

SIMONA DALY¹

I microbi nei bioprocessi industriali

¹ Gnosis by Lesaffre

I. INTRODUZIONE

Uno dei settori in cui i microrganismi sono da sempre largamente impiegati è quello dei processi industriali per la produzione di sostanze destinate alla cura o prevenzione di malattie, o comunque al miglioramento della qualità della vita. Tali microrganismi comprendono principalmente batteri e lieviti, ma anche virus, fagi, alghe unicellulari, ed è grazie all'uso delle biotecnologie che le loro attività biologiche naturali possono essere utilizzate come tali, oppure modificate, per ottenere prodotti a livello industriale.

I microrganismi e i bioprocessi sono stati utilizzati fin da epoche storiche molto lontane, all'inizio a scopo per lo più alimentare per la trasformazione spontanea di materie prime, come batteri lattici fermentanti usati per produrre formaggio e yogurt dal latte, o lieviti usati per le prime fermentazioni per ottenere birra, vino, pane.

Con l'identificazione degli agenti responsabili di tali trasformazioni nascono le biotecnologie, processi di trasformazione guidati e controllati che hanno avuto un enorme sviluppo nel corso degli ultimi due secoli. Sono proprio le ricerche di Louis Pasteur sulla fermentazione lattica e alcolica, e l'identificazione del lievito come agente responsabile della trasformazione del mosto in vino, a essere considerati la pietra miliare per la nascita della microbiologia industriale. Con i suoi studi Pasteur dimostrò infatti che i processi fermentativi sono di origine microbica e poco più tardi furono identificati gli enzimi, sostanze contenute nei microrganismi, responsabili delle proprietà trasformanti del microrganismo stesso (Cadeddu, 1991). Verso la fine del XIX secolo i bioprocessi hanno iniziato a essere condotti in condizioni guidate e controllate e nella prima metà del '900 furono messi a punto i primi processi industriali

per ottenere su larga scala prodotti quali solventi, come acetone e butanolo, acidi organici come l'acido citrico. Accanto a queste applicazioni, che restano ad oggi sfruttate industrialmente e di grande importanza, l'uso dei microrganismi si è via via esteso ad altri settori e campi di applicazione, tra cui quello farmaceutico. Il primo farmaco prodotto sfruttando le proprietà dei microrganismi è stata la penicillina, nel 1943, subito seguita da altri antibiotici.

Sempre nella prima metà del Novecento vengono formulate le leggi che regolano la catalisi enzimatica e mediante gli enzimi si scopre che con la fermentazione è possibile realizzare modificazioni strutturali di molecole complesse, difficilmente ottenibili per mezzo della chimica classica di sintesi. Si riescono in tal modo a produrre antibiotici modificati, cortisone e suoi analoghi, aminoacidi. L'interesse commerciale dei processi fermentativi si allarga così anche verso volumi più piccoli di prodotti ad alto valore aggiunto, molecole ad attività biologica impiegate per prevenzione o cura di diverse patologie (Manzoni, 2008).

Grazie alla scoperta di Mendel delle leggi dell'ereditarietà e poi alla descrizione di Watson e Crick, nel 1953, della struttura del DNA e le scoperte che gli sono succedute, le biotecnologie hanno definitivamente ricevuto un ulteriore impulso. La nascita negli anni '80 dell'ingegneria genetica e le applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante hanno portato a un'ulteriore evoluzione e allo sviluppo delle biotecnologie innovative, bio-processi interessati da modificazioni genetiche dei microrganismi grazie alle quali diventano capaci di produrre molecole eterologhe, normalmente prodotte da altre cellule animali, di cui l'insulina è il capostipite, seguita da altre quali interferone, interleuchine, ormone della crescita, ottenibili da ceppi modificati appartenenti a diverse specie tra cui *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

L'ottenimento di tali metaboliti tramite tecniche genetiche ha reso disponibili prodotti con caratteristiche chimico-strutturali costanti e definite e in quantità adeguate alle richieste di mercato. Tale approccio consente inoltre ai pazienti di evitare rischi di contaminazione da agenti virali o prioni, potenzialmente presenti nei derivati ottenuti per estrazione da organi.

La continua richiesta da parte del mercato di prodotti biotecnologici innovativi, ottenuti mediante fermentazione di microrganismi, ha stimolato il mondo delle fermentazioni ad applicare nuove tecnologie per ottimizzare le fasi produttive del processo, allo scopo non soltanto di migliorare le rese dei prodotti ma anche la qualità. Parallelamente si è assistito anche a un miglioramento dei processi di downstream, cioè di isolamento e recupero dei prodotti di fermentazione, che sono parte integrante del processo e spesso rappresentano la parte più costosa. L'estrazione e purificazione delle molecole prodotte dai microrganismi è infatti complessa per vari motivi, tra cui spesso la bassa

concentrazione dei prodotti e la loro sensibilità a diversi parametri quali pH, temperatura, sostanze chimiche.

Esistono oggi sul mercato molti prodotti, sia per il mercato farmaceutico che nutraceutico, ottenuti mediante processi di fermentazione industriali: antibiotici, farmaci antitumorali, ormoni, immunoregolatori, vitamine, enzimi, probiotici.

I processi di fermentazione per produzioni industriali avvengono all'interno di bioreattori, con specie microbiche pure, inoculate in un terreno sterile a composizione definita, mantenendo il controllo di numerosi parametri e condizioni di axenicità. La scelta del tipo di processo produttivo e del bioreattore da utilizzare deve tener conto di diversi fattori: le proprietà del microrganismo, il suo metabolismo, il prodotto che si vuole ottenere. Deve essere garantita una buona miscelazione dei componenti della brodocoltura, un buon trasferimento di ossigeno dall'aria alla brodocoltura, una buona dispersione del calore di combustione del metabolismo, il mantenimento delle condizioni di sterilità. Le dimensioni del bioreattore variano in funzione del processo e vanno da qualche decina di metri cubi fino a qualche centinaio. La fermentazione è generalmente condotta in agitazione per mantenere omogeneo l'ambiente ed evitare la formazione di gradienti, sia di cellule che dei componenti del terreno di coltura e dei gas. I dispositivi di agitazione sono costituiti dal motore e da un albero motore a cui sono ancorate le giranti e hanno una diversa configurazione, disegnata in funzione delle caratteristiche del processo e del tipo di cellule che si devono fermentare. Per microrganismi quali lieviti e la maggior parte dei batteri, e quindi per terreni a medio-bassa viscosità, si usano agitatori veloci, tra cui i più diffusi sono quelli a turbina, a palette, a elica marina. Gli agitatori lenti si usano invece per microrganismi miceliari, quali muffe e alcuni batteri, sono adatti a brodi ad alta viscosità.

Nei processi aerobi l'agitazione ha un ruolo di primaria importanza per consentire la dispersione uniforme dell'aria in tutta la coltura e consentire così un apporto costante di ossigeno alle cellule microbiche. L'agitazione e l'aerazione sono quindi strettamente controllate, monitorando i livelli di ossigeno disciolto. L'ossigeno necessario per il metabolismo cellulare è fornito alla coltura come aria che viene compressa, filtrata e immessa nel bioreattore dal basso utilizzando la linea dell'aria. Le bolle di aria alla base del bioreattore, grazie a un sistema di distribuzione, lo sparger, risalgono all'interno della coltura fino alla superficie, rilasciando nel cammino l'ossigeno e recuperando l'anidride carbonica risultante dal metabolismo cellulare. Nella parte alta del bioreattore sono posizionate diverse entrate e uscite, controllate da elettrovalvole. Le entrate sono necessarie per l'inoculo della coltura e per eventuali aggiunte (nutrienti, correttori di pH, agenti antischiuma) nel corso del processo.

Le uscite sono impiegate per l'aria esausta ed eventuali prelievi da effettuare nel tempo per monitorare il processo. I bioreattori sono dotati di elettrodi per il controllo delle diverse variabili, quali temperatura, pH, flusso e pressione d'aria, formazione di schiuma, concentrazione di nutrienti, metaboliti e cellule. I dispositivi per la misura e la regolazione delle variabili erano un tempo semplici accessori meccanici, ora sostituiti da complessi sistemi elettronici, gestiti via computer.

La temperatura all'interno del bioreattore è mantenuta a livelli ottimali per le esigenze del microrganismo, mediante dispositivi interni o esterni. Il sistema a serpentina interna, tradizionale tecnologia dei primi bioreattori, è stato per lo più sostituito dal sistema a camicia, un'intercapedine che avvolge il bioreattore e in cui circola acqua a una determinata temperatura. In altri casi invece i bioreattori sono equipaggiati di scambiatori di calore esterni, che risultano ancora più efficienti nello scambio di calore e migliori anche per facilità di ispezione e manutenzione (Meyer et al., 2017).

Lo sviluppo di un processo fermentativo comprende diverse fasi che iniziano dalla selezione, isolamento, identificazione e caratterizzazione del microrganismo capace di produrre il prodotto di interesse e proseguono con la fase di miglioramento del ceppo per aumentare la produttività. Parallelamente vengono studiate e ottimizzate le condizioni di fermentazione, il terreno di coltura, i diversi parametri di controllo, lavorando su scala laboratorio e passando poi alla scala pilota, all'interno di bioreattori di dimensioni che vanno da pochi litri a qualche centinaio. Il processo produttivo così configurato viene trasferito alla scala industriale dove è testato in accordo ai criteri delle GMP (Good Manufacturing Practices) e convalidato mediante la produzione di lotti industriali.

Numerosi sono i vantaggi dell'uso di un processo di fermentazione per la preparazione di prodotti naturali: controllo sia della fonte naturale, rappresentata da un ceppo selezionato e stabilizzato, che del substrato e dei parametri di conduzione della fermentazione, possibilità di ottimizzazione delle fasi di fermentazione e purificazione, elevate rese produttive, costanza del processo e della qualità del prodotto.

2. ANTIBIOTICI GLICOPEPTIDICI

Tra i farmaci ottenuti mediante fermentazione di microrganismi ci sono gli antibiotici glicopeptidici, impiegati per il trattamento di infezioni gravi causate da patogeni Gram positivi come *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Clostridium difficile*. Sono la terapia di primo intervento per infezioni causate

da *S. aureus* meticillino-resistente, principale causa di infezioni ospedaliere nel mondo, e sono usati anche per trattare le infezioni causate da *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, che sono naturalmente resistenti ad altre classi di antibiotici e capaci di acquisire facilmente ulteriore resistenza attraverso mutazione o trasferimento genico orizzontale.

Gli antibiotici glicopeptidici clinicamente importanti includono antibiotici di prima generazione, come teicoplanina e vancomicina che, sebbene scoperti molti decenni fa, continuano a essere ampiamente utilizzati in ambito clinico, e antibiotici glicopeptidici di seconda generazione, quali dalbavancina, oritavancina e telavancina che sono invece stati più recentemente approvati per uso clinico, grazie alla loro maggiore potenza antimicrobica e alle loro proprietà farmacocinetiche superiori.

Teicoplanina e vancomicina sono metaboliti naturali prodotti da attinomiceti filamentosi, rispettivamente *Actinoplanes teichomyceticus* e *Amycolatopsis orientalis*. Sono molecole ad alto peso molecolare con uno scaffold comune rappresentato da un eptapeptide, legato a residui di zucchero e gruppi metilici e, nel caso della teicoplanina, ad una catena lipidica. Dalbavancina, oritavancina e telavancina sono invece loro derivati semi sintetici, hanno una potenza antimicrobica superiore al glicopeptide progenitore e causano effetti secondari di minore entità.

La grande maggioranza degli antibiotici glicopeptidici è stata scoperta mediante screening di molecole prodotte naturalmente da attinomiceti del suolo raccolti in tutto il mondo. La vancomicina è stato il primo antibiotico glicopeptidico, isolato nel 1953 da un microrganismo isolato da un campione di suolo dell'Indonesia e approvato dalla FDA qualche anno più tardi per il trattamento di infezioni da *Staphylococcus* penicillino-resistenti.

La limitata resa dei ceppi produttori wild-type ha richiesto negli anni un grande lavoro di miglioramento dei processi di fermentazione, con l'ottimizzazione dei componenti del terreno di coltura e dei parametri di fermentazione, uso industriale di terreni complessi, a basso costo, processi fed-batch per prolungare la fase di crescita del microrganismo senza inibire la produzione di metaboliti secondari (Fedorenko et al., 2015). L'ottimizzazione della fermentazione è stata condotta in parallelo con il lavoro di miglioramento dei microrganismi, sia con tecniche di microbiologia classica, quali random mutagenesi e screening di determinati tratti fenotipici associati a una maggiore produttività, sia più recentemente anche con l'applicazione delle tecniche di ingegneria genetica, agendo sulla regolazione e deregolazione del metabolismo secondario.

Grazie all'avvento delle tecnologie di sequenziamento le vie biosintetiche degli antibiotici glicopeptidici sono state in gran parte delucidate. Paralle-

lamente, negli ultimi due decenni è stato dedicato un enorme sforzo allo sviluppo di strumenti molecolari per manipolare geneticamente questi attinomiceti che sono poco adattabili alle comuni tecniche di trasformazione utilizzate per *E. coli* o per gli streptomiceti più facili da maneggiare (Kieser et al., 2000).

Questi progressi hanno creato le condizioni per passare dalla mutagenesi casuale all'ingegnerizzazione genetica sito-specifica per il miglioramento produttivo degli attinomiceti. Negli ultimi 70 anni, dalla scoperta della vancomicina, il lavoro fatto sulla caratterizzazione, produzione e modifica degli antibiotici glicopeptidici ha rappresentato un grande sforzo che ha utilizzato un'ampia gamma di approcci microbiologici, chimici, biochimici, genetici, genomici e metagenomici, consentendo di accrescere le conoscenze di questa classe clinicamente importante di antibiotici e, più in generale, contribuendo alla comprensione della biochimica dei prodotti naturali e del metabolismo secondario negli attinomiceti (Marcone et al., 2018).

La struttura complessa di questi glicopeptidi e il fatto che in alcuni casi, ad esempio la teicoplanina, i principi attivi clinicamente approvati dalla FDA siano in realtà miscele costituite da molecole che differiscono strutturalmente di poco l'una dall'altra, e che sono combinate in percentuali definite nel principio attivo, fa sì che l'unica fonte possibile per l'ottenimento degli antibiotici glicopeptidici naturali e dei loro derivati semi sintetici rimanga la fermentazione degli attinomiceti del suolo (Taurino et al., 2011).

3. VITAMINA K2

Un altro esempio di prodotto ottenuto grazie ai bioprocessi, sfruttando le proprietà naturali dei microrganismi, è la vitamina K2, in particolare il suo isomero MK-7.

La vitamina K2 fa parte della famiglia della vitamina K, un gruppo di composti liposolubili con attività emostatica, antiossidante e anti-osteoporosi. Fu scoperta per correlazione a un disturbo della coagulazione del sangue osservato nell'ambito di uno studio sugli effetti di una dieta povera di colesterolo in polli, in cui si scoprì che il fenomeno emorragico non era causato dalla privazione di colesterolo ma dalla carenza di un fattore antiemorragico contenuto nella frazione lipidica della dieta, una "Vitamina Koagulante", poi denominata vitamina K.

Le vitamine appartenenti alla famiglia K hanno una struttura chimica comune, un anello naftochinonico legato a una catena laterale alifatica, e differiscono per composizione e lunghezza delle catene laterali, che sono responsabili

del diverso assorbimento, trasporto, distribuzione tissutale e biodisponibilità delle forme di vitamina K.

La vitamina K1, fillochinone, è di origine vegetale, interviene nei processi di coagulazione del sangue, agisce sul fegato. La vitamina K2, menachinone, è di origine batterica e agisce, oltre che a livello epatico, soprattutto a livello di apparato osseo e sistema vascolare. In base alla lunghezza della catena laterale, formata da unità isopreniche ripetute, si possono differenziare diversi menachinoni (MK-n). La vitamina K3, menadione, è invece di origine sintetica ed è componente di farmaci che agiscono per regolare i processi di coagulazione del sangue.

La vitamina K2 è essenziale per la funzione di numerose proteine che legano il calcio, in particolare l'osteocalcina e la proteina GLA della matrice, entrambe coinvolte nel mantenimento della struttura del sistema osteoarticolare, dei denti, della parete arteriosa e per la regolazione della crescita cellulare. L'aumento dell'assunzione di vitamina K2 si traduce così in ossa più sane e un sistema cardiovascolare più sano.

Gli effetti positivi della vitamina K2 sul sistema cardiovascolare sono descritti in molti studi clinici, tra cui il Rotterdam Study, un ampio studio svolto per un periodo di 10 anni, con il coinvolgimento di circa 5.000 uomini e donne di età superiore ai 55 anni, pubblicato nel 2004. Fu esaminata l'associazione tra l'assunzione con la dieta di fillochinone e di menachinone e l'incidenza di malattie cardiovascolari. I risultati dimostrarono che l'assunzione di menachinoni era direttamente correlata a una riduzione di eventi di calcificazione dell'aorta, di malattie coronariche e in generale di mortalità. L'apporto dietetico di menachinoni nella popolazione studiata derivava principalmente da formaggi, che sono ricchi in vitamina K2, in particolare MK-7, MK-8 e MK-9. Si arrivò così a concludere che fossero i menachinoni contenuti nella dieta i principali responsabili dei benefici sul sistema cardiovascolare osservati in pazienti che facevano largo uso di formaggi, rispetto a pazienti che seguivano regimi alimentari con maggior consumo di verdure, particolarmente ricche di vitamina K1 (Hofman et al., 2007). Studi successivi hanno confermato che la vitamina K2, e soprattutto i suoi isomeri chiave MK-4 e MK-7, sono essenziali per il mantenimento della salute delle ossa e nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e che MK-7 è particolarmente efficace grazie ad una maggiore biodisponibilità e ad un'emivita più lunga rispetto agli altri isomeri.

Soprattutto con i regimi alimentari moderni, il consumo giornaliero di alimenti ricchi di vitamina K2 spesso non è sufficiente a coprire il fabbisogno dell'organismo e diventa quindi utile integrarlo con un apporto esterno di vitamina K2 naturale, in particolare MK-7. Per questi motivi il consumo e quindi il mercato della vitamina K2 sono cresciuti moltissimo negli ultimi anni.

La fonte naturale principale di vitamina K2-MK7, prodotta anche da alcuni batteri intestinali, è il natto, alimento tradizionale giapponese prodotto attraverso la fermentazione di fagioli di soia. La presenza di natto nel regime alimentare in Giappone risale a molti secoli fa, all'epoca dei samurai la cui dieta includeva il natto perché ritenevano che aumentasse la loro forza e capacità di reazione nei combattimenti.

Agli inizi del '900 il microrganismo responsabile della fermentazione della soia fu identificato, si trattava di un particolare *Bacillus subtilis*, che fu denominato *Bacillus subtilis natto* (Sanders et al., 2003).

Sfruttando le proprietà naturali di questo microrganismo è così stato possibile sviluppare una piattaforma di produzione di vitamina K2, basata sulla fermentazione di *B. subtilis natto* come produttore naturale di MK-7 (EP 1803820, US 7,718,407 and JP 5043425).

4. CONCLUSIONI

Grazie ai microrganismi e alle biotecnologie è quindi possibile mettere sul mercato prodotti naturali, innovativi, che consentono di sostituire prodotti di provenienza animale o sintetizzati chimicamente. È inoltre attiva e sempre più presente la ricerca di tecnologie nuove che consentano di ridurre il consumo di materie prime e di acqua e la produzione di rifiuti, per avere processi a minore impatto ambientale.

RIASSUNTO

Un importante settore d'impiego dei microrganismi è rappresentato dai bioprocessi industriali che utilizzano le biotecnologie per creare prodotti che migliorano la qualità della vita delle persone. Grazie alle biotecnologie si possono ottenere prodotti a livello industriale impiegando i microrganismi, controllando e modificando le loro attività biologiche naturali. L'uso biotecnologico dei microrganismi ha radici antiche, con le biotecnologie convenzionali che nascono utilizzando i microrganismi per la trasformazione spontanea di materie prime alimentari e si evolvono poi grazie ai numerosi campi di applicazione, tra i quali quello farmaceutico.

A partire dalla metà del '900 sono stati sviluppati bio-processi per produzione industriale di penicillina e altri antibiotici e successivamente di piccoli volumi di molecole ad alto valore aggiunto impiegate per prevenzione o cura di diverse patologie. L'ulteriore evoluzione ha portato allo sviluppo delle biotecnologie innovative, bio-processi interessati da modificazioni genetiche grazie alle quali i microrganismi diventano capaci di produrre molecole normalmente prodotte da altre cellule animali, dei quali l'insulina è il capostipite. Esistono oggi sul mercato molti prodotti ottenuti per biosintesi o biotrasforma-

zioni applicando la tecnologia delle fermentazioni industriali: antibiotici, antitumorali, immunoregolatori, nutraceutici, vitamine, ne è un esempio la vitamina K2. L'uso dei bio-processi garantisce anche un continuo miglioramento della qualità dei prodotti e una maggiore attenzione all'ambiente.

ABSTRACT

The microorganisms in the industrial bioprocesses. A relevant sector of the use of microorganisms is represented by the industrial bioprocesses that exploit biotechnologies to create products that improve the quality of life of people. Thanks to biotechnologies it is possible to obtain products at an industrial level using microorganisms, controlling and modifying their natural biological activities. The biotechnological use of microorganisms has ancient roots, with conventional biotechnologies that arise by exploiting microorganisms for the spontaneous transformation of food raw materials and then evolve thanks to the encounter with numerous fields of application, including the pharmaceutical one. Starting from the mid-1900s, bioprocesses developed for the industrial production of penicillin and other antibiotics and subsequently for small volumes of high value-added molecules used for the prevention or treatment of various diseases. Further evolution has led to the development of innovative biotechnologies, bioprocesses affected by genetic modifications thanks to which microorganisms become capable of producing molecules normally produced by other animal cells, of which insulin is the progenitor. Today there are many products on the market obtained by biosynthesis or biotransformations by applying industrial fermentation technology: antibiotics, anticancer, immunoregulators, nutraceuticals, vitamins, vitamin K2 is an example. The use of bioprocesses also guarantees a continuous improvement in product quality and greater attention to the environment.

BIBLIOGRAFIA

- CADEDU A. (1991): *Dal mito alla storia*, Franco Angeli, Milano, pp. 137-138.
- HOFMAN A., BRETELIER M. M., VAN DUIJN C. M., KRESTIN G. P., POLS H. A., STRICKER B. H., TIEMEIER H., UITTERLINDEN A. G., VINGERLING J. R., WITTEMAN J. C. (2007): *The Rotterdam Study: objectives and design update*, «European journal of epidemiology», 22 (11), pp. 819-829.
- MANZONI M. (2005): *Microbiologia Industriale*, in *Enciclopedia della Scienza e della tecnica*, Istituto Treccani.
- MEYER H.P., MINAS W., SCHMIDHALTER D. (2017): *Industrial-Scale Fermentation*, in *Industrial Biotechnology: Products and Processes*, Edited by Christoph Wittmann and James C. Liao, pp. 3-53.
- FEDORENKO V., GENILLOU O., HORBAL L., MARCONE G.L., MARINELLI F., PAITAN Y., RON E.Z. (2015): *Antibacterial discovery and development: from gene to product and back*, «BioMed Research International», 591349.
- KIESER T., BIBB M.J., BUTTNER M.J., CHATER K.F., HOPWOOD D.A. (2000): *Practical*

- Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, Norwich.
- MARCONI G.L., BINDA E., BERINI F., MARINELLI F. (2018): *Old and new glycopeptide antibiotics: From product to gene and back in the post-genomic era*, «Biotechnology Advances», 36, pp. 534-554.
- TAURINO C., FRATTINI L., MARCONI G.L., GASTALDO L., MARINELLI F. (2011): *Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin*, «Microb. Cell Factories», 10 (1), pp. 82-94.
- SANDERS M.E., MORELLI L., TOMPKINS T.A. (2003): *Sporeformers as Human Probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus*, «Compr Rev Food Sci Food Saf», 2 (3), pp. 101-110.