedere il nostro Paese scendere a livelli di competitività inaccettabili rispetto a quello che sta accadendo nel resto del Mondo.

Vengono di seguito riportati i nomi dei Ricercatori che hanno contribuito alla realizzazione della inizialmente citata «Analisi di fattibilità».

Prof. Diego BARBA, Università dell'Aquila
Prof. Vincenzo BRANDANI, Università dell'Aquila
Dott. Giovanni CAFARELLA, ERSA Avezzano
Prof. Corrado CANTARELLI Università di Milano
Dott. Ferdinando CAPRANICA, ERSA Avezzano
Ing. Fabio CARASSITI, Università di Roma
Ing. Giovanni DEL RE, Università dell'Aquila
Prof. Gabriele DI GIACOMO, Università dell'Aquila
Ing. Franco EVANGELISTA, Università dell'Aquila
Prof. Antonio GERMANÀ, Università dell'Aquila
Ing. Mauro MORESI, Università di Roma
Sig. Paolo PERNA, Università dell'Aquila
Dott. Ugo PESCE, ERSA Avezzano
Prof. Enzo SEBASTIANI, Università di Roma
Prof. Giovanni SCHIPPA, Università dell'Aquila
Ing. Giancarlo SCOCCIA, Università dell'Aquila
Prof. Giovanni TAGLIAFERRI, Università dell'Aquila
Prof. Roberto VOLPE, Università dell'Aquila

I nomi sono in ordine alfabetico, l'appartenenza e le qualifiche sono quelle relative agli anni Ottanta.