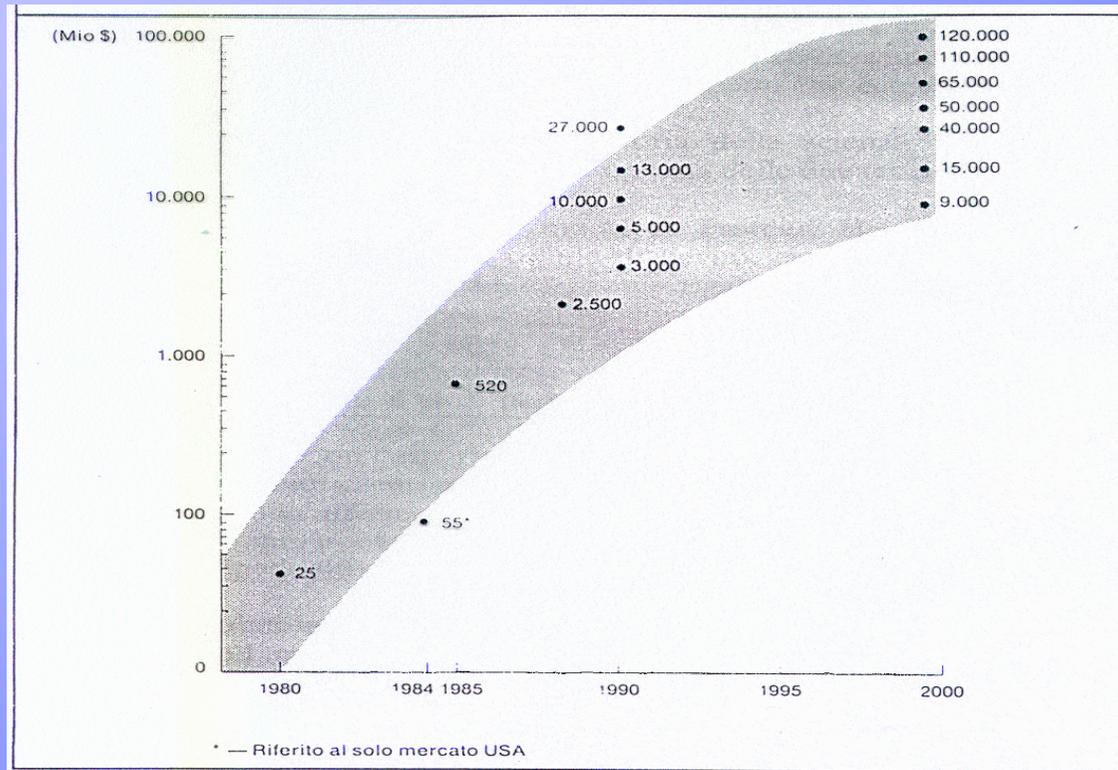


BIOTECNOLOGIA:

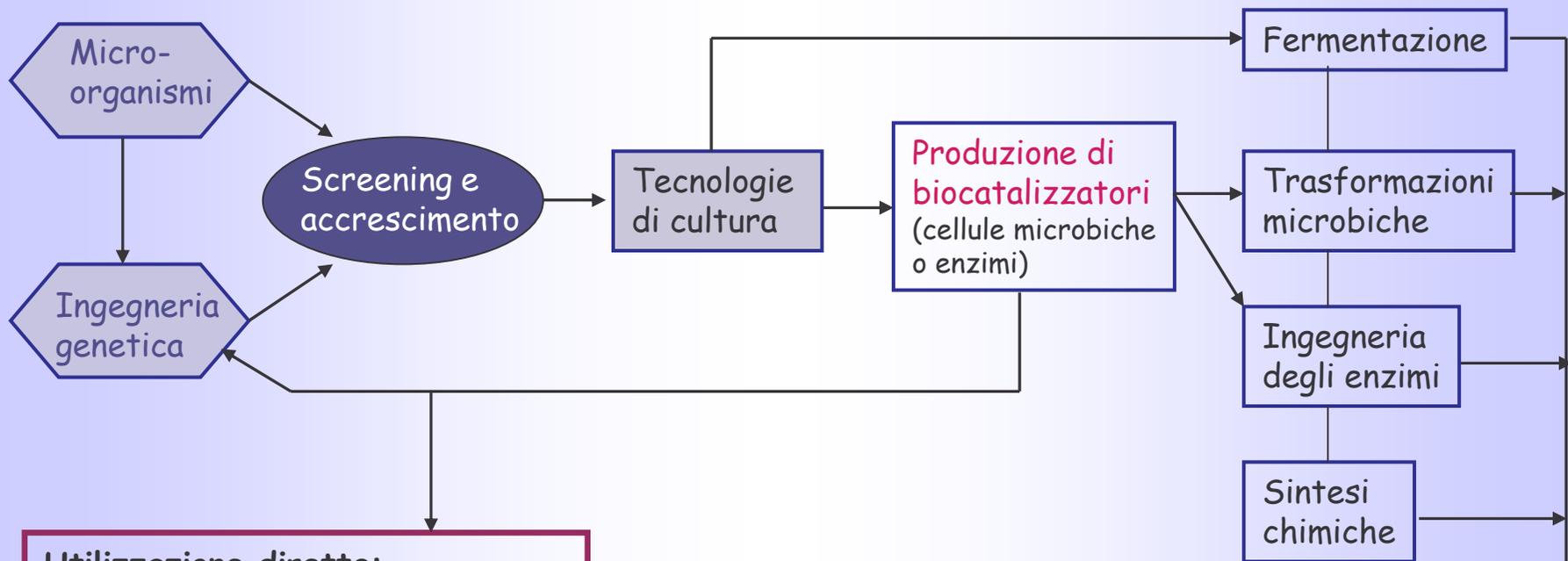
"Applicazione dei principi della scienza e dell'ingegneria al trattamento dei materiali con agenti **BIOLOGICI** per produrre beni e servizi"

Chimica delle fermentazioni
e microbiologia industriale
(Piccin)

Fig.1 Mercato mondiale dei prodotti ottenuti con le biotecnologie 1980-2000 in Mio \$



Valore economico delle biotecnologie (da *Le biotecnologie in Italia: un'opportunità di sviluppo industriale*. Sviluppo chimica).¹



Utilizzazione diretta:
 fermentazione, produzione di additivi alimentari, produzione di composti farmaceutici, **trattamento di rifiuti**, di alimenti, produzione della birra, etc.

- **Applicazioni a processi industriali:** produzione o processamento di alimenti, produzione di molecole farmaceutiche, pesticidi, aminoacidi, nucleotidi, composti biologicamente attivi, profumi, etc.
- **Applicazioni ad analisi:** analisi di alimenti, cliniche, ambientali, controllo di qualità.
- **Applicazioni a terapie mediche:** organi artificiali, terapia, diagnosi.
- **Applicazioni alla produzione di energia:** **applicazione al trattamento dei rifiuti.**

Fig. 2. Aree di applicazione

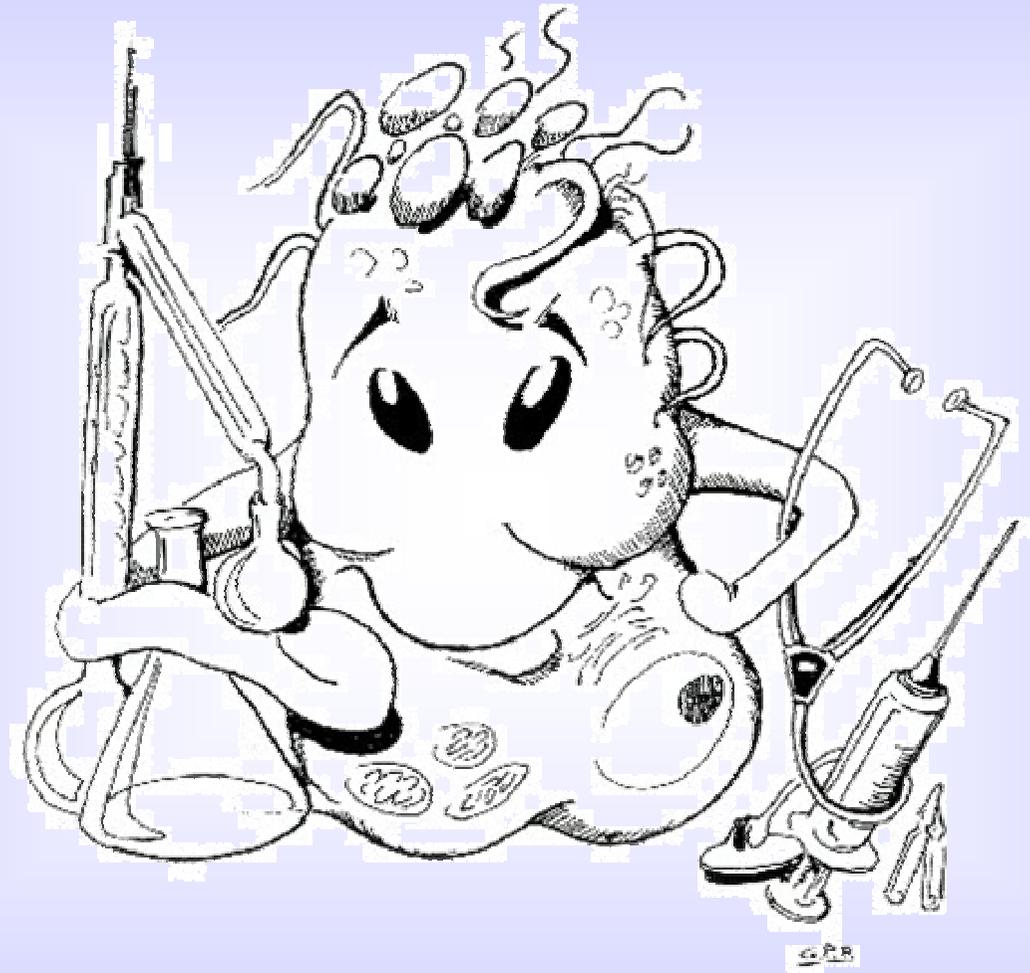


Fig. 3

Obiettivo

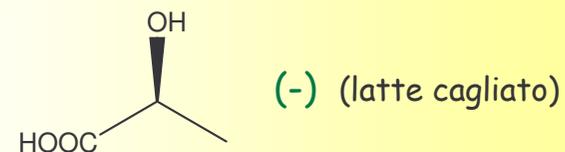
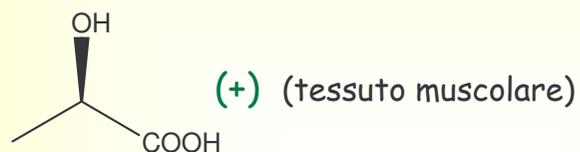
"Ottenerne una struttura molecolare ben definita "
(TARGET)

STRUTTURA MOLECOLARE

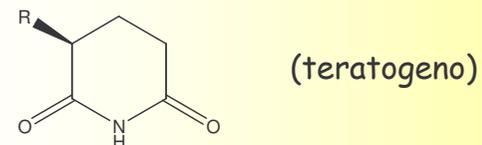
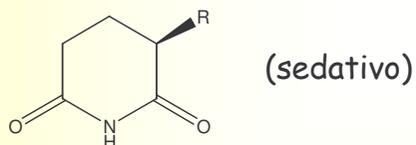
- * tipo di atomi
- * come sono legati tra di loro
- * **stereochimica**

ESEMPI DI TARGET:

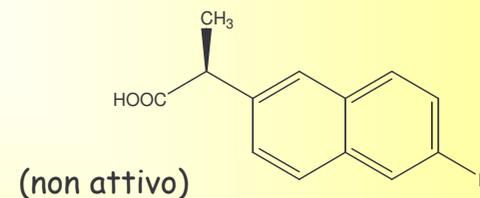
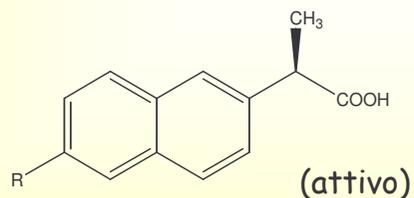
Acido Lattico



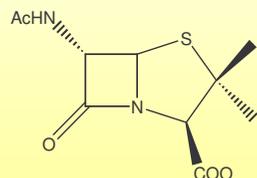
Talidomide



Naproxene

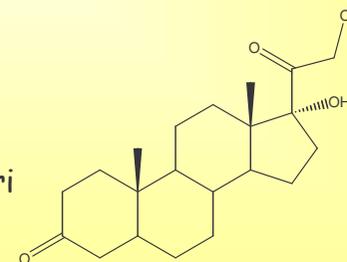


Penicillina G



Cortisone

7 centri chirali = 2^7 stereoisomeri



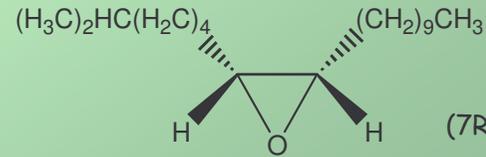
FEROMONI

Campo di interesse: AGRICOLTURA

L'eossido della *Limantria Dispar*

Prendiamo in esame un feromone specifico, il *dispaluro*, attrattivo sessuale della *Limantria dispar*, un insetto capace di devastare foreste di conifere, boschi di latifoglie ed interi frutteti. Le sue larve, che nascono in primavera, sono estremamente voraci e riescono a privare un albero delle sue foglie in poche settimane. L'estremità dell'addome (gli ultimi due segmenti) della farfalla femmina contiene l'attrattivo sessuale. Una estrazione da 78000 addomi ha consentito di isolare il principale attrattivo sessuale.

L'isomero attivo ha configurazione *R* al C-7 e configurazione *S* al C-8. Sebbene questo isomero possa essere rilevato dalla *Limantria* maschio a concentrazioni fino a 10^{-10} g/ml, l'altro enantiomero è inattivo anche a concentrazioni 10^6 volte più grandi.



(7R,8S)-(+)-7,8-epossi-2metilottadecano
(dispaluro)

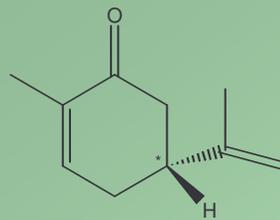


L'odore e la chiralità

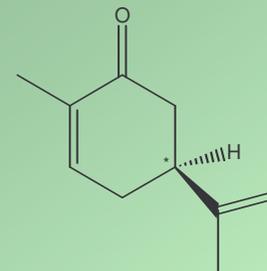
Campo di interesse: INDUSTRIA ALIMENTARE
INDUSTRIA DEI PROFUMI



MENTA



(-)-carvone
p.e. 231°C

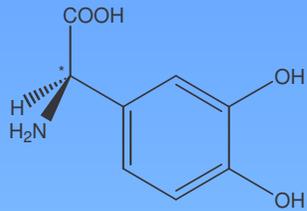


(+)-carvone
p.e. 231°C

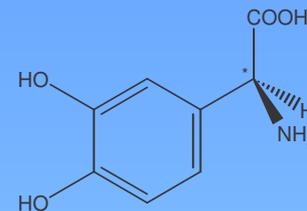


SEMI DI CUMINO 5

FARMACI

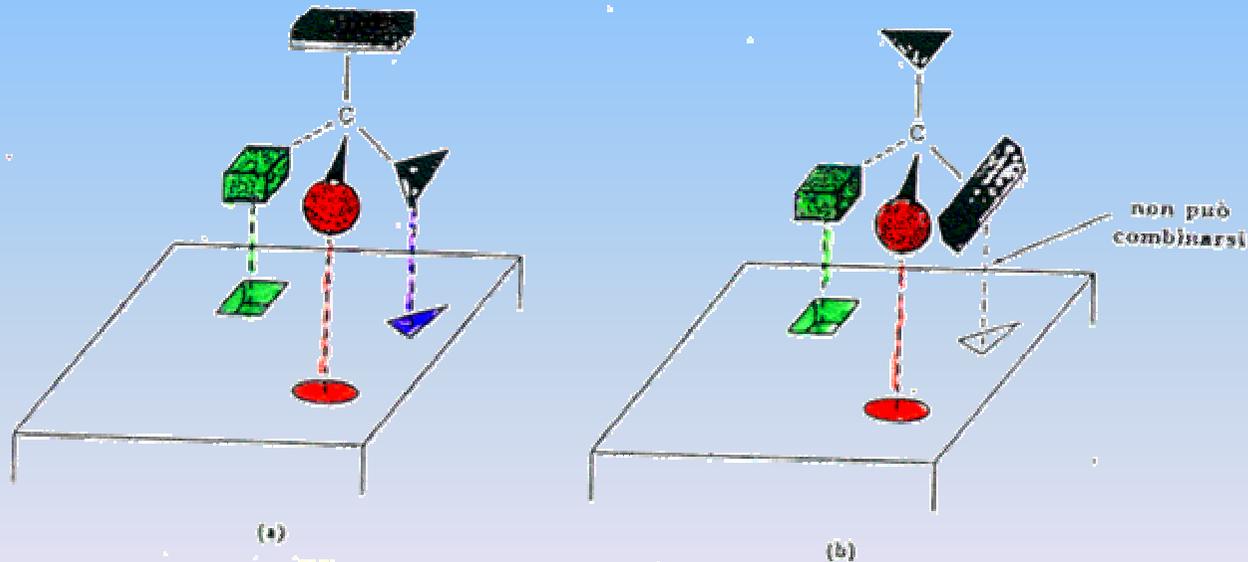


(+)-dopa (nessun effetto biologico)



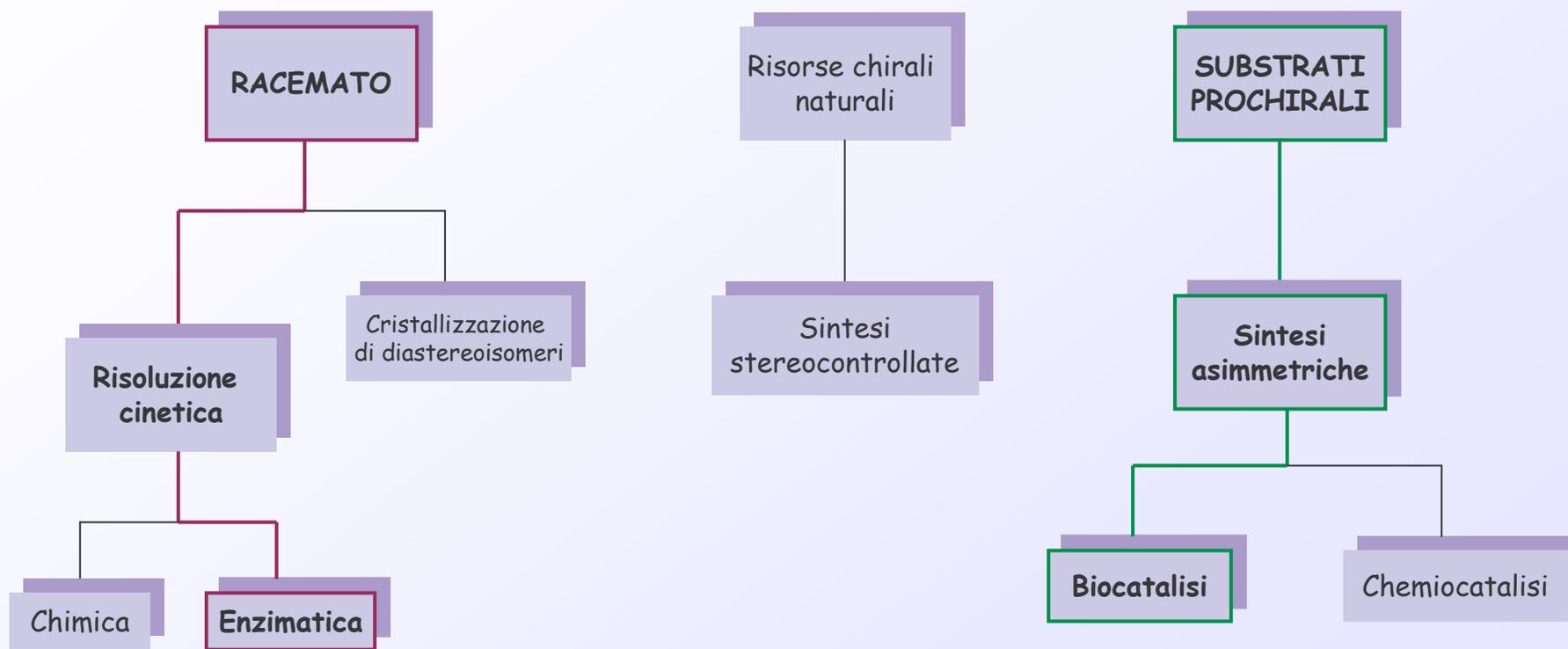
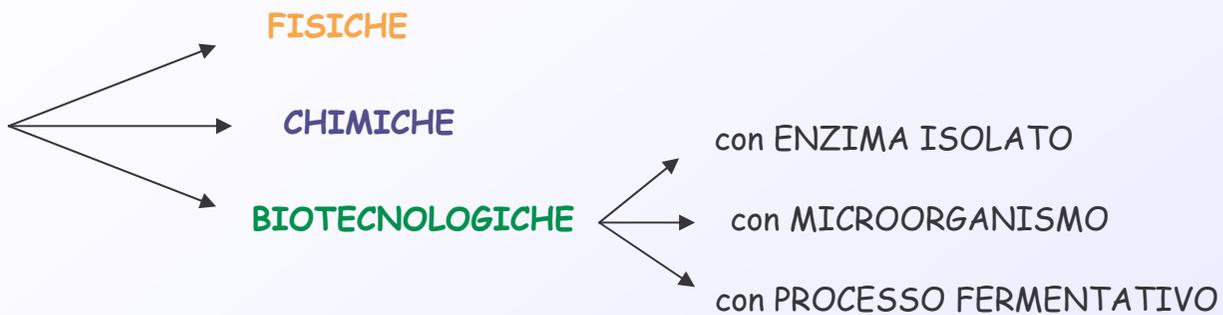
(-)-dopa (farmaco antiparkinsonismo, malattia cronica del sistema nervoso centrale)

PERCHE' QUESTA NECESSITA' "STEREOCHIMICA"?

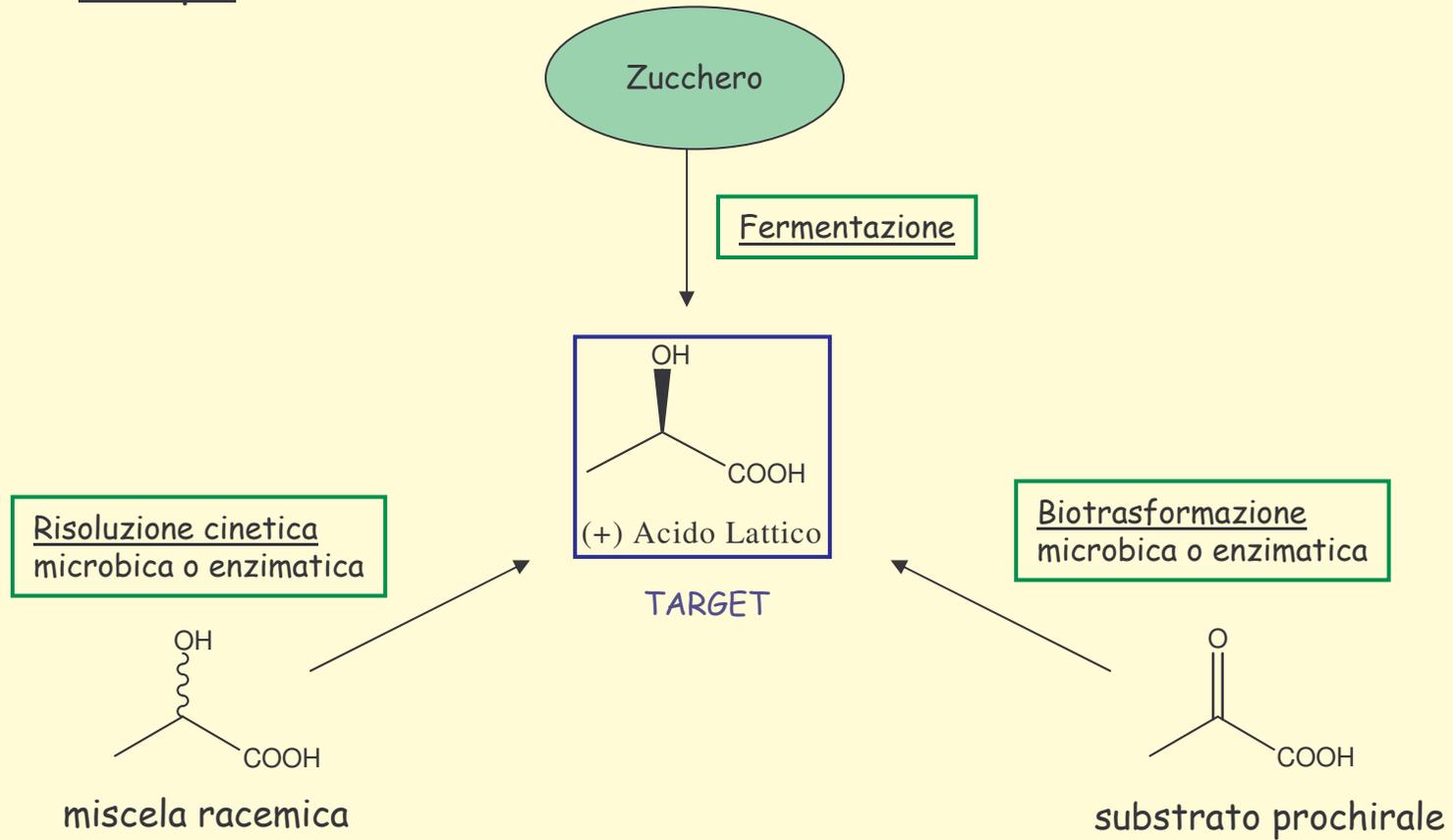


La molecola chirale deve combinarsi con il recettore chirale nel sito bersaglio, come una mano entra nel suo guanto

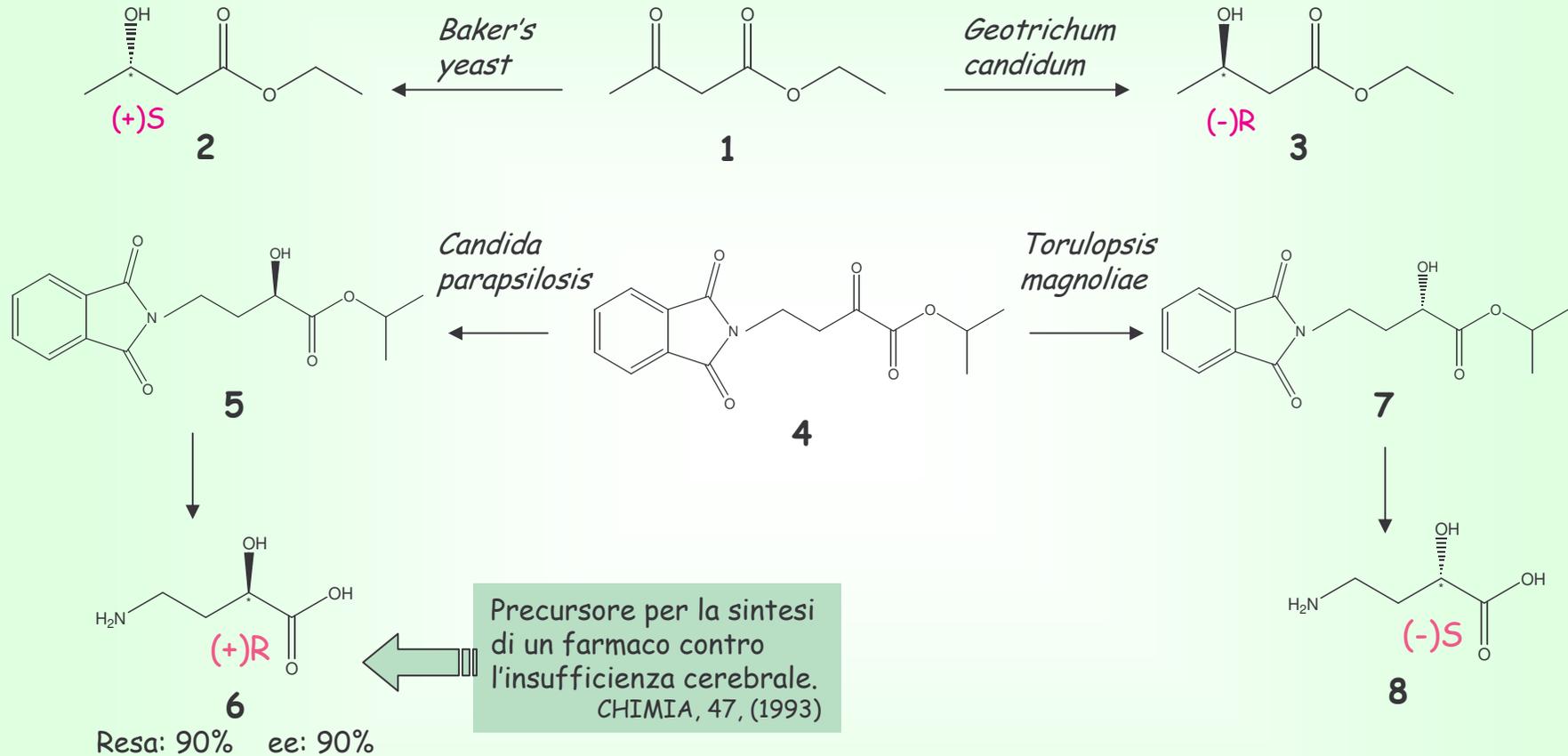
METODOLOGIE per ottenere un TARGET



Esempio



Biotrasformazione con cellule intere



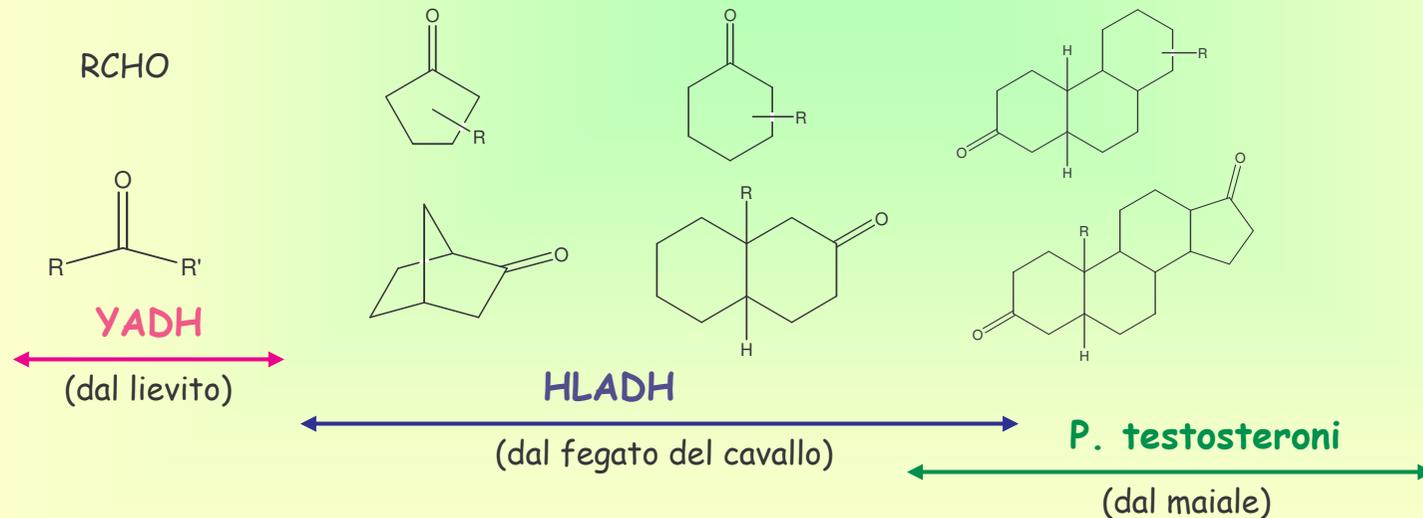
BIOTRASFORMAZIONE: sintesi di molecole otticamente attive usate come "sintoni" (equivalenti sintetici) per la preparazione di farmaci otticamente attivi.

ENZIMI: Biotrasformazioni con enzimi isolati

Tab. 1 - Numero di enzimi purificati e disponibili in commercio classificati in funzione del tipo di attività enzimatica svolta.

Tipo di enzima	Numero di enzimi purificati	Numero di enzimi disponibili in commercio
Ossidoriduttasi	650	90
Transferasi	720	90
Idrolasi	636	125
Liasi	255	35
Isomerasi	120	6
Ligasi	80	5

Alcoldeidrogenasi, ADH



A seconda della provenienza dell'enzima abbiamo una "specificità" verso i substrati

Tab. 2 - Confronto tra reazione enzimatica e chimica

CONDIZIONI DI REAZIONE	Reazione enzimatica	Reazione chimica
Temperatura	ambiente	generalmente alta
Pressione	atmosferica	generalmente alta
Solvente	acqua	solventi organici, acqua
CARATTERISTICHE		
Specificità	alta	bassa
Stereospecificità	alta	bassa
Regiospecificità	alta	bassa
Concentrazione di substrato e prodotto	bassa	alta



Problematiche:

- cofattore / rigenerazione
- stabilità
- costo / purificazione



Prospettive:

- immobilizzazione
- solventi organici
- cambio di selettività

Catalisi enzimatica: MECCANISMO

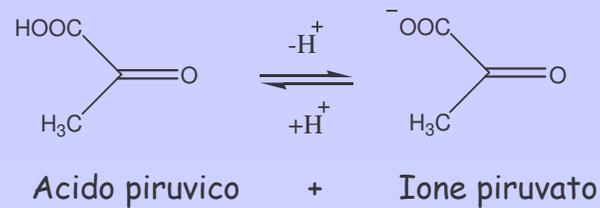
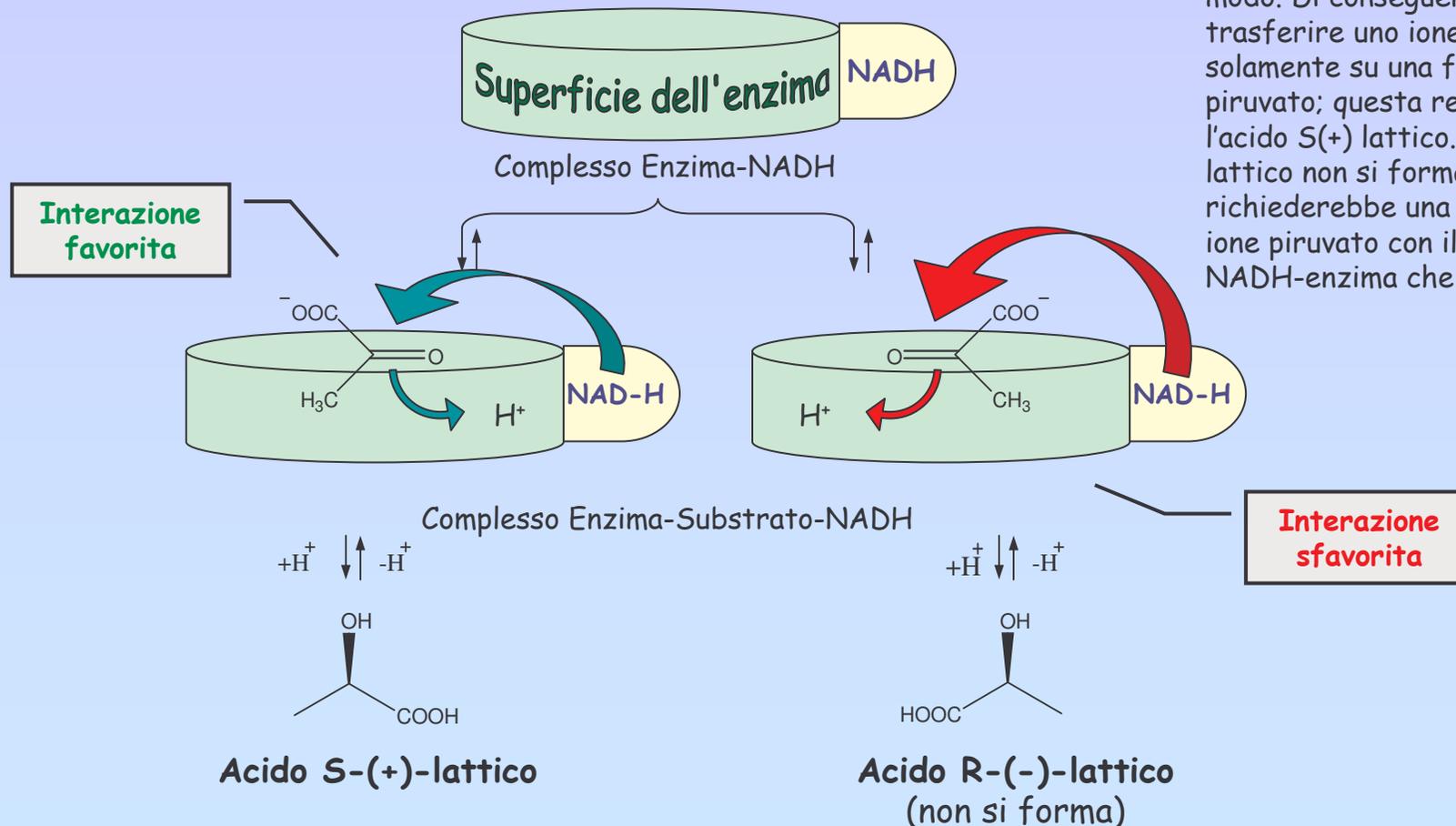


Fig. 4- Un meccanismo che spiega la stereoselettività della riduzione enzimatica dell'acido piruvico ad acido S-(+)-lattico. Lo ione piruvato si può legare alla superficie del complesso enzima-NADH in un solo modo. Di conseguenza l'NADH può trasferire uno ione idruro solamente su una faccia dello ione piruvato; questa reazione produce l'acido S(+) lattico. L'acido R(-) lattico non si forma perché questo richiederebbe una interazione dello ione piruvato con il complesso NADH-enzima che è favorita.



LA TECNOLOGIA DELLE FERMENTAZIONI

Caratteristiche generali delle fermentazioni

In base alla loro utilizzazione commerciale le fermentazioni possono così essere classificate:

- fermentazioni in cui le cellule microbiche (biomasse) costituiscono il prodotto finale;
- fermentazioni in cui il prodotto finale è rappresentato dagli enzimi o da altre proteine;
- fermentazioni finalizzate alla produzione di metaboliti primari o secondari;
- fermentazioni utilizzate per modificare chimicamente un composto aggiunto al brodo di coltura (biotrasformazione).

A queste, che sono le fermentazioni principali, si possono aggiungere:

- fermentazioni usate per la depurazione delle acque di scarico;
- fermentazioni usate per produrre biogas;
- fermentazioni usate per la lisciviazione di minerali.

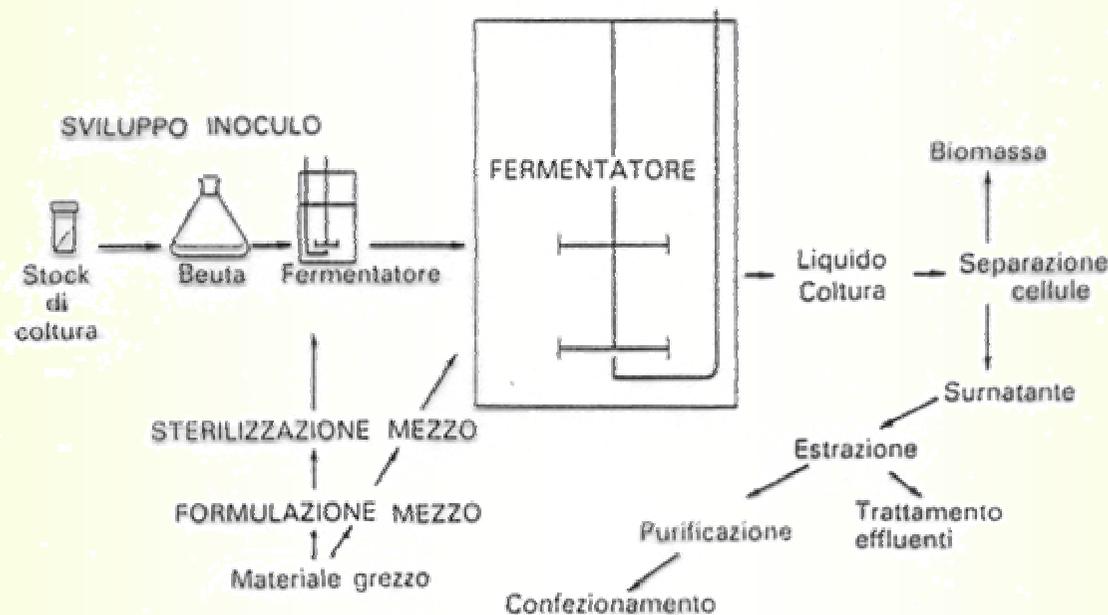
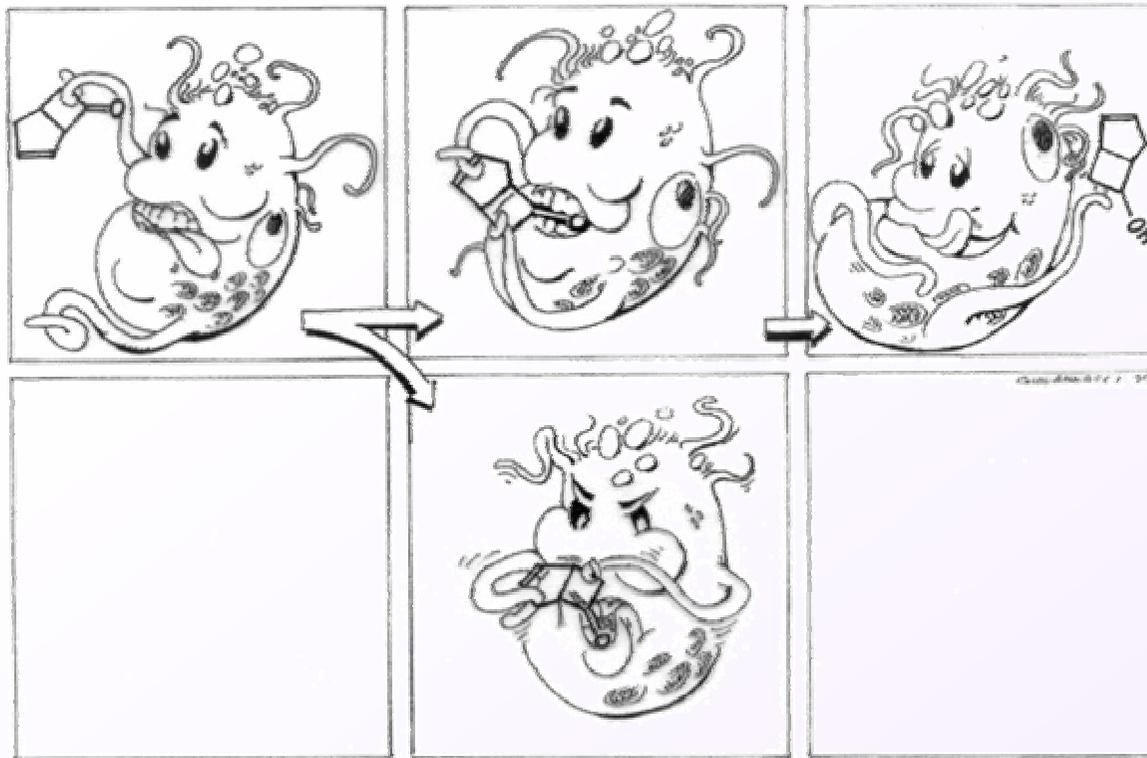


Fig. 3.1. Schema di una fermentazione industriale.

Tab.3 - Confronto tra biotrasformazione e fermentazione.

	Trasformazione microbica	Fermentazione
Stato del microorganismo	Cellule in crescita Cellule a riposo Cellule essiccate	Cellule in crescita
Tipo di reazione	Semplice reazione catalitica, solitamente di uno o pochi passaggi	Processo metabolico, reazione a molti stadi
Tempo di reazione	Breve	Lungo
Materiale di partenza	Substrati costosi	Fonti di carbonio e azoto
Prodotti	Naturali e non	Solo naturali
Concentrazione prodotti	Alta	Bassa



Nella biotrasformazione si aggiunge un substrato estraneo e si isola il prodotto.

BIOTRASFORMAZIONE

Dalla fermentazione si isola un "metabolita"



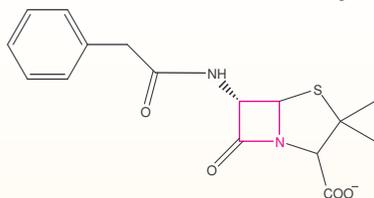
FERMENTAZIONE

Tab. 4 - Alcuni aspetti importanti nella progettazione delle biotrasformazioni.

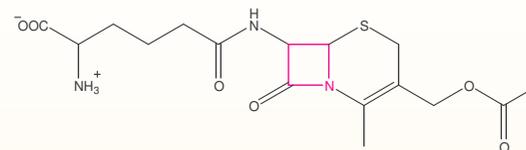
1. Fisiologia del microorganismo	
2. Metabolismo microbico e biosintesi	Nuove reazioni microbiche Nuove vie di sintesi
3. Catalisi enzimatica	Proprietà dell'enzima Meccanismo di reazione dell'enzima Valutazione del potenziale di catalisi
4. Produzione di enzima	Meccanismo di formazione dell'enzimainduttore, regolatore, etc. Miglioramento del ceppo screening, mutazioni, ingegneria genetica, etc. Ottimizzazione condizioni ambientali.
5. Modificazione degli enzimi	Modificazioni chimiche o biochimiche Immobilizzazione
6. Sintesi e trasformazioni microbiche o enzimatiche	Ottimizzazione Progettazione del disegno sperimentale.

Fermentazioni

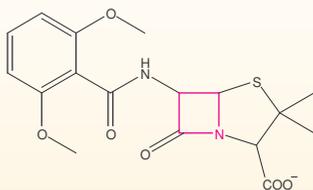
Penicillina G



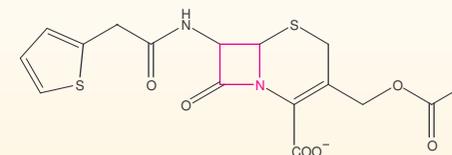
Cefalosporina C



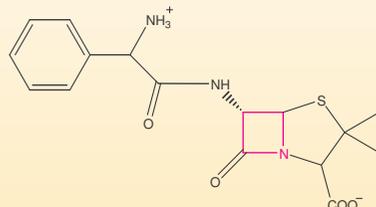
Meticillina



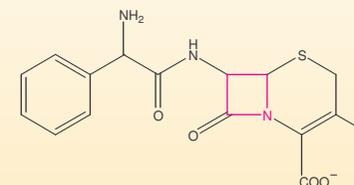
Cefalotina



Ampicillina



Cefalexina



La struttura chimica e la funzione delle penicilline e delle cefalosporine sono determinate dall'anello beta-lattamico a quattro membri (in colore): questi farmaci vengono chiamati **antibiotici beta-lattamici**.

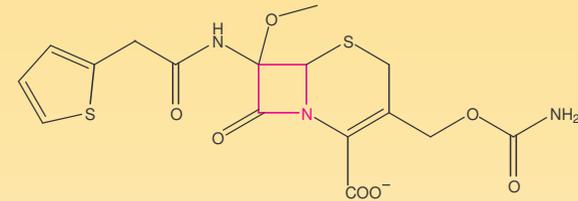
L'anello è essenziale per l'attività di questi composti in quanto blocca la costruzione di della parete cellulare batterica. I gruppi laterali attaccati all'anello possono potenziare l'antibiotico e migliorare le sue proprietà farmacologiche. Nelle penicilline cambia un solo gruppo laterale. Nella produzione commerciale la penicillina G (così come la cefalosporina C) funge da centro strutturale per l'attacco di nuove catene laterali dopo rimozione del gruppo benzilico. La meticillina è resistente all'inattivazione da parte di enzimi batterici; l'ampicillina è efficace contro i batteri Gram-negativi. Entrambi questi miglioramenti rispetto alla penicillina G sono ottenuti per mezzo dell'alterazione della catena laterale. Le cefalosporine possiedono, invece, due catene laterali variabili.

Nuovi antibiotici beta-lattamici sono stati scoperti nei brodi di fermentazione di microrganismi del genere *Streptomyces*, un sottogruppo di batteri chiamati attinomiceti. Sino all'isolamento dei prodotti degli streptomiceti le muffe *Penicillium* e *Cephalosporium* sono state la fonte unica degli antibiotici beta-lattamici.

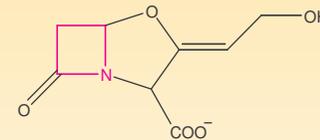
Tutte e tre le molecole possiedono un'attività antibiotica; l'acido clavulanico è anche un potente inibitore dell'azione delle beta-lattamasi. Questi enzimi batterici sono capaci di inattivare gli antibiotici beta-lattamici rompendo l'anello beta-lattamico.

L'acido clavulanico è oggi presente sul mercato in combinazione con il farmaco beta-lattamico amoxicillina; questo ibrido farmaceutico, noto come augmentina, è un antibiotico potente che è altresì resistente all'inattivazione da parte delle beta-lattamasi.

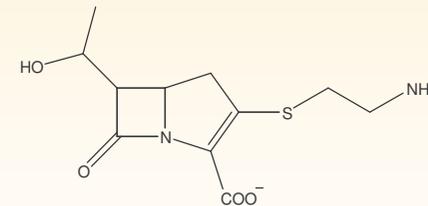
Cefoxitina



Acido clavulanico



Tienamicina



SVILUPPO DI NUOVI CEPPI

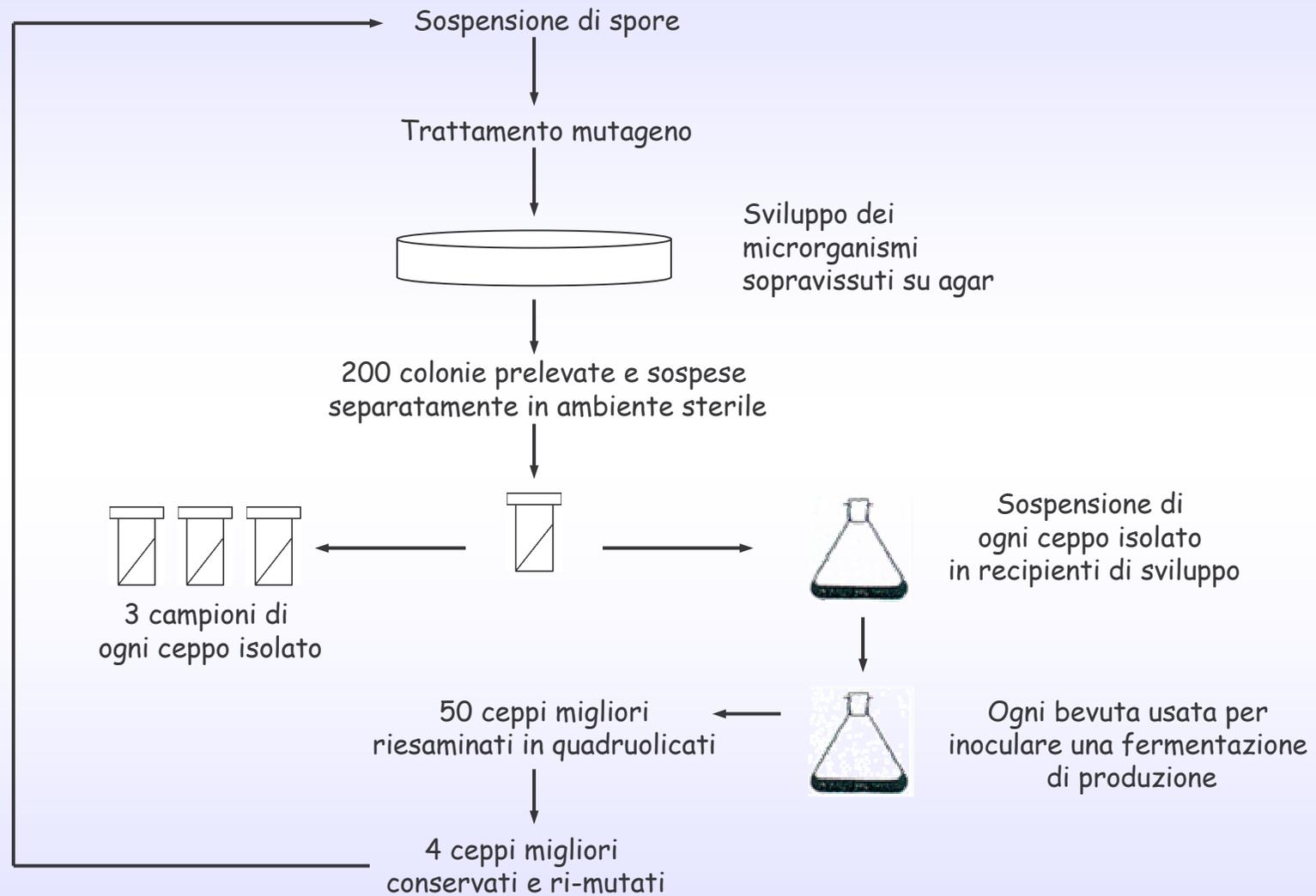
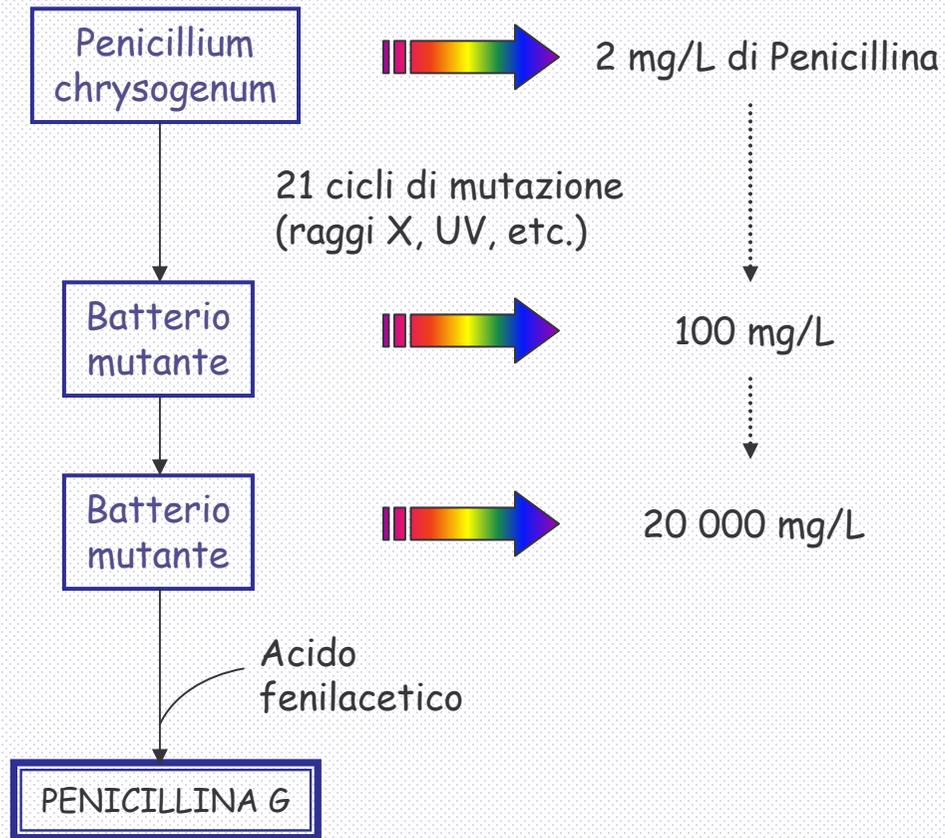
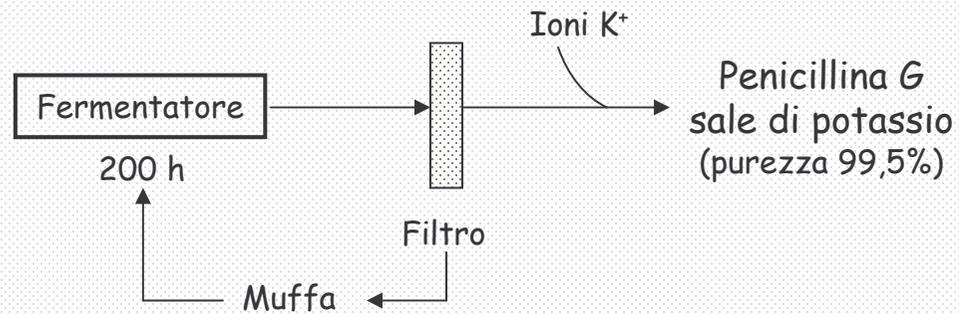


Fig.5 - L'uso delle mutazioni per il miglioramento genetico (da P.F. Stanbury - A. Whitaker, *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press PLC, 1984).

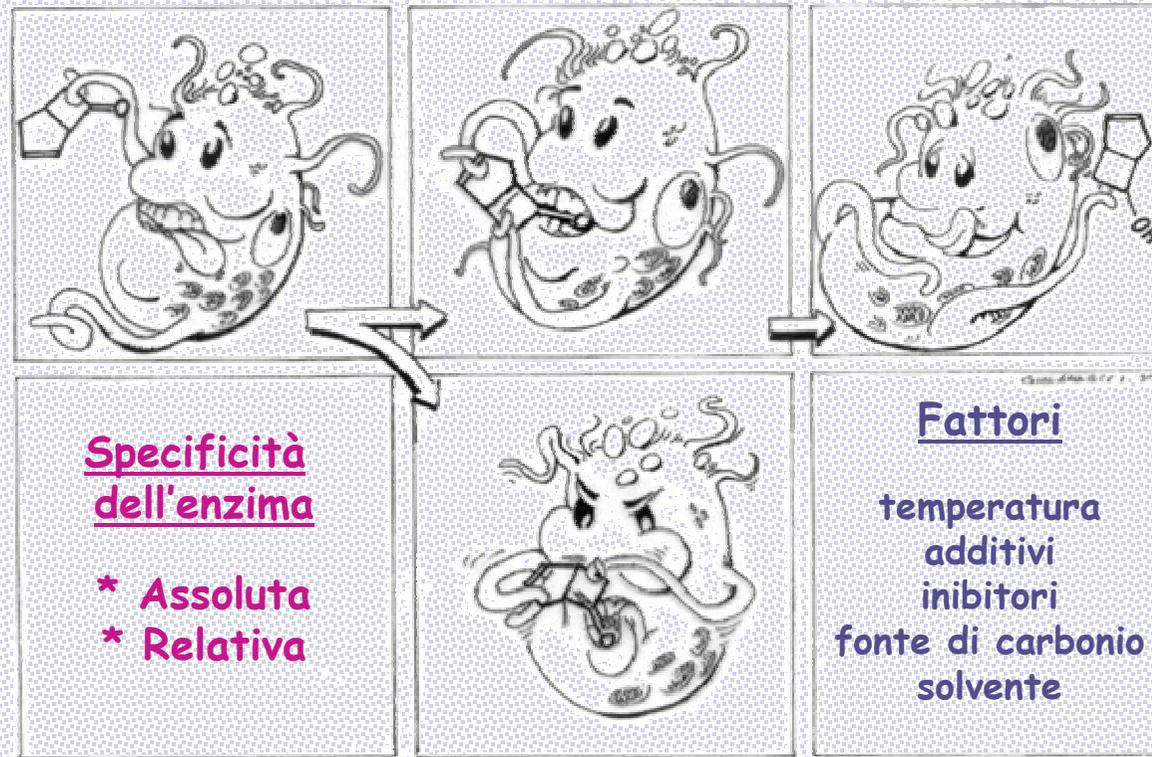
Esempio di fermentazione



Procedura:



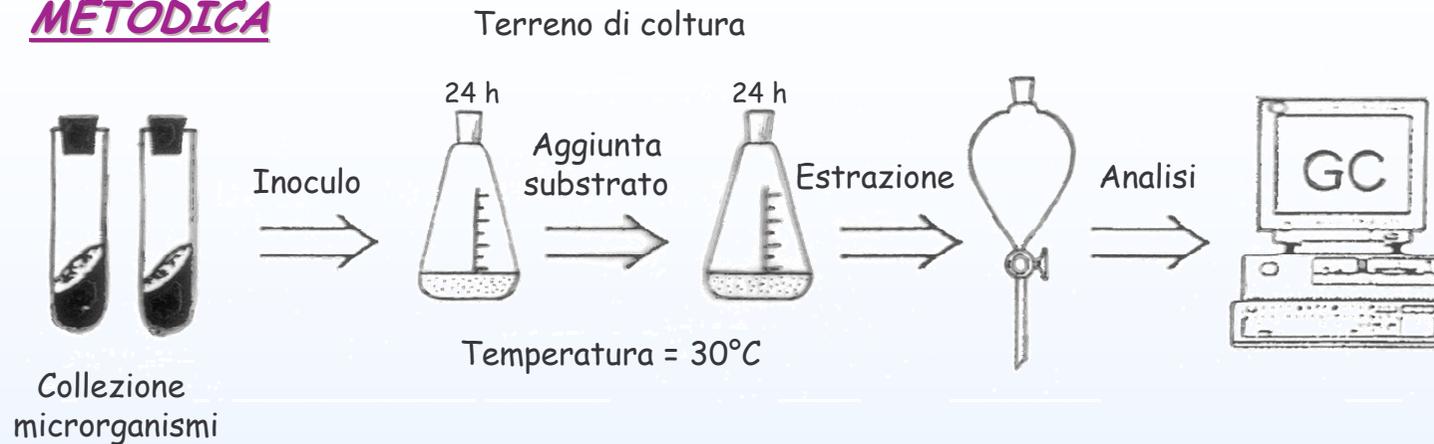
Biotrasformazione



- 1) Fase di screening: relazione microrganismo/substrato (selettività)
- 2) Fase di ottimizzazione
- 3) Fase di confronto

1) FASE DI SCREENING

METODICA



OBIETTIVO



identificazione del microrganismo più adatto

PARAMETRI OSSERVATI:

- ◆ resa della trasformazione
- ◆ eccesso stereoisomerico (enantio e diastereo)

ESEMPIO DI SCREENING

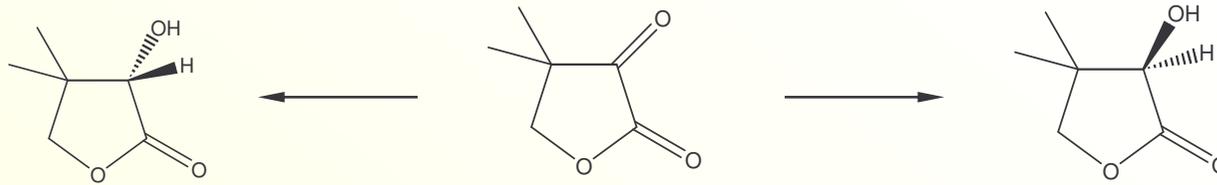
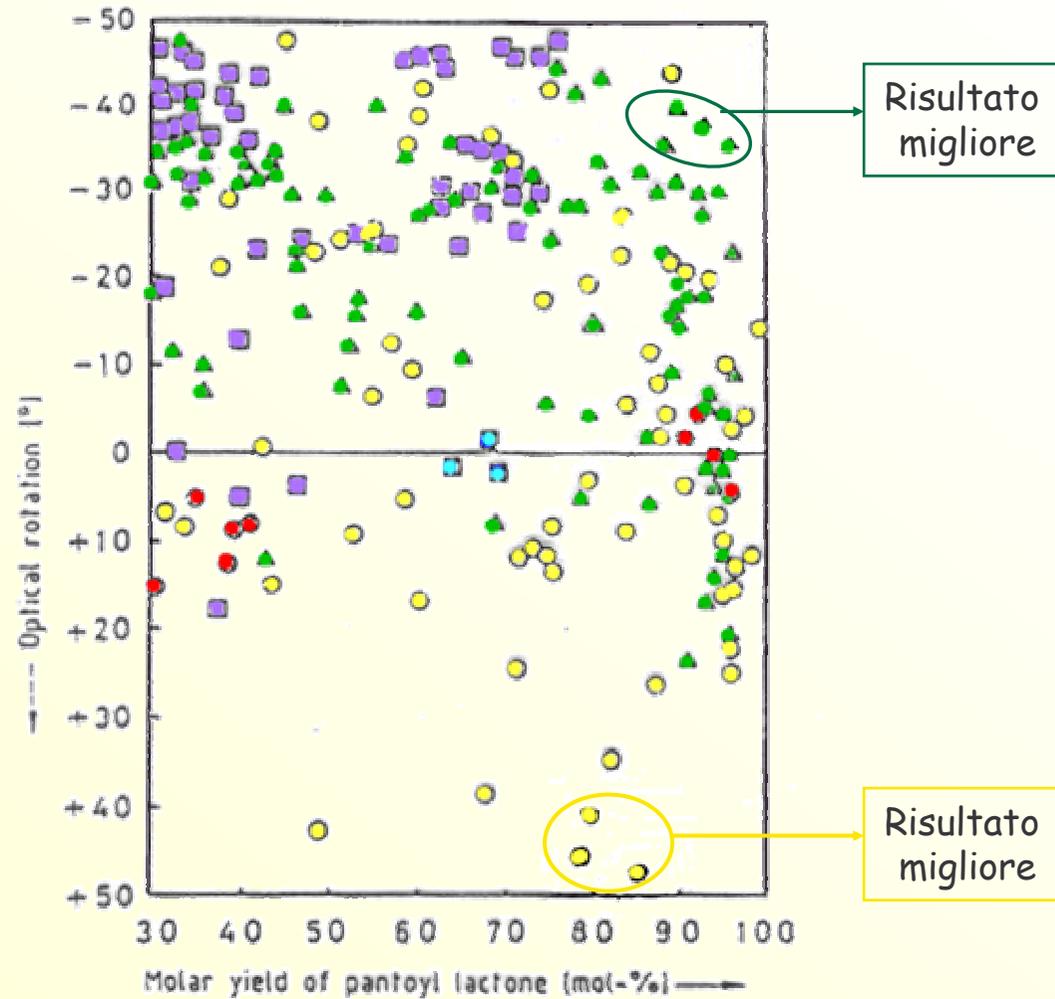
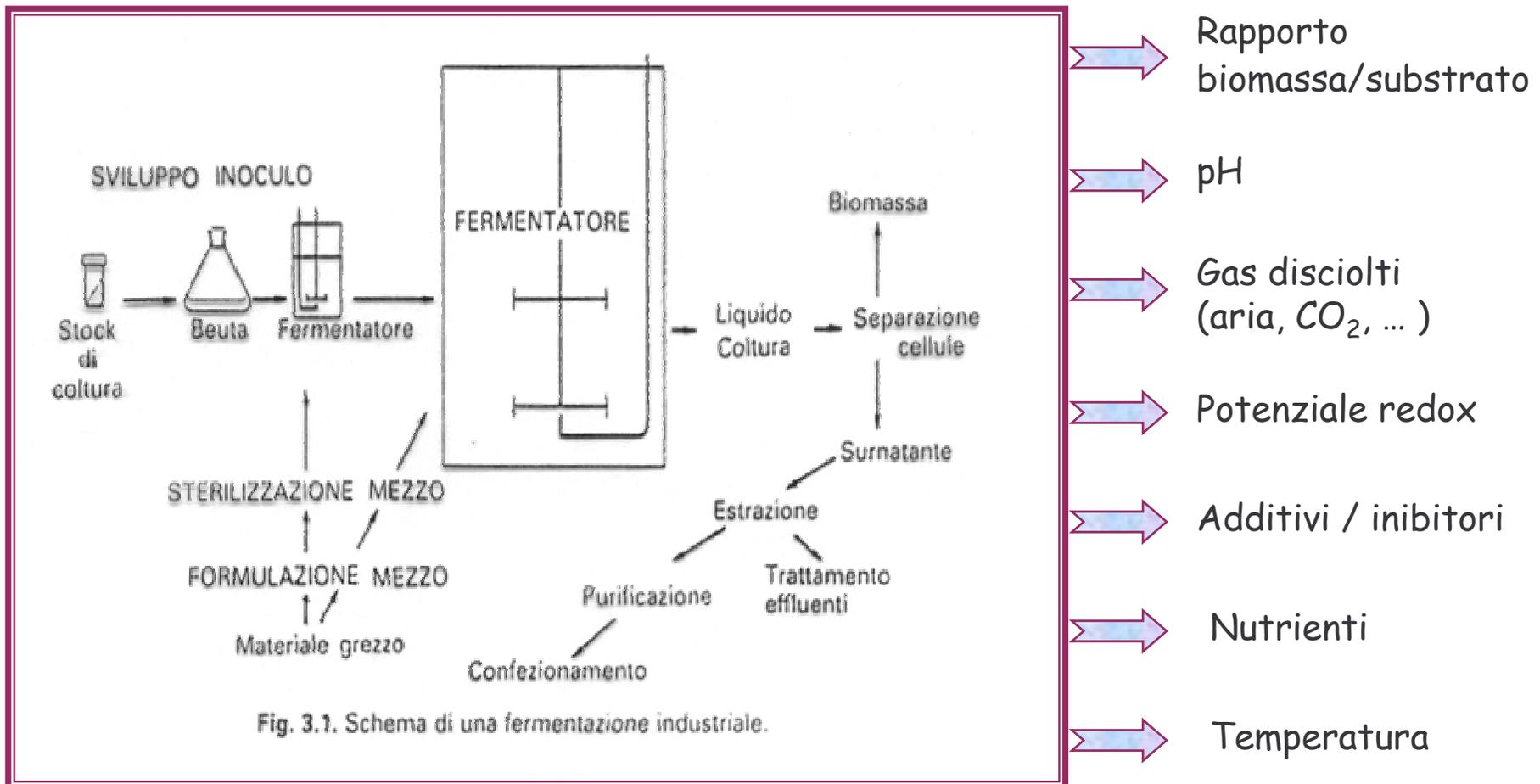


Fig. 6 - Diversità della riduzione microbica del chetopantol lattone a pantol lattone

- ▲ Lieviti
- Muffe
- Batteri
- Actinomiceti
- Basidiomiceti



2) FASE DI OTTIMIZZAZIONE



ESEMPIO DI OTTIMIZZAZIONE

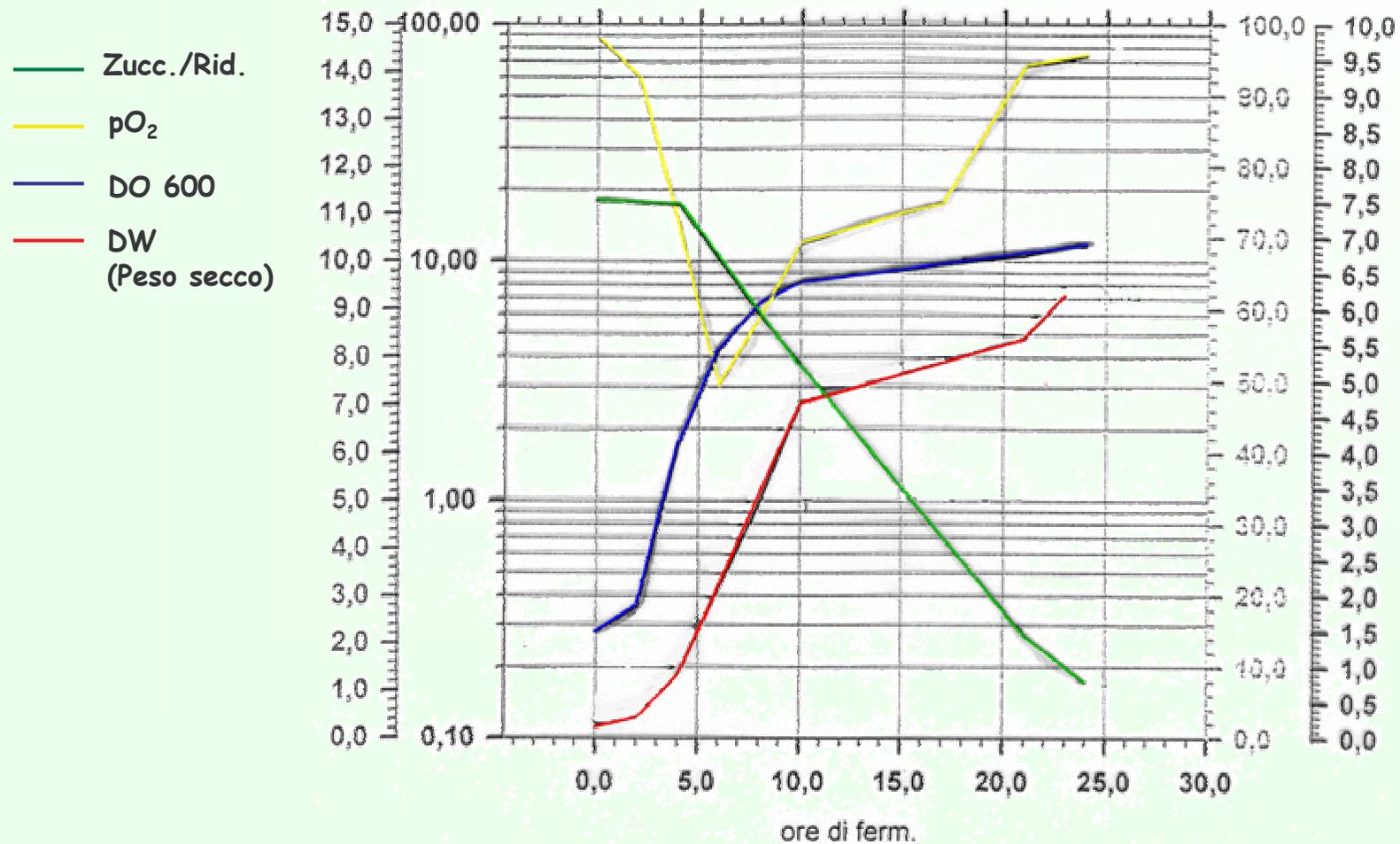
Bioindustrie Mantovane S.p.A.

Prodotto: ICE

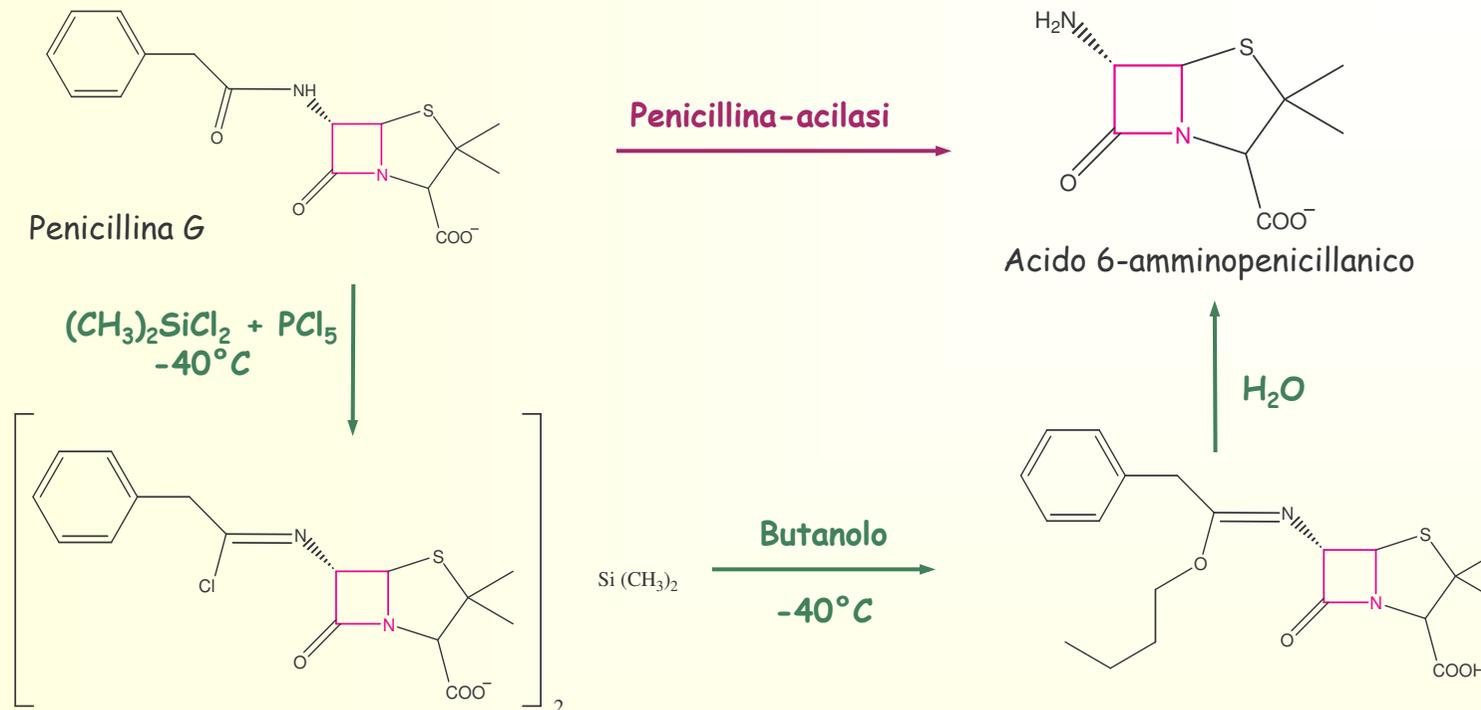
Fermentazione n.017

Terreno ICE 1/PS
pH controllato a 6,5

Data: 14/11/94

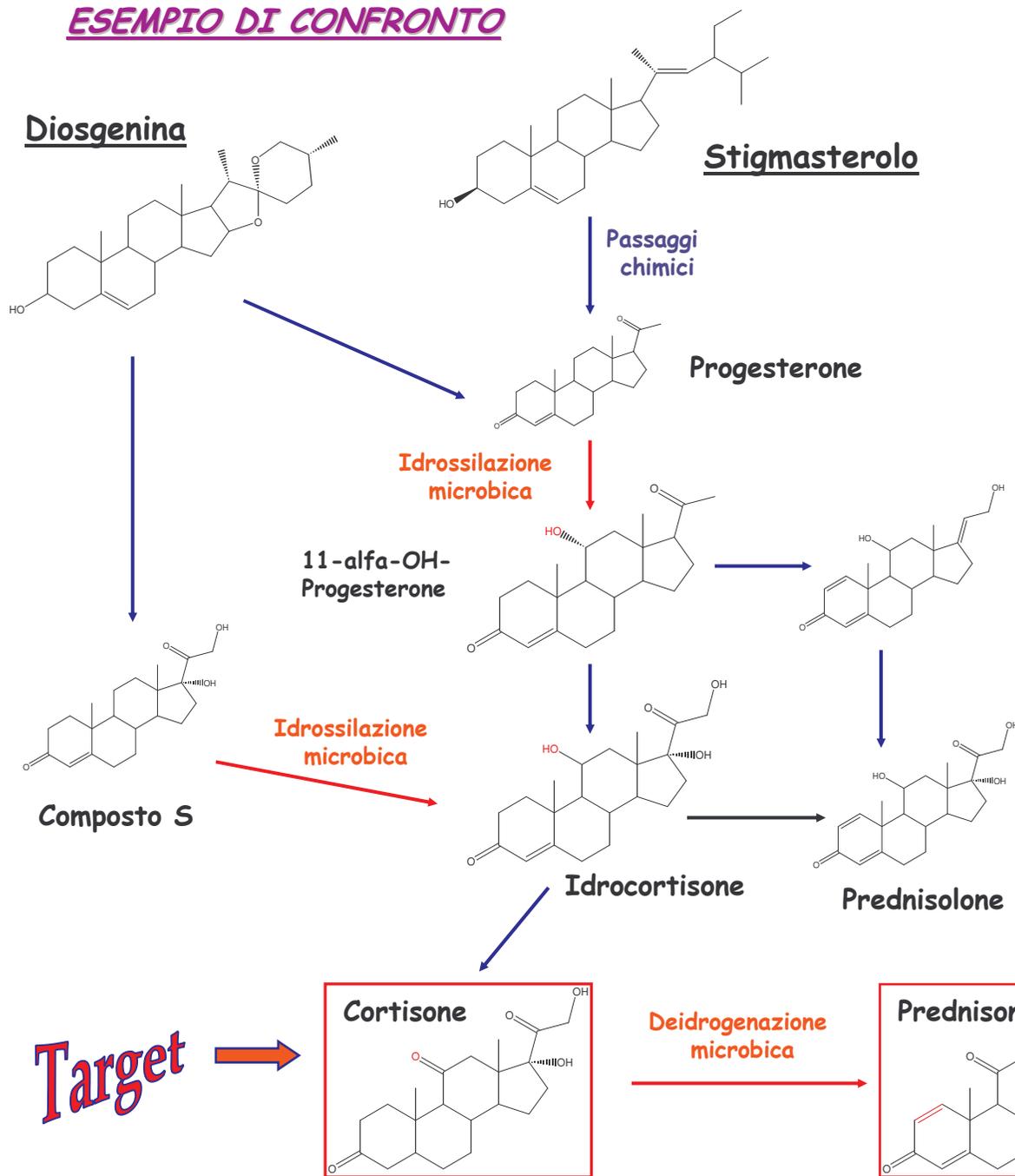


3) FASE DI CONFRONTO

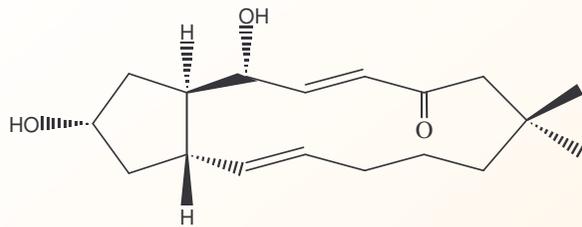


La conversione biologica della penicillina G in acido 6-amminopenicillanico (6-APA) ha meno passaggi ed è più economica della conversione chimica. Nella produzione delle penicilline semisintetiche, il 6-APA costituisce un nucleo chimico a cui possono attaccarsi le catene laterali, con la formazione di nuovi antibiotici. Se si utilizza la conversione chimica sono necessari tre passaggi a bassa temperatura e in condizioni strettamente anidre con numerosi solventi chimici. Il procedimento microbiologico utilizza i batteri che producono gli enzimi chiamati acilasi, che scindono il gruppo benzilico dalla molecola e producono il 6-APA. **La fermentazione avviene in acqua a 37 gradi centigradi.**

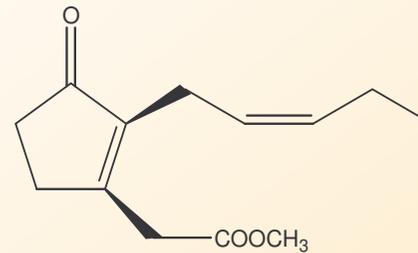
ESEMPIO DI CONFRONTO



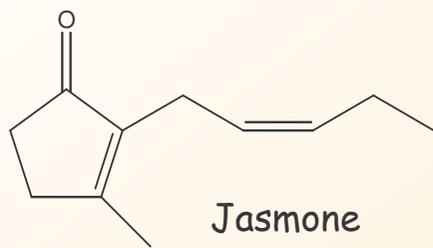
La produzione degli steroidi comprende numerosi importanti passaggi microbiologici in un procedimento costituito principalmente da sintesi chimiche. I materiali di partenza per la produzione sono gli steroli. Lo stigmasterolo è un prodotto secondario dell'industria dell'olio di soia; la diosgenina viene estratta dalle radici del barbasco. Gli steroli vengono convertiti in una serie di passaggi chimici in uno dei due composti intermedi: il composto S ed il progesterone. Una muffa fungina (il *Rhizopus nigricans* o la *Curvularia lunata*, a seconda del composto intermedio) viene poi utilizzata per idrossilare la molecola. Questo passaggio microbiologico è stato di importanza cruciale nello sviluppo di un metodo commercialmente valido di produzione degli steroidi. **Il metodo chimico di idrossilazione è complesso e difficile: la scoperta di un metodo biologico ha ridotto la sintesi completa da 37 a 11 passaggi**, abbassando il costo unitario di produzione. Gli steroidi furono perciò resi alla portata economica della maggior parte dei pazienti. L'altro importante passaggio microbiologico è la deidrogenazione, cioè la rimozione di due atomi di idrogeno dal nucleo dello steroide. Procedimenti analoghi sono utilizzati nella produzione del cortisone, dell'idrocortisone, del prednisolone e del prednisone, che possiedono proprietà farmacologiche diverse da quelle degli steroidi naturali.



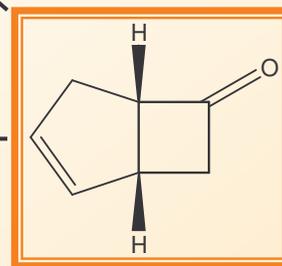
Brefeldina A



Epijasmonato di metile

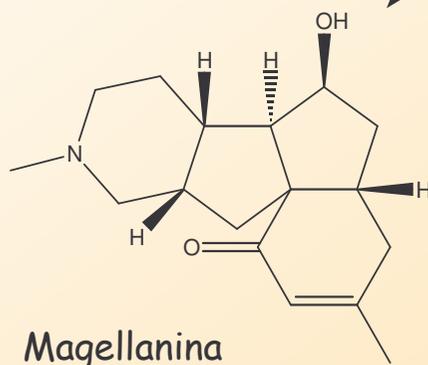


Jasmone

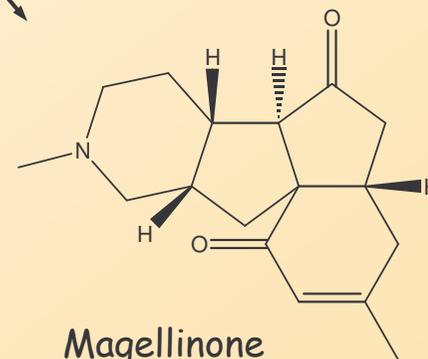


(1)

PROSTAGLANDINE

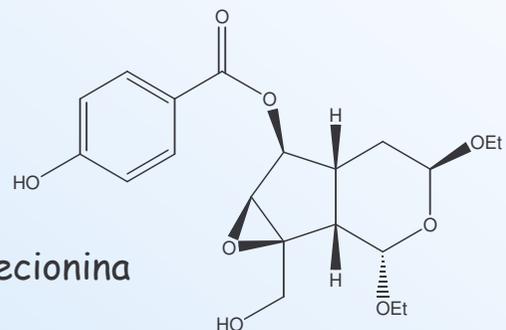


Magellanina

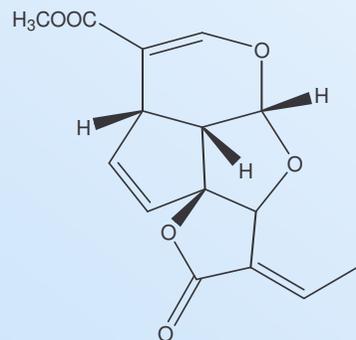
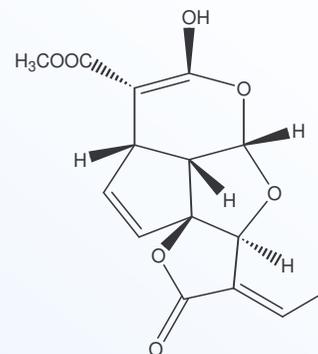


Magellinone

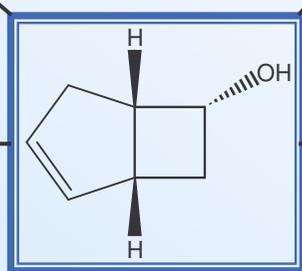
Specionina



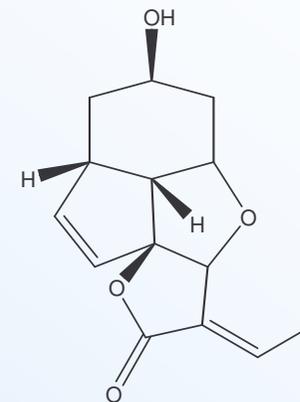
Allamandina



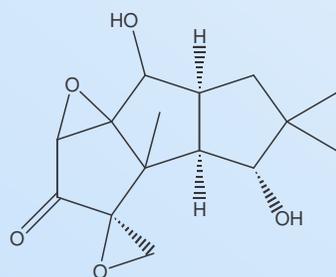
Plumericina



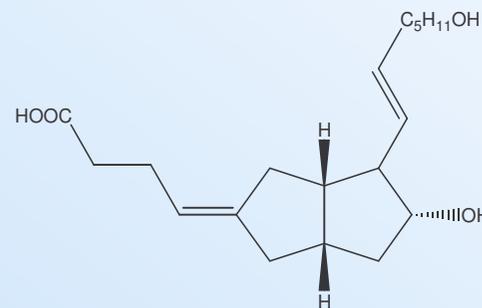
(2)



Allamicina



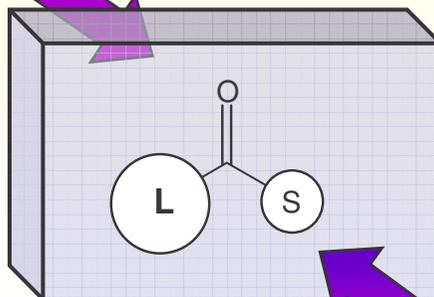
Coriolina



9-(o)-Metanoprosteciclina

Come variare la STEREOSELETTIVITA'

Faccia-*Re*



Faccia-*Si*

Aggiunta di additivi

Inibizione o attivazione di enzimi

Variazione delle condizioni di biotrasformazione

Inibizione o attivazione di enzimi diversi

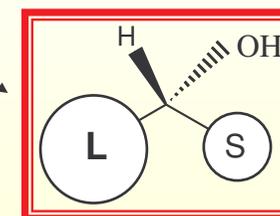
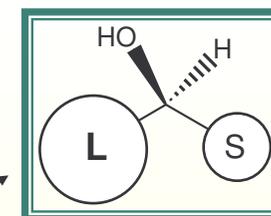
Modificazione del substrato

Variazione dell'ingombro sterico

Screening microbiologico

Ricerca di enzimi diversi

Enantiomero S



Enantiomero R