

WALTER MARCONI (*)

Prospettive di sviluppo nel settore delle biotecnologie (**)

Introduzione

Poiché ritengo che sia impossibile, nei limiti di una breve relazione, considerare in dettaglio le ormai numerosissime possibilità applicative delle biotecnologie, mi limiterò ad esaminare nelle sue linee generali le peculiarità di questo settore tipicamente interdisciplinare, nonché le principali realizzazioni, e le tendenze future, nei principali campi applicativi che già oggi si avvalgono delle biotecnologie.

I settori principali in cui i prodotti e le tecniche della biotecnologia stanno avendo un maggiore impatto sono: 1) la diagnostica e la terapia sia umana che veterinaria; 2) agricoltura e settori agro-industriali; 3) le produzioni chimiche e biochimiche; 4) l'energia; 5) l'ambiente.

E' molto probabile che, nei prossimi 20 anni, le biotecnologie entreranno nei progetti di innovazione tecnologica interessanti tutti o quasi i settori merceologici.

Già ora ad esempio si studiano possibilità applicative delle biotecnologie nella metallurgia e nell'informatica.

Il termine « biotecnologia » include numerose tecnologie, più o meno recenti, derivanti dalle scienze biologiche e fisiche (fig. 1).

Perfino le più avanzate fra di esse sono basate su tecnologie vecchie e consolidate (fig. 2).

Così, ad esempio, l'immobilizzazione di proteine o di cellule si è avvalsa dei nuovi supporti forniti dalla chimica macromolecolare: le separazioni biospecifiche sono basate su principi di cromatografia stabiliti addirittura nel secolo scorso; l'ingegneria genetica, infine, utilizza collaudate tecnologie fermentative.

(*) Facoltà di Scienze MFN, Università di Roma « La Sapienza ».

(**) Relazione presentata al Convegno, « La chimica: storia, fondamenti, prospettive », Roma, Dipartimento di chimica, Università di Roma « La Sapienza », 6-7 Novembre 1989.

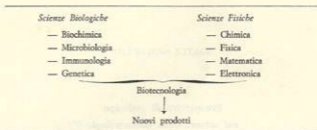


Fig. 1 - Biotecnologia: una fusione di vecchie e nuove tecnologie per lo sviluppo di nuovi prodotti

<i>Tecnologia matura o di base</i>	<i>Biotecnologia di avanguardia</i>
Chimica dei polimeri	Immobilizzazione delle proteine cellulari
Cromatografia	Separazioni biospecifiche
Chimica dei peptidi	Sintesi dei peptidi
Caratterizzazione delle proteine	Ingegneria enzimatica
Anticorpi policlonali	Ibridoma
Fermentazione	Ingegneria genetica
Studi sul rapporto struttura-attività	Modellazione molecolare
Struttura degli acidi nucleici	Sonde di DNA/RNA
Immunodiagnostica	Biosensori
Biotecnologie integrate	Biochips

Fig. 2 - Aree focali della biotecnologia

Le applicazioni delle varie biotecnologie si trovano in stadi di sviluppo assai differenti (fig. 3).

Alcune, come l'immobilizzazione di enzimi, sono tecnologie mature, che una Società interessata potrebbe applicare subito per pervenire ad un prototipo produttivo.

Tempi maggiori sono richiesti da quasi tutte le altre biotecnologie elencate; alcune, embrionali, sono ancora in un primo stadio di sviluppo, di solito in laboratori universitari.

Così, lo sviluppo di nuove proteine (enzimatiche o di significato immunologico), o i « biochips », richiederanno ancora lunghi tempi di R&S per pervenire a realizzazioni prototipali.

Le biotecnologie che sembrano svilupparsi più rapidamente comprendono

Biotecnologia ed esempi	Stadio di sviluppo	Tempo del prototipo per nuove applicazioni
<i>Immobilizzazione</i>		
Enzimi, cellule	Matura	Immediatamente
Saggio immunologico in fase solida	Emergente	0-2 anni
MAB liberazione del farmaco	Embrionale	3-7 anni
Cromatografia per affinità	Emergente	Immediatamente
<i>Tecnologia dei biosensori</i>		
Processi di monitoraggio	Matura	Immediatamente
Processi di controllo	Emergente	1-4 anni
Biochips	Embrionale	5-20 anni
<i>Ingegneria molecolare</i>		
Vaccini peptidici	Emergente	1-5 anni
Sintesi dei peptidi per mezzo della ingegneria genetica	Emergente	1-4 anni
DNA/RNA sonda	Emergente	1-7 anni
Coltura di cellule mammali	Embrionale	3-6 anni
Superproteine	Embrionale	4-8 anni

Fig. 3 - Livello di sviluppo di biotecnologie selezionate

L'ingegneria genetica (cioè le tecniche di DNA ricombinante), le tecnologie di produzione e impiego di ibridomi, l'immobilizzazione di proteine e cellule, e le tecniche di separazione basate sulla biospecificità.

L'ingegneria molecolare rivestirà importanza crescente nello sviluppo di nuovi prodotti biotecnologici, attraverso l'impiego del « molecular modeling », della sintesi di peptidi e della coltura di cellule di mammiferi.

Nuove apparecchiature di monitoraggio e di controllo di processo saranno disponibili nei prossimi 5 anni, mentre lo sviluppo e la commercializzazione dei « biochips » avrà luogo in un periodo che va dal 5 al 10 anni da ora.

Esaminiamo ora rapidamente gli aspetti più significativi riguardanti gli sviluppi delle biotecnologie nei cinque settori summenzionati.

Diagnostica e salute umana e animali

Negli ultimi 10 anni il numero di prodotti biotecnologici che hanno raggiunto in questo settore la fase di commercializzazione non è stato spettacolare come ci si attendeva.

Nel 1987 le vendite globali ammontarono a 700 milioni di dollari.

Di questi circa 300 furono per i test diagnostici, che includevano circa 200 kits basati su anticorpi monoclonali (una sessantina sono per l'AIDS) e 6 test basati su sonde a DNA.

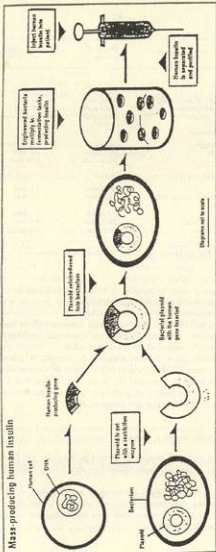


Fig. 4 - Schema di una biotecnologia

Il rimanente è suddiviso fra ben pochi farmaci e vaccini: due vaccini animali, uno per l'epatite B umana, e farmaci basati su 5 differenti proteine umane.

Tutte queste proteine furono clonate in batteri, ed i prodotti di maggior successo sono l'insulina umana e l'ormone della crescita umano (fig. 4).

Altre proteine come l'interleukina 2, un immunomodulatore attivo nella terapia di alcuni tumori, rivelarono eccessivi effetti secondari.

Anche gli interferoni, che tante speranze avevano generato, si rivelarono attivi solo in rare forme di leucemia (*hairy cell leukemia*).

Proteine di più elevato peso molecolare, come il TPA (*Tissue Plasminogen Activator*) potranno essere prodotte mediante clonazione in cellule animali, che hanno l'ulteriore vantaggio di non contenere tossine batteriche e di produrre, a differenza dei batteri, proteine glicosilate.

Qui di seguito sono elencate le classi di prodotti per i quali ci si attende nel prossimo futuro il maggiore successo.

- Proteine ematiche, quali il TPA (terapia infarto e trombosi) ed eritropoietina (anemia).
- Ormoni quali *Human growth hormone* (nanismo) ed *Epithelial growth factor* (cicatrizante di ferite, tendini e vasi e terapia di difetti corneali).
- Immunomodulatori come le linfochine, studiate anche per AIDS e cancro.
- Anticorpi monoclonali (Centoxin) per la terapia dello shock settico da infezioni batteriche.

Grandi speranze risiedono nella possibilità di trasferimento di geni in cellule di mammiferi, (uova fertilizzate o embrioni), che ha richiesto lo sviluppo di tecniche nuove, essendo le cellule animali, come quelle vegetali, prive degli utilissimi plasmidi.

Palmiter e Brinster, gli autori del topo transgenico gigantesco apparso nel 1982 su *Nature* (possedeva il gene per l'ormone della crescita), furono i primi a riuscire in quest'impresa, inserendo i geni estranei in un uovo fecondato utilizzando un capillare avente il diametro di 1/24.000 di pollice.

Altre tecniche sono ora impiegate, come la corrente elettrica o la creazione di « chimere », come la famosa « geep » di Cambridge (goose-sheep), che si ottengono introducendo nell'embrione di un animale un grappolo di cellule embrionali da un'altra specie.

Dal 1982 centinaia di differenti geni, umani ed animali, sono stati introdotti in un gran numero di mammiferi, uccelli e pesci.

Tra le realizzazioni più interessanti si possono menzionare: a) l'introduzione di geni umani che codificano il fattore IX della coagulazione nelle ghiandole mammarie di pecora. La pecora produce così latte contenente il fattore IX, che può essere purificato e commercializzato per la terapia dell'emofilia; b) utilizzo di tecniche analoghe alle precedenti per la produzione di mucche transgeniche dotate del gene per l'albumina umana, che è isolata dal latte e purificata.

Un'importante area di ricerca è costituita dalla correzione di deficienze genetiche in neonati, ed in particolare di due gravissime malattie.

La prima è la sindrome di immunodeficienza congenita (SCID), caratterizzata da una totale incapacità di resistenza alle infezioni, e dovuta all'assenza dell'enzima adenosin-deaminasi.

La seconda è la beta-talassemia, ed è caratterizzata da carenza di beta-globina.

In entrambi i casi vengono prelevate cellule di midollo osseo, responsabili dell'attività emopoietica.

Queste vengono ingegnerizzate, fornendo loro il patrimonio genetico che codifica la proteina mancante, e reinsertite nel paziente.

L'efficacia di queste terapie è ancora in corso di valutazione.

Un'importante applicazione di tipo terapeutico attualmente in fase di sviluppo riguarda l'impiego di anticorpi monoclonali generati da cellule cancerose, e coniugati a tossine o farmaci anticancro.

Il principio è illustrato nella fig. 5.

Il coniugato farmaco-anticorpo è iniettato al paziente, dove va a raggiungere prevalentemente quelle cellule di cancro su cui il farmaco deve agire.

Data la specificità di azione garantita dall'anticorpo è così possibile avere elevate concentrazioni locali di farmaci anche impiegandoli in bassa concentrazione, ed evitando così la tossicità spesso ad essi associata.

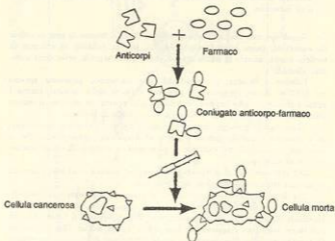


Fig. 5 - Azione di un farmaco in funzione di un anti-corpo.

Le limitazioni attuali di questo impiego sono costituite dalla capacità delle cellule tumorali di mutare le loro caratteristiche superficiali, e dall'eventuale presenza di antigeni derivanti dal terreno di coltura degli anticorpi.

Applicazioni diagnostiche

In campo diagnostico, le biotecnologie hanno fornito numerosi significativi contributi, in particolare per quanto riguarda le sonde a DNA (*DNA probes*) o RNA, gli immunoassay ed i biosensori.

Le sonde a DNA si basano sul principio che, una volta nota la sequenza dei nucleotidi di un DNA che deve essere individuato, è possibile sintetizzare un segmento complementare (o *probe*) di polinucleotide che si legherà specificamente al DNA nativo (ibridazione).

Se alla sonda viene legato un indicatore come un colorante fluorescente o un enzima, può essere determinato quantitativamente il DNA nativo (fig. 6).

Già ora è possibile diagnosticare con questo mezzo numerose malattie batteriche o virali come l'Herpes Simplex o l'epatite di tipo B.

Poiché il limite attuale all'applicazione è costituito dalla difficoltà di determinare la sequenza del DNA, la tecnica è ora in notevole sviluppo a causa dell'entrata in commercio dei nuovi apparecchi automatici che determinano la sequenza (es. *Applied Biosystems*).

Tra l'altro questi apparecchi sono in grado anche di sintetizzare lunghe catene di polinucleotidi: la British Biotechnology di Oxford ha sintetizzato in 2-3 settimane il gene che codifica il TPA, che possiede 1.600 coppie di basi.

Si è giunti a sintetizzare polinucleotidi di circa 5.000 coppie di basi.

Gli immunoassay in fase solida, che sfruttano le varie tecniche di immobilizzazione, sono già ampiamente usati per la determinazione di farmaci, enzimi, ormoni e inquinanti, ed il loro uso si sta estendendo alla determinazione di moltissime classi di prodotti biologici.

Il principio di funzionamento in una realizzazione diffusa è illustrato nella fig. 7.

L'indicatore *I* legato all'anticorpo marcato può essere un composto fluorescente, un enzima o un radioisotopo.

I biosensori sono sistemi che utilizzano biomolecole immobilizzate allo scopo di rilevare, o di rispondere elettronicamente, ad eventi biologici.

Essi consentono misure estremamente sensibili e specifiche, e possono essere attualmente classificati in due categorie di base: i sensori a bioaffinità e quelli enzimatici-metabolici (fig. 8).

Nei sensori del primo tipo il legame fra la sostanza da rilevare e la biomolecola immobilizzata genera variazioni conformazionali che si traducono nell'emissione di un segnale, ad esempio nella modifica di una differenza di potenziale precedentemente applicata (fig. 9).

I sensori enzimatici, già disponibili in più di una versione, possono dosare diversi metaboliti.

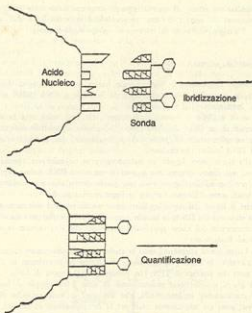


Fig. 6 - Tecnologia con sonda di DNA

I metodi di rilevamento possono essere di tipo diverso come è illustrato nella fig. 10.

Direttamente derivanti dai biosensori possono essere considerati i « biochips », più sofisticati e ora ad uno stadio di sviluppo iniziale.

Essi, che possono essere considerati la corrispondente versione organica dei chips al silicio, dovrebbero permettere, data la piccola dimensione delle biomolecole, densità di impaccamento da 100 a 1.000.000 di volte rispetto al silicio, con gli ulteriori vantaggi di una bassa o nulla generazione di calore, assenza di interferenze e minimi consumi energetici.

I fattori che limitano attualmente il loro sviluppo consistono essenzialmente nella necessità di migliorare le tecniche di assemblaggio delle biomolecole e di trasduzione dei segnali, oltreché nella loro mancanza di una memoria efficiente.

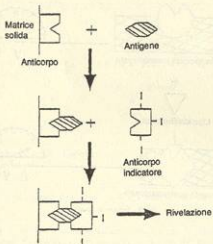
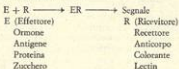


Fig. 7 - Saggio immunologico in fase solido

Sensori a bioaffinità



Sensori a metabolismo enzimatico

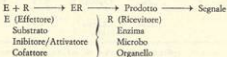


Fig. 8 - Tipi fondamentali di biosensori

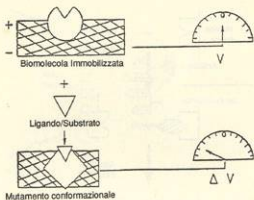


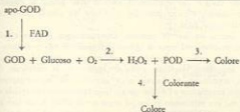
Fig. 9 - Sensori a bioaffinità

Compagnia/Strumento	Substrato	Enzima	Serie di ¹ rilevazione	Stabilità
Yellow Springs Instruments Model 23A	Glucosio alcol	GOD ² alcol ossidasi	1-45 0-60	500 campioni 7 giorni
Fuji Electric Glaco-20A UA-300A	Glucosio acido urico	GOD uricali	0-27 7-65	500 campioni —
La Roche Lactate Analyzer 640	L-Lattato	Giocromo B ₅	0-5.5	40 giorni
Oxozon Toyobo HER-100	L-Lattato	L-Lattato ossidasi	0-9	10 giorni

¹ In $\mu\text{mol/ml}$; si possono analizzare 20-80 campioni per ora con una precisione del 2-5%.

² GOD = glucosio ossidasi.

Fig. 10 - Esempi di biosensori basati sulla coppia elettrodo-enzima



Modo di rilevazione:

1. Ottico, FET
2. Potenzionetrico, Amperometrico
3. Termistore
4. Ottico

Fig. 11 - Esempi di biosensori secondo i modi di rilevazione

Si ritiene che i costi di sviluppo saranno elevati, e che le prime applicazioni saranno in campo biomedico (ad es. controllo automatico dei livelli di insulina ematica).

Le biotecnologie per l'agricoltura

L'aumento del costo dei fertilizzanti e dei costi energetici, e ora anche i problemi ecologici posti dall'uso massivo dei fertilizzanti, impongono oggi all'agricoltore la ricerca di sempre nuove varietà che, a produttività e costi di produzione pari o inferiori, diano una produzione qualitativamente migliore.

Questo obiettivo sarà in futuro ottenuto, oltreché con gli attuali metodi convenzionali di ibridazione, mediante l'uso di biotecnologie.

Grande importanza continueranno ad avere le colture *in vitro* di cellule, tessuti o organi che da circa venti anni consentono di rigenerare piante sia da cellule somatiche che germinali.

Questa tecnica permette, oltre ad una serie di manipolazioni che vanno dalla fusione di cellule anche di specie non affini all'introduzione di DNA esogeno, la fusione di protoplasti di specie diverse e la rigenerazione di piante nuove.

Anche se la possibilità di creare piante «nuove» attraverso ibridazione somatica dipende generalmente dall'affinità esistente fra le specie, si considera oggi di grande importanza la possibilità di ottenere con queste tecniche il trasferimento parziale del genoma di una specie in un'altra, come pure il trasferimento di organelli o di citoplasma.

Grande importanza continueranno ad avere le tecniche di micropropagazione

o propagazione clonale, che sfruttano la capacità delle piante di riprodurre, in opportune condizioni, l'intero individuo a partire da piccole parti come un apice vegetativo o un callo.

Questa tecnica sta avendo crescente importanza per risanare cloni infetti da virus; l'eliminazione del virus si ottiene coltivando il solo meristema apicale, impiegando spesso, prima o durante la coltura, degli antivirali.

Grande importanza rivestono, anche in agricoltura, le tecnologie di DNA ricombinante, soprattutto da quando si è scoperto che microorganismi come l'*Agrobacterium tumefaciens* e l'*A. rhizogenes*, quando infettano una cellula vegetale, trasferiscono nel suo patrimonio genico un segmento di DNA da un loro plasmide (Tumor inducing DNA) capace di generare tumore (galla del colletto) nel caso dell'*A. tumefaciens* o radici avventizie (*A. rhizogenes*).

In queste strutture, le cui cellule possono essere coltivate *in vitro*, il Ti-Dna del microorganismo è incorporato in modo stabile nel DNA nucleare.

Dalla loro coltura si possono quindi ottenere piante le cui cellule mantengono indefinitamente il patrimonio plasmidico del batterio.

Il DNA del plasmide può, con le solite tecniche impieganti enzimi di restrizione e ligasi, essere modificato col patrimonio genico che si desidera trasferire alla pianta.

I ricercatori della Monsanto hanno eliminato dal plasmide il gene « Tumor inducing », sostituendolo con geni in grado di fornire resistenza alle malattie o ai parassiti o di migliorare la qualità delle proteine di riserva dei semi.

Sono state così ottenute piante di tabacco e di cotone resistenti ad insetti ed erbicidi.

La fig. 12 mostra schematicamente l'ingegnerizzazione del pomodoro resistente al mosaico del tabacco.

Nella figura 13 è data una tabella che elenca alcune delle trasformazioni geniche sinora effettuate.

Bioteologie per sintesi chimiche

Le applicazioni pratiche più significative dei bio-catalizzatori immobilizzanti sono state conseguite nelle produzioni di chimica fine.

Gli enzimi, oltre a catalizzare quasi ogni tipo di reazione, e di agire in ambiente acquoso ed in condizioni di reazione molto blande, hanno l'ulteriore vantaggio di essere estremamente selettivi, stereospecifici, e di non dare luogo a problemi di racemizzazione, etc. che si incontrano spesso coi catalizzatori di tipo chimico.

Nella fig. 14 sono elencati alcuni processi studiati. I primi quattro sono applicati industrialmente per produzioni significative.

Uno sviluppo di queste tecnologie è costituito dall'immobilizzazione di cellule, in genere di microorganismi, ma anche vegetali o animali.

L'immobilizzazione di cellule, meno costosa di quella di enzimi, presenta il vantaggio di rendere più agevoli sintesi che richiedono sistemi multi-enzimatici

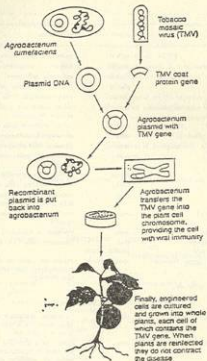


Fig. 12 - Come costruire una pianta resistente ad un virus

o che richiedano la rigenerazione di cofattori, che avviene nella cellula, a spese di altri cicli biochimici.

Svantaggi sono costituiti dalla possibilità di reazioni collaterali dovute agli altri sistemi enzimatici della cellula, e alle barriere diffusive costituite dalle pareti e membrane cellulari.

Nella fig. 15 sono descritti alcuni processi di questo tipo sviluppati.

Vorrei menzionare più in dettaglio alcune realizzazioni recenti, come la sintesi della p-idrossi-fenil-glicina (intermedio per antibiotici beta-lattamici semi-sintetici), messa a punto nei laboratori ENI di Monterotondo, e basata dappertutto su un sistema enzimatico chimico (fig. 16).

geni per	piante	importanza
leg-emoglobina	soia	protezione della nitrogenasi
glutamina sintetasi	fagiolo	trasporto e accumulo d'azoto
lectina	fagiolo	resistenza agli insetti
legumina	pisello	proteina di riserva del seme
gliadine	grano	valore nutritivo della cariosside
glutemine ad alto peso molecolare	grano	valore nutritivo e qualità panificatoria, allergie da glutine
ordeine B, C, D	orzo	valore nutritivo della cariosside
proteina Z (albumina)	orzo	proteina dell'endosperma ricca in lisina
inibitore II della chimosina	orzo	proteina dell'endosperma ricca in lisina
carbossipeptidasi	orzo	qualità del malto, sintesi enzimatica dei peptidi
secalina W	segale	qualità della cariosside
zeina	mais	valore nutritivo della cariosside
proteina opaco-6	mais	espressione coordinata della sintesi della proteina di riserva
prodotto di opaco-2	mais	regolazione della trascrizione di opaco-6
alcol deidrogenasi	mais	resistenza a condizioni d'anacrobiosi
ribosio-1,5 difosfato carbonilasi/ossigenasi	mais	fissazione della CO ₂ , fotorespirazione
subunità piccola (gene nucleare)	pisello, grano	
	orzo, spinacio	regolazione luminosa della trascrizione e traduzione, trasformazione del Dna cloroplastico
subunità grande (gene del cloroplasto)	tabacco	
<i>Chlamydomonas</i>		
proteina 2 di legame alla clorofilla a/b	orzo	fotosintesi, marcatura del prodotto genico, riduzione luminosa della trascrizione e traduzione
NADPH ossidoriduttasi peroclorofillide	orzo	sintesi della clorofilla, promotore per alti tassi di trascrizione al buio, marcatura del prodotto genico del cloroplasto
alcol sintasi	penunia, mais	pigmenti antocianici, polifenoli
proteina di legame dell'erbicida (gene del cloroplasto)	mais, tabacco spinacio	marcatore selezionabile di resistenza all'erbicida, trasformazione del Dna cloroplastico
<i>Chlamydomonas</i>		

Fig. 13 - Geni di piante agrarie che sono stati clonati in c DNA o direttamente dal genoma. La loro struttura primaria con inclusi i promotori 5', le sequenze fiancheggianti 3' e l'espressione, sono già state o stanno per essere analizzate.

Enzima (I = Immobilizzato)	Applicazione
Penicillina acilasi (I)	Produzione di 6-APA per penicillina G o V
Glucosio isomerasi (I)	Produzione di HFCS
L-Acetil aminoacilasi (I)	Risoluzione ottica di amino acidi
Lattasi (I)	Idrolisi del lattosio nel latte e nel siero
Melibiosidasi (I)	
Aspartasi	Produzione di acido L-aspartico da acido fumarico
Fumarasi	Produzione di acido L-malico da acido fumarico
Termolissina	Accoppiamento di acido aspartico e fenilalanina-metil-estere ad aspartato
D-Idantolasi/D-carbamilidrolasi	Produzione di D(-)-p-idrossifenilglicina
2-Aminozanolin-4-carboxilato idrolasi	Produzione di L-cisteina
L- α -Amino- ϵ -caprolattame idrolasi/raccemasi	Produzione di L-lisina

Fig. 14 - Bioconversioni: Esempi di applicazioni industriali

Prodotto	Substrato	Microorganismo	Immobilizzazione con intrappolamento	Tempo di dimezzamento	Compagnia o istituzione
Acido L-aspartico	Fumarato d'ammonio	<i>E. coli</i>	Poliacrilamide	120	Tanabe
Acido malico	Acido fumarico	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Poliacrilamide	53	Tanabe
L-Citrullina	Arginina	<i>Pseudomonas putida</i>	Poliacrilamide	140	Tanabe
Acido urocanico	Istridina	<i>Achromobacter liquidum</i>	Poliacrilamide	180	Tanabe
Galattosio + glucosio	Lattosio	<i>S. lactis</i>	Acetato di cellulosa	—	Assoreni
Saccarosio + galattosio	Raffinosio	<i>S. oleaceus</i>	Acetato di cellulosa	—	Assoreni
L-triptofano	Indolo + L-serine	<i>E. coli</i>	Chitosan	30	Technical University Braunschweig
L-alanina	Fumarato d'ammonio	<i>E. coli</i>	Carrageenan	—	Tanabe
Glutazione	L-Glu + L-Cys + Gly	<i>S. cerevisiae</i>	Poliacrilamide	32	Tanabe
Ossido di propilene	Propilene	<i>Nocardia corallina</i>	Poliacrilamide	—	Tokio Institute of Technology

Fig. 15 - Processi in cellule immobilizzate

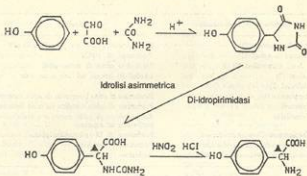
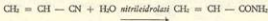


Fig. 16 - Processo per la sintesi della *D-p*-idrossifenilglicina. (Da Ref. [33])

Fu poi trovato che l'*Agrobacterium radiobacter* conteneva, oltre alla idantoinasi, anche l'enzima carbamylasi.

Il processo, impiegante cellule, è ora applicato industrialmente da una società farmaceutica italiana.

Altre importanti e recenti realizzazioni industriali riguardano la sintesi di acrilammide da acrilonitrile mediante microorganismi (*Bacillus*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, etc.) contenenti l'enzima nitrile idrolasi.



Utilizzata dalla giapponese Nitto in un impianto da 4.000 t/a, e la sintesi di idrochinone per ossidazione microbiologica di benzolo con cellule di *Methylosium tricosporium*.

L'enzima è una mono-ossigenasi - NADH dipendente. Il processo, utilizzato industrialmente negli USA e in Giappone, è, per impianti da 10.000 t/a, più conveniente della sintesi chimica da diisopropil-benzene.

Altre importanti realizzazioni impieganti cellule riguardano la sintesi della vitamina C e della fenilalanina.

Importanti e recenti realizzazioni impieganti invece enzimi immobilizzati riguardano la sintesi dell'insulina umana (Novo) mediante la modifica dell'amminoacido terminale dell'insulina porcina (sostituzione di alanina con treonina mediante tripsina), è la sintesi dell'aspartame (L-aspartil-fenilalanina-metil-estere) mediante subtilisina.

Grandi sono le prospettive future di questo settore applicativo: i notevoli

progressi delle tecniche di DNA ricombinante permettono di fornire virtualmente qualsiasi enzima su larga scala e a basso costo.

Una nuova fase dell'enzimologia è iniziata da quando la genetica molecolare ha fornito i mezzi per costruire enzimi disegnati « ad hoc » e dotati delle caratteristiche richieste da catalizzatori industriali (fig. 17).

L'iter logico e operativo è illustrato nella fig. 20.

Molti processi enzimatici potenziali, oggi troppo costosi per competere con processi catalitici convenzionali, diverranno così competitivi in futuro.

E' già stato comunicato che cellule immobilizzate di *Bacillus subtilis*, modificate mediante DNA ricombinante, sono state usate per produrre ormoni proteici come la proinsulina mentre cellule animali come gli ibridomi sono state immobilizzate per produrre anticorpi monoclonati ed altre biomolecole.

Applicazioni ambientali delle biotecnologie

E' verosimile che all'industria verrà progressivamente addossato l'onere dell'eliminazione dei reflui o dei rifiuti da essa prodotti, e che essa, oltre a cercare di sviluppare tecnologie meno inquinanti, dovrà occuparsi della messa a punto di dispositivi atti a rilevare, su larga scala ed alle basse concentrazioni già oggi richieste, ampie tipologie di inquinanti.

Dovrà cioè operare, oltreché in termini di correzione, con azioni di prevenzione e monitoraggio.

I maggiori contributi previsti sono i seguenti:

- a) La creazione di microorganismi più efficaci nei processi fermentativi, in modo da ottenere le stesse quantità di prodotto con minori consumi di materie prime e minori quantità di effluenti.

Substrato e cofattore di specificità e affinità
Stereospecificità
Inibizione da feed-back
Stabilizzazione mediante temperatura
Resistenza ai solventi organici ed agli agenti ossidanti
Sensibilità alla proteolisi
Stabilità *in vivo*
Antigenicità
Efficenza catalitica

Fig. 17 - Modificazione delle proprietà dello enzima tramite l'ingegneria genetica

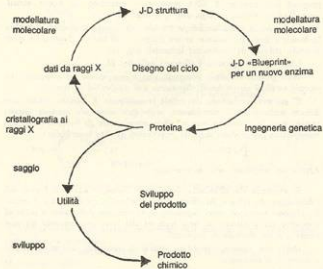


Fig. 18 - L'applicazione di ingegneria delle proteine ai prodotti chimici

- b) Produrre con metodologie di tipo biologico composti chimici o combustibili attualmente derivanti dalla trasformazione di materie prime di tipo fossile, con conseguente riduzione di inquinamento.
- c) Ottenere nuovi microorganismi da impiegarsi per il controllo dell'inquinamento.

La biotecnologia anaerobica, oltre che nella metanogenesi di ingenti masse di rifiuti composte da sostanze organiche putrescibili, può trovare applicazione nella depurazione dei reflui industriali ad alto contenuto di composti organici tossici, come gli aromatici, solitamente poco suscettibili all'attacco microbico.

I filtri anaerobici a letto espanso o fluidizzato rappresentano un'evoluzione tecnologica dei digestori anaerobici tradizionali, in cui la bioconversione completa del refluo da trattare viene condotta ad opera di un *consortium* batterico.

Numerosi sono i settori industriali che potrebbero avvalersi di questa biotecnologia per lo smaltimento dei propri residui organici fra cui: le raffinerie, le cokerie, le industrie di solventi, gli impianti per la produzione di pasta di cellulosa, etc.

I vantaggi delle tecnologie anaerobiche (rispetto alle tradizionali aerobiche) non sono trascurabili, e possono essere così riassunti:

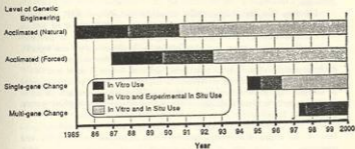
- 1) Eliminazione dei costi energetici connessi con l'aerazione del refluo da depurare.
- 2) Riduzione della quantità di fanghi al 20% di quelli ottenibili in ambiente aerobico.
- 3) Recupero di una aliquota di energia sotto forma di biogas (miscela CH_4 - CO_2 contenenti 55-60% di metano).
- 4) Possibilità di operare con reflui ad elevato contenuto di sostanze organiche.
- 5) Possibilità di trattare effluenti che sono tossici per le flore aerobiche.
- 6) Minore necessità di spazio per la realizzazione degli impianti di trattamento.

La migliore comprensione delle condizioni ottimali di crescita e di attività di associazioni naturali di microorganismi degradativi porterà allo sviluppo di sistemi biotecnologici (filtri, reattori, digestori, sensori) a più alta efficienza di quelli oggi esistenti.

Il risultato finale di queste ricerche dovrebbe essere una biodegradazione da realizzarsi in impianti versatili e compatti, di facile gestione, in grado di trattare reflui diffusamente distribuiti sul territorio (porti, raffinerie, depositi costieri, piattaforme, ecc.).

Si tratta quindi della messa a punto di sistemi integrati che presuppongono, oltre alla messa a punto dello specifico studio impiantistico, anche la produzione della flora batterica più idonea (Starters microbici).

Da uno studio dell'A.D. Little risulterebbero per il 1991 le prime applicazioni « su campo » di queste tecniche di insemminazione microbica (fig. 19).



Fonte: Arthur D. Little, Inc.

Fig. 19 - Distribuzione temporale e introduzione di prodotti di biomediazione

Per quanto riguarda il trattamento di reflui agroindustriali o zootecnici, sono in corso nel nostro paese ricerche interessanti, spesso a livello di impianti dimostrativi, sulla digestione anaerobica, in reattori a letto fluidizzato, di effluenti dall'industria olearia (dove esiste il problema delle acque di vegetazione delle olive), dall'industria saccarifera, dalla lavorazione del pomodoro, agrumaria, e lattiero-casearia.

Secondo le previsioni S.R.I. Int., il volume di affari globale delle biotecnologie (convenzionali e innovative) per l'ambiente salirà dai 46,2 miliardi di dollari del 1985 a 160 miliardi di dollari nel 2000 (a valori costanti 1985).

La quasi totalità della cifra prevista al 2000 sarà relativa alle biotecnologie convenzionali, in quanto per le biotecnologie innovative è prevista una quota dell'1,3 %, per un ammontare di 2 miliardi di dollari.

In campo ambientale, quindi, le biotecnologie innovative sembrano potere avere uno sviluppo significativo solo dopo il 2000.

Infatti, mentre gli unici incentivi possono concretizzarsi in normative sempre più severe a tutela dell'ambiente e in sostegni finanziari alla ricerca di nuove soluzioni, i desertanti sono certamente cospicui: lo scarso interesse industriale ad investire in un'area non propriamente d'affari e quindi con minori prospettive di profitto rispetto ad altre, anche nell'ambito delle biotecnologie, e l'eventuale limite normativo al ricorso all'ingegneria genetica per motivi di sicurezza.

Applicazioni delle biotecnologie al settore dell'energia

Le ricerche sulle applicazioni delle biotecnologie in un campo energetico riguardano, come accennato ai punti precedenti, le seguenti tematiche: desolfurazione del carbone, del petrolio e del gas naturale; liquefazione e gassificazione di carboni ossidati; produzione di biopolimeri per l'EOR e iniezione di microorganismi nei giacimenti; funzionalizzazione del metano; produzione di idrogeno dall'acqua.

L'impiego di materiali lignocellulosi (di origine agricola o da RSU) è peraltro previsto in gran parte dei progetti di ricerca sui bioalcooli di cui si ha notizia.

Oltre ai temi già citati, le attività riguardano ad esempio: il pretrattamento della biomassa (steam explosion, ossidazione-idrolisi-estrazione con vapore); la conversione della biomassa (enzimi e microorganismi immobilizzati, tecniche di fermentazione estrattiva); il trattamento dell'emiacellulosa e della lignina.

In Brasile è in corso di valutazione in impianto pilota un processo, sempre da materiali lignocellulosi, nel quale l'idrolisi è effettuata con una miscela acido-acetone: questo processo è dichiarato in grado di convertire a zuccheri praticamente tutta la cellulosa e l'emiacellulosa contenute nella biomassa.

Se ciò venisse confermato, diventerebbe ipotizzabile la conversione quasi integrale ad alcoli della pianta, anziché dei soli zuccheri, o amidi, in essa contenuti.

Si ritiene poco probabile la continuazione negli USA dopo il 1990 del programma di produzione dell'etanolo su larga scala in quanto non esistono

giustificazioni economiche a finanziarlo: la produzione di etanolo infatti diventerebbe commercialmente significativa nei paesi sviluppati a un prezzo del greggio oltre 40 dollari per barile.

Un consistente aumento del prezzo del petrolio eserciterebbe probabilmente altri impatti sulle applicazioni energetiche delle biotecnologie, quali:

- La produzione per via fermentativa e l'impiego massivo di biopolimeri, bio-tensioattivi e biocidi per il recupero assistito del petrolio (EOR).
- Lo sviluppo della coltivazione delle cosiddette « piante energetiche » (energy crops), quali: il guaiule e l'euforbia per lattici sostitutivi della gomma naturale da *Hevea Brasiliensis*; olio da jojoba o « tallow tree » (un albero che produce un sego vegetale); biomasse cellulose da canna da zucchero, pioppo, conifere, eucalipto o altri materiali legnosi.

La saccarificazione della cellulosa per via enzimatica, infatti, che è stata oggetto di notevole massa di ricerche negli ultimi vent'anni, in particolare per quanto riguarda i processi di pretrattamento e di idrolisi microbiologica o enzimatica, si è rivelata di complessa esecuzione e, sinora, poco competitiva sul piano economico.

Di grande importanza, sempre per quanto riguarda la possibilità di fornire tecnologie più pulite nell'ambito dei combustibili fossili, sono le ricerche, per ora di tipo esplorativo, recentemente iniziate anche in Italia sulla microbiologia del carbone e dei greggi petroliferi, ed in particolare sulla loro desolfurazione microbiologica.

Per quanto riguarda sia il petrolio che il carbone sono già descritti nella letteratura scientifica dei metodi per la rimozione dello zolfo pirritico (inorganico), mentre per quanto riguarda lo zolfo organico — sia del carbone che del petrolio — il problema rimane insoluto.

I risultati ottenuti finora portano ad una funzionalizzazione dei composti solforati (per es. idrossilazione), che ne permetterebbe la separazione, mediante estrazione, dalle matrici organiche non solforate, ma oltre allo svantaggio di portare ad una perdita di sostanze ancora dotate di potere calorico, si verrebbe a creare un ulteriore problema ambientale, costituito appunto dalle soluzioni contenenti i composti solforati funzionalizzati.

Il primo e fondamentale step delle ricerche in corso si propone di identificare — se esistono — dei ceppi microbici capaci di mineralizzare lo zolfo organico, contenuto nei combustibili solidi o liquidi, a solfati o idrogeno solforato, lasciando immutata la matrice idrocarburica: solo la disponibilità di ceppi siffatti permetterebbe di studiare con qualche probabilità di successo dei processi per la rimozione economica dello zolfo organico.

Nell'area della microbiologia del petrolio, un progetto interessante — anche se in una prospettiva a lungo termine — sembra il MEOR (*Microbial Enhancement of Oil Recovery*), per il quale sono richieste competenze sia microbiologiche che di ingegneria genetica, oltre naturalmente a quelle di geologia.

Questa tecnica è già stata provata su pozzi esausti, talvolta senza risultati

apprezzabili, altre volte con notevoli aumenti della produttività: ciò sta ad indicare che la tecnica non è di generale applicabilità, ma che in condizioni opportune può dare dei buoni risultati.

La tecnica si basa sul fatto che i batteri sono in grado di produrre numerose sostanze in grado di aumentare il recupero di petrolio, attraverso la sua mobilitazione in un giacimento che presenti le caratteristiche opportune.

Questi metaboliti batterici appartengono alle classi più diversificate, e possono essere sia polimeri che gas (in particolare CO_2), come anche acidi organici, solventi e tensioattivi.

Questi due ultimi, in particolare, facilitano il distacco degli idrocarburi dai pori della roccia ed il loro successivo convogliamento nella fase acquosa.

La figura 20 mostra schematicamente le varie fasi di questo tipo di intervento.

La tecnica del MEOR è potenzialmente applicabile a molti giacimenti, purché il loro pH sia compreso fra 4 e 8, la temperatura non sia superiore ai $75^\circ C$, e la salinità non superi il 10 %.

Minore influenza sembra esercitare la pressione.

Un ruolo preminente sembrano infine giocare: 1) la permeabilità della formazione minerale contenente il petrolio poiché pori troppo piccoli vengono bloccati dai microorganismi (il cosiddetto « plugging » del giacimento); 2) la capacità dei batteri iniettati di migrare in una vasta area del giacimento, anziché limitare la loro azione nelle vicinanze del punto di iniezione.

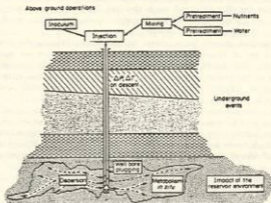


Fig. 20 - Schematic illustration of the use of bacteria *in situ* showing the operations on the surface and events underground

In futuro è probabile che dall'ingegneria genetica possano derivare microrganismi dotati di caratteristiche migliorate e specifiche, sia per quanto riguarda le condizioni ottimali di crescita, che per il tipo di metaboliti prodotti.

Concludendo, penso che le applicazioni energetiche delle biotecnologie che saranno anche in futuro inevitabilmente condizionate in modo determinante da considerazioni di tipo prevalentemente economico, potranno avvalersi nel lungo termine, con risultati anche spettacolari, dei grandi progressi che saranno consentiti dall'introduzione di nuovi microrganismi specializzati costruiti con le tecniche dell'ingegneria genetica.

Conclusioni

Vorrei ora menzionare brevemente quelli che possono essere i limiti o le perplessità all'impiego delle biotecnologie, derivanti da aspetti normativi e di sicurezza.

Un kit diagnostico non pone problemi di sicurezza, perché è usato in vitro su cellule o fluidi che non rientrano poi nel corpo.

Nel caso di un farmaco, anche se si tratta di semplici proteine somministrate a singoli individui, e non diffuse in un ampio ambiente, esiste invece il rischio che batteri vivi o altre impurezze rimangano nel farmaco.

La normativa del FDA, negli USA, per valutare l'efficienza e la sicurezza di farmaci derivanti da cellule ingegnerizzate, non si discosta tuttavia da quella, già assai accurata e complessa, in essere per i farmaci convenzionali.

Sono invece le applicazioni delle biotecnologie in agricoltura che impegnano e impegneranno in futuro, anche per le pressioni dei movimenti ambientalisti, i legislatori e gli enti preposti.

Sono invece le applicazioni delle biotecnologie in agricoltura che impegnano e impegneranno in futuro, anche per le pressioni dei movimenti ambientalisti, i legislatori e gli enti preposti.

La decisione di rilasciare nell'ambiente un seme o un microrganismo è infatti irrevocabile, e le sue conseguenze non possono mai più essere completamente previste: la loro presenza potrebbe turbare gli equilibri dell'ecosistema; oppure potrebbero moltiplicarsi in modo incontrollabile, o disperdersi in aree lontane da quelle volute; potrebbero infine trasferire il loro nuovo patrimonio genetico ad altri organismi.

Si è così assistito, negli ultimi tempi, all'introduzione di norme restrittive in alcuni stati degli Stati Uniti, ed in Germania Occidentale la commissione governativa per la genetica ha richiesto una moratoria di 5 anni prima che siano autorizzati rilasci nell'ambiente di organismi geneticamente manipolati.

Mi risulta che, almeno sino alla metà del 1988, anche in Italia non sia stato autorizzato alcun rilascio, e così pure in Giappone.

Vediamo ora alcune considerazioni su quelle che mi sembra saranno le future prospettive e peculiarità del mercato e delle produzioni biotecnologiche nel mondo.

Proseguimento del consolidamento degli operatori industriali in un minor numero di società più grandi

Molti dei circa 200 attuali piccoli operatori specializzati spariranno o saranno assorbiti da grosse compagnie in cerca di integrazione/diversificazione.

Grande importanza delle tecnologie di immobilizzazione per l'ottenimento dei più svariati prodotti

Tra questi, oltre allo sviluppo di nuovi processi impieganti bioreattori con enzimi o cellule immobilizzati, gli immunoassays in fase solida, nuovi sistemi di somministrazione di farmaci, biosensori, biochips, e l'immobilizzazione di farmaci e tossine su anticorpi monoclonati, entro 3-7 anni, per la terapia del cancro.

Uso generalizzato, entro 5-10 anni, di biosensori

Impiego di sensori biologici avanzati, e di biochips.

In industrie del tipo più svariato, per diagnosi e controllo di processo.

Per i biochips le prime applicazioni riguarderanno sistemi ibridi di tipo « bio-silicio » in grado di ampliare le possibilità delle attuali tecnologie al silicio.

Prodotti a più elevate attività e/o efficacia ottenuti mediante « ingegneria molecolare »

Sono stati ad esempio già sintetizzati enzimi che mimano l'attività di enzimi naturali più costosi, per l'impiego in bioreattori industriali, immunoassays, biosensori, etc.

Si stanno anche studiando, come vaccini sintetici, peptidi che mimino l'azione di agenti infettivi.

Grande importanza delle tecnologie di purificazione dei prodotti ottenuti mediante biotecnologie

Particolarmente le tecniche cromatografiche di affinità, o biospecifiche, che permettono, mediante interazione con materiale immobilizzato, l'isolamento e la purificazione in poco tempo e nel minor numero di passaggi del prodotto biologico di interesse.

Grande importanza dei processi biotecnologici per produrre « specialties » di tipo chimico

In particolare nei seguenti settori: prodotti chimici per l'agricoltura; aromi ed essenze; enzimi industriali; polimeri speciali; prodotti per il disinquinamento.

Si ritiene infatti che minori restrizioni legislative, rispetto ai prodotti destinati alla salute umana o animale, permetteranno una più rapida commercializzazione di questi prodotti.

Grande importanza di prodotti e tecnologie d'avanguardia per la diagnostica umana

Il settore è caratterizzato, rispetto ad altri segmenti del settore « salute umana », da: possibilità di rapida entrata sul mercato; margini di profitto elevati; minore investimento in R & S.

Si prevede un ampio uso di kits basati su anticorpi monoclonati, per la loro rapidità, sensibilità, precisione e facilità di uso.

Grande potenzialità per peptidi di impiego terapeutico, ottenuti mediante ingegneria genetica

Si prevedono in particolare grandi possibilità per l'alfa-1-antitripsina (enfisema), il peptide natriuretico atriale (ipertensione e insufficienza cardiaca congestizia), e la lipocortina (come antinfiammatorio a bassi effetti collaterali).