

principi di BIOTECNOLOGIE e BIOREATTORI

versione#B2 - Prof. A.Tonini – www.andytonini.com

INDICE: 1°PARTE: [COMPONENTI](#) – [PROCESSI](#) – [APPENDICI](#) – [ENZIMI](#) – [BIOREATTORI](#) –

2°PARTE: [PRINCIPI BIOREATTORI](#) – [ESERCIZI](#) – [STORIA BIOTECNO](#) –

1°PARTE – BIOTECNOLOGIE:

DEFINIZIONE: insieme di tecniche che permettono di produrre **beni** (sostanze, microrganismi, ...) e **servizi** (depurazione, analisi,...) mediante l'impiego di organismi viventi, loro enzimi e loro costituenti. In alcune applicazioni vengono utilizzati, anziché i microrganismi, gli enzimi da essi estratti, in modo da catalizzare la reazione biologica desiderata senza la necessità di mantenere le condizioni ottimali per le funzioni vitali dei microrganismi viventi stessi.

1 – CLASSIFICAZIONE e PRODOTTI:

► **BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI** (tradizionali) - **produzione di:**

■ BIOMASSA:

produzione di microrganismi usati tal quali, in processi fermentativi diretti (pane vino birra formaggi yogurt..), per fornire proteine per l'alimentazione del bestiame, per produrre ceppi selezionati geneticamente stabili (privi di altre specie, conservabili, riproducibili), e produrre enzimi.

■ **METABOLITI:** produzione di sostanze da parte dei microrganismi:

- metaboliti **primari**, composti essenziali alla vita dei microrganismi, prodotti durante il normale processo di crescita, (es.: amminoacidi, nucleotidi, acidi organici, vitamine, proteine alcoli).

- metaboliti **secondari**, composti non essenziali alla vita microbica, prodotti nella fase stazionaria quando la crescita microbica è terminata (antitumorali, antibiotici, enzimi, insetticidi, ac.citrico, fitormoni, fattori di crescita).

■ DEPURAZIONE BIOLOGICA e BIOSENSORI:

-**processi depurativi** utilizzati per le acque di scarico che contengono sostanze organiche biodegradabili. I microrganismi impiegati sono un insieme eterogeneo di molte specie (batteri, funghi, protozoi mono e pluricellulari); processi di tipo aerobico e anaerobico. Es.: produzione di fanghi di depurazione e biogas.[vedi depurazione acque parte 4].

-**biosensori:** particolari trasduttori costituiti da un elemento sensibile biologicamente attivo (enzimi, cellule, anticorpi ecc.) e da una parte elettronica; principio di funzionamento: l'elemento biologico interagisce con il substrato da analizzare e un sistema di trasduzione (sensore) converte la risposta biochimica in un segnale elettrico.[Es.: glucometro per diabetici per analizzare la concentraz. zucchero nel sangue, secondo la quantità di glucosio trasformata in acido gluconico tramite un enzima].

► **BIOTECNOLOGIE AVANZATE:**

grazie alle tecniche dell'ingegneria genetica è oggi possibile, utilizzando particolari enzimi detti di restrizione, tagliare il DNA di una cellula in punti particolari per inserirvi nuovi geni che consentano alla cellula stessa di svolgere determinate funzioni (tecnica del DNA ricombinante). Applicazioni: produzione di speciali microrganismi per la **bioindustria**; piante e animali transgenici più resistenti alle malattie, all'ambiente e più produttivi o in grado di produrre, nel caso degli animali transgenici, sostanze utili all'uomo (insulina **vaccini** interferone steroidi proteine, enzimi, ecc.).

■ **USI:** industria alimentare, farmaceutica, cosmetica, tinture e stampa, depurazione; le principali biotecnologie impiegano reazioni catalizzate da microrganismi, reazioni che utilizzano enzimi immobilizzati e fermentazioni, e il settore dell'ingegneria genetica.

■ CARATTERISTICHE GENERALI di processi BIO-INDUSTRIALI:

- **competitività** coi processi dell'ind. Chimica: reazioni altamente specifiche e prodotti a elevata purezza, buona concentrazione; reazioni effettuate a bassa T e p, bassa richiesta di energia, basse emissioni;
- **materie prime** provenienti da altre lavorazioni, materie prime e finali con minimo impatto ambientale, scarti riciclabili, pochi coprodotti,
- **criticità:** necessità di accurati controlli (pH, T, p, quantità O₂,...) e ambienti sterili;

[INIZIO]

■ SCHEMA GENERALE E FASI DEL PROCESSO:

COLTURA di lab. → INOCULO → **FERMENTATORI** → **SEPARAZIONE** → PURIFICAZIONE → **METABOLITA**
MATERIE PRIME → LAVORAZ. → STERILIZZAZ. → **BIOMASSA** → SMALTIMENTO/UTILIZZAZ.

2 - COMPONENTI DEL PROCESSO BIOTECNOLOGICO: [vedi anche [appendice](#)].

processo: MICRORGANISMI + SUBSTRATO → [condiz. opportune] → PRODOTTI + NUOVE CELLULE

► **MICRORGANISMI** → **INOCULO** - [**enzimi**]:

| | | | | |
|-----------|--|--|---|---|
| MICROORG. | 0,3 μ → batteri → 3 μ procarioti unicellulari eterotr.autotr. aerobici anaerob. facoltativi | protozoi 1 μ eucar. unicell. | 3 μ → lieviti → 10 μ eucarioti unicellulari aerob. anaerob.facolt. | 10 μ → muffe → 150 μ eucarioti eterotrofi pluricellulari aerob.obbligate |
| PRODOTTI: | amminoacidi (lisina treonina..) insulina ac.acetico glutammico yogurt SCP ... | etanolo proteine lattasi ... | etanolo proteine lattasi ... | penicillina ac.citrico cefalosporine formaggi... |

CARATTERISTICHE: microrganismi del tipo aerobici, anaerobici obbligati (per i quali l'ossigeno ha funzione tossica) o facoltativi (si possono adattare sia a presenza che a assenza di ossigeno). Azioni metaboliche nella cellula: catabolismo aerobico/anaerobico (→molecole semplici ATP En.) e anabolismo (→biosintesi: ADP cellule molecole complesse).



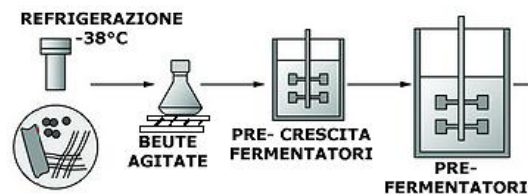
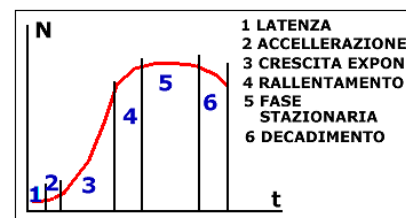
FASI DI PRODUZIONE DELL'INOCULO:

1- fase di **laboratorio**: si parte da **ceppi selezionati**, conservati liofilizzati; germinazione sporificazione dei ceppi selezionati;

2- fase **vegetazione**: preparazione dell'inoculo, in beute agitate, a stadi, a volume crescente: → **inoculo**: sospensione densa, 1-10% vol. reattore; passaggio poi a fermentatori a volume crescente per la produzione di quantità opportuna di **biomassa**.

[vedi biochimica: cinetica di accrescimento in reattore batch - variazione N°individui nel tempo; eq.Monod – vedi anche appendice].

Alcuni processi funzionano con utilizzo di **ENZIMI** (sostanze proteiche), catalizzatori biologici attivi anche in condizioni più drastiche rispetto ai microrganismi viventi ["immobilizzati" per particolari processi produttivi continui elevata potenzialità- **vedi appendice** e biochimica].



► **TERRENO DI COLTURA-SUBSTRATO-MATERIE PRIME:**

brodo o substrato: →nutrimento, dipendente dal tipo di microrganismo; spesso fatto con materiali di scarto di origine vegetale: granturco, grano, orzo, bietole, foglie, farine, semi, crusca, melasse, residui agrumari: materiale di partenza che deve essere opportunamente preparato per essere utilizzato come substrato dai microrganismi.

Tipo naturale (uso ind.le), semisintetico sintetico (composti chimici puri, uso lab.), complesso;

materie prime: glucosio, saccarosio e amidi, farine melassi oli vegetali corn step liquor (acque macerazione di mais) caseina, materiali di scarto ind.agroalimentare e sottoprodotti, biomassa, vitamine, acqua deionizzata,...

additivi: precursori, detergenti, antischiuma...

→**MACROELEMENTI: C//N//P**: [la dieta dei microrganismi]

fonte di **C**: carboidrati alcoli ac.carbossilici grassi idrocarburi;

fonte di **N**: urea amminoacidi nitriti nitrati ammoniaca...;

fonte di **P**: sali ausiliari (fosfati)...

→**MICROELEMENTI: K//Ca//Mg//...**: sali utili alla crescita dei microrganismi.



Tutti i substrati, una volta preparati, sono sottoposti a **sterilizzazione** per eliminare tutti i microrganismi eventualmente presenti, che potrebbero entrare in **competizione** con quelli principali; vengono inviati nel reattore attraverso tubazioni, se sono liquidi, o immessi direttamente dalla bocca di carico, se sono solidi; i componenti solubili vengono sciolti preventivamente in acqua.

► **ARIA**,

fornisce ossigeno; per processi aerobici; e per anaerobici solo per sintesi ac.grassi insaturi e crescita membrana cellulare.

► **TEMPERATURA E PRESSIONE:**

condizioni molto blande, compatibili con la sopravvivenza delle cellule e/o evitare la denaturazione degli enzimi; i sistemi biologici sono molto sensibili alle variazioni di pH e di temperatura, da qui la necessità di impiegare adeguati strumenti di controllo.

► **STERILIZZAZIONE:**

I processi biotecnologici necessitano di condizioni di assoluta **sterilità** (99%) per evitare che microrganismi estranei al processo possano entrare in **competizione** con quelli principali o, eventualmente, con l'attività degli stessi enzimi, compromettendo il buon esito del processo produttivo; sterilità non in senso assoluto, ma in senso statistico, ovvero si vuole non tanto l'assoluta assenza di organismi estranei, ma che questi siano ridotti a concentrazioni tali da non svilupparsi e costituire un problema per il ciclo lavorativo (minori costi).

Questa operazione può essere effettuata direttamente nel reattore solo nei processi discontinui.

Azione di sterilizzazione: in uno qualunque degli stadi che precedono la fermentazione; nello stadio di preparazione dell'inoculo; nello stadio di preparazione del substrato; durante l'immissione dell'aria; nella preparazione delle apparecchiature.

METODI:

1 - Sterilizzazione per filtrazione:

usata per la sterilizzazione dell'**aria** (trascinamento di muffe o batteri), nel caso in cui la sterilizzazione termica non può essere economica se non per portate molto ridotte. La filtrazione consente di eliminare anche tracce di particolato, umidità, metalli pesanti, ecc.

Filtrazione: l'aria passa prima attraverso un **prefiltro** a porosità 0,45 µm, che elimina tutte le particelle che potrebbero intasare rapidamente la successiva sterilizzazione, poi attraverso un **ultrafiltro**, con uno strato filtrante p.es. di membrane filtranti in fluorocarburi con una dimensione media dei pori di 0,2 – 0,3 µm. Sul materiale filtrante si accumulano le particelle ed i microrganismi, quindi esso deve essere a sua volta sottoposto periodicamente a sterilizzazione con vapore o rimosso interamente.

2- Sterilizzazione termica:

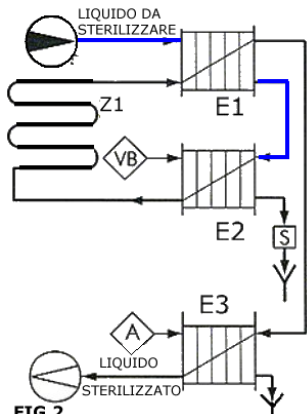
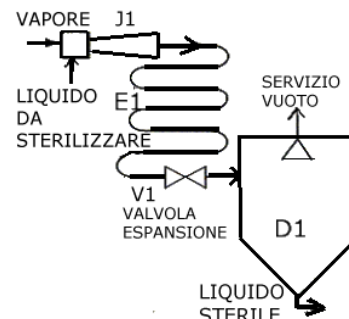
2.1- sterilizzazione delle apparecchiature prima del ciclo di lavorazione:

-diretta: per iniezione, nel reattore e in tutte le attrezzature impiegate, di vapore a 135°C per 3-5 minuti,

-indiretta: con vapore in scambiatori di calore e camicie termiche a 20°C per 20 minuti.

2.2- sterilizzazione del **brodo di fermentazione**- si possono utilizzare due tecniche:

a) sterilizzazione tramite **iniezione diretta** di vapore; il liquido da sterilizzare viene aspirato tramite un eiettore **J1** e mescolato allo stesso vapore di riscaldamento; quindi sulla miscela liquido/vapore che passa in un serpentino **E1** si ha azione sterilizzante per il tempo sufficiente a ridurre la carica microbica; poi si riduce la pressione tramite una valvola di espansione **V1** (con contemporanea parziale vaporizzazione) che raffredda il brodo prima di utilizzo nel fermentatore.



b) sterilizzazione per **riscaldamento indiretto** (fig.2) con scambiatori di calore: il liquido entra nel primo scambiatore E1, dove viene preriscaldato a spese del liquido uscente dal secondo scambiatore; quindi entra nel secondo scambiatore E2 dove viene portato alla temperatura di sterilizzazione grazie ad una corrente di vapore. Dopo un tempo di permanenza a tale temperatura (Z1) viene inviato al preriscaldatore E1 e, infine, refrigerato in E3 fino alla temperatura di immissione nel fermentatore. Con questa tecnica è possibile recuperare parte del calore e ridurre la portata di vapore necessaria.

[INIZIO]

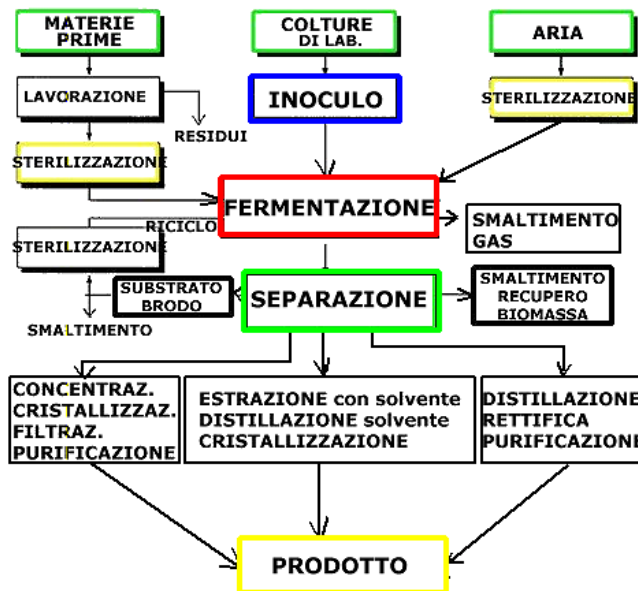
3 -PROCESSI BIOTECNOLOGICI:

PROC. CONTINUO - DISCONTINUO - vedi diagramma a blocchi →

► produzione **a lotti – discontinuo**: per produzioni su piccola e media scala, come è il caso di molti prodotti farmaceutici e di qualunque produzione in cui si realizzano piccole quantità di prodotto di elevato valore commerciale. I reattori utilizzati nella produzione discontinua (reattori batch) vengono sterilizzati prima dell'avviamento del processo, che può avere una durata variabile da uno-due giorni ad una settimana. In questo modo è necessario ripetere frequentemente l'operazione di pulizia e sterilizzazione del reattore, ma così facendo sono assicurate, d'altra parte, le condizioni di asetticità del processo per tutto il ciclo di lavorazione.

► processo **continuo**: il ciclo di lavorazione può durare parecchi giorni, ma può essere più difficile mantenere le condizioni di asetticità e la stabilità delle colture ed è necessario assicurare la sterilità dei materiali introdotti.

Molto interessante risulta la produzione di gas combustibile a partire da biomasse di scarico (*biogas*, un gas ricco di metano): la natura dei materiali di partenza (fanghi di supero degli impianti di depurazione delle acque civili) consente di conseguire un risparmio energetico notevole, inoltre il biogas può essere utilizzato per la produzione di altri interessanti prodotti chimici di base.



3.1 STADI DEL PROCESSO:

■ **stadi che precedono** la fermentazione: preparazione del substrato, dell'inoculo e, per i processi aerobici, dell'aria;(vedi in precedenza i componenti del processo).

■ **stadi di fermentazione (reattori in scala)**;

■ **stadi che seguono** la fermentazione: stadi di separazione dei prodotti di reazione dal mezzo liquido e dalle cellule, nel caso in cui non venga utilizzata alcuna tecnica di immobilizzazione.

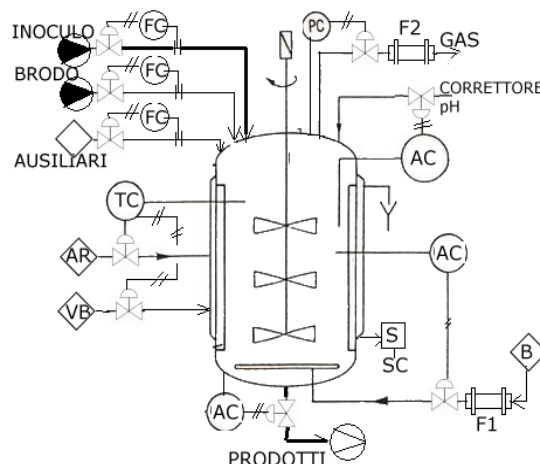
Oltre ai tre stadi sopra indicati ci sono gli impianti di supporto necessari, quali i magazzini, i laboratori di analisi, il depuratore, il generatore di vapore, ecc. Prima della realizzazione di un processo biotecnologico industriale è sempre necessario uno studio completo del processo stesso.

3.2 - FERMENTAZIONE- REATTORI: [VEDI ANCHE APPENDICE]

I reattori utilizzati nei processi biotecnologici sono chiamati bioreattori o **fermentatori**. Sono costruiti in acciaio al carbonio con un rivestimento interno resistente alla corrosione e, in particolare, nelle produzioni farmaceutiche sono fabbricati in acciaio inossidabile. Per evitare effetti tossici sui microrganismi, non è possibile utilizzare materiali come rame e le sue leghe per la costruzione dei fermentatori.

Nei processi di tipo **discontinuo** (in modo, tra l'altro, da consentire il mantenimento delle condizioni di sterilità per tutta la durata del processo), il fermentatore più utilizzato è il reattore **BATCH**.

Nei processi **continui** tra gli altri è molto usato il reattore **CSTR** (vedi appendice); possono sostenere elevate concentrazioni dei microrganismi e, di conseguenza, grandi capacità produttive; es.: imp.depurazione – digestore - ...



FUNZIONI E DISPOSITIVI:

- miscelazione del sistema (con agitatore e deflettori interni; per processi aerobici anche agitati dall'aria immessa);
- controllo T: smaltimento del calore prodotto con camicia di raffreddamento a circolazione di acqua sino ad un'altezza superiore al livello del substrato; sistema di controllo automatico che agisce sulla portata dell'acqua di raffreddamento.
- distribuzione e diffusione dell'ossigeno (per i processi aerobici);
- reagenti additivi (antischiuma) e nutrienti aggiunti durante il processo;
- controllo del pH: i microrganismi sono molto sensibili alle variazioni di pH (che si verificano durante la reazione); per portare il pH ai valori desiderati, si aggiunge nel fermentatore una soluzione di bicarbonato di sodio o una corrente di CO₂, entrambe accuratamente sterilizzate;
- monitoraggio concentrazioni di reagenti, prodotti, microrganismi.
- pressione di lavorazione leggermente superiore a quella atmosferica per mantenere condizioni di sterilità, e evitare la contaminazione da parte dell'aria esterna.

- **reattori BATCH STR – DISCONTINUI** – [Stirred Tank R.]

sono fermentatori in cui viene realizzata tra tutti i componenti del processo fermentativo una ottimale miscelazione; sono costituiti da un recipiente che può avere capacità che vanno da 1 m³ sino a centinaia di m³.

CICLO PRODUTTIVO:

- operazioni di pulizia e di sterilizzazione del reattore: introduzione attraverso apposite aperture di detergenti e vapore (che viene fatto passare anche attraverso le camicie di raffreddamento).

- carica di substrato e inoculo;

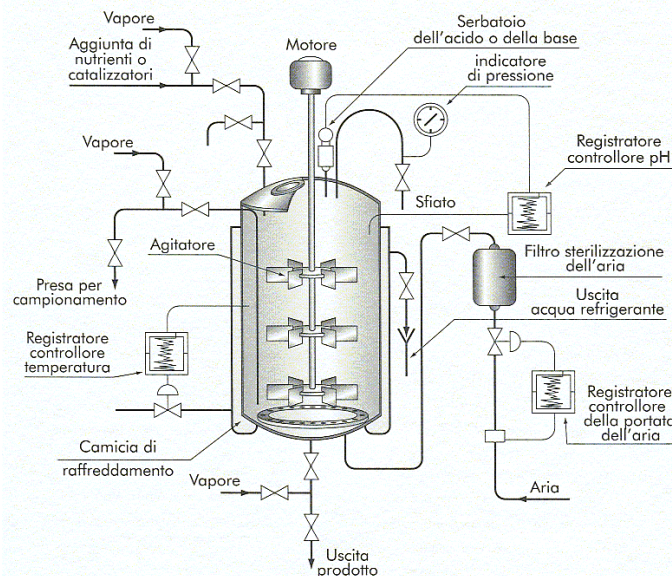
- inizio della reazione e avanzamento con diminuzione della concentrazione di substrato e aumento della concentrazione di cellule e di prodotti.

- il reattore lavora nelle condizioni di reazione, coi controlli di processo previsti. (v. preced.).

- scarico e processi di separazione brodo-biomassa.

RESA di fermentazione = g prodotto secco/dm³ coltura %

RESA di conversione = g prod.secco/g substrato puro %

**3.3 - SEPARAZIONE E PURIFICAZIONE.**

SEP.1 - Se il prodotto da separare è un metabolita esterno ai microrganismi che lo hanno prodotto, si opera con:

- **CENTRIFUGAZIONE o FILTRAZIONE**; uso di centrifughe decanter, filtropresse, filtri Oliver; per separare il liquido contenente il metabolita dalle cellule viventi (biomassa, usata per l'alimentazione animale) e residui solidi della fermentazione;

- **ESTRAZIONE o PRECIPITAZIONE o ADSORBIMENTO**: il metabolita viene isolato dal liquido che lo contiene con metodi che dipendono dalle sue dimensioni e dalle sue proprietà chimico-fisiche;

SEP.2 - Se il prodotto da separare è un metabolita interno alla cellula che lo ha prodotto è necessario prevedere uno stadio di distruzione delle cellule, in cui possono essere utilizzate anche tecniche chimiche o chimico-fisiche meccaniche (triturazione a bassa T, modificazione del pH, trattamento con solventi particolari, shock termici, uso di ultrasuoni, impiego di enzimi, frantumazione per centrifugazione), al quale deve seguirne uno di rimozione dei detriti; i prodotti così separati passano alle successive operazioni di recupero e purificazione (essiccamento, concentrazione, cristallizzazione, distillazione, ecc.).

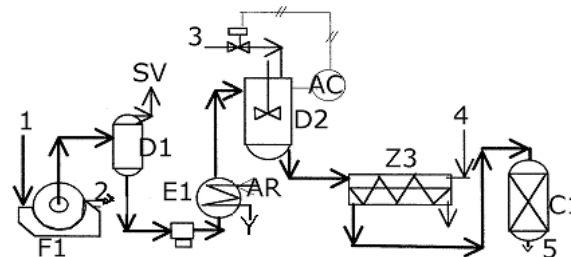
SEP.3 - Se il prodotto è biomassa cellulare, si separano dal brodo liquido le cellule, quindi si fanno operazioni di compressione e essiccamento (→lieviti da pane, da mangimi,...)

P.1 - PURIFICAZIONE: per la purificazione possono essere utilizzate varie tecniche per rimuovere le impurezze ed aumentare ulteriormente la concentrazione del prodotto- es.: adsorbimento, operaz.cromatografiche, precipitazione frazionata, distillazione.

Con l'ultimo stadio, l'isolamento finale, il prodotto è ottenuto nella forma commerciale, con operazioni quali essiccamento, cristallizzazione, liofilizzazione e la rimozione di eventuali solventi.

SCHEMA DI PROCESSO SEPARAZIONE ESTRAZIONE

PURIFICAZIONE [ind.biopenicillina - fig. a lato]

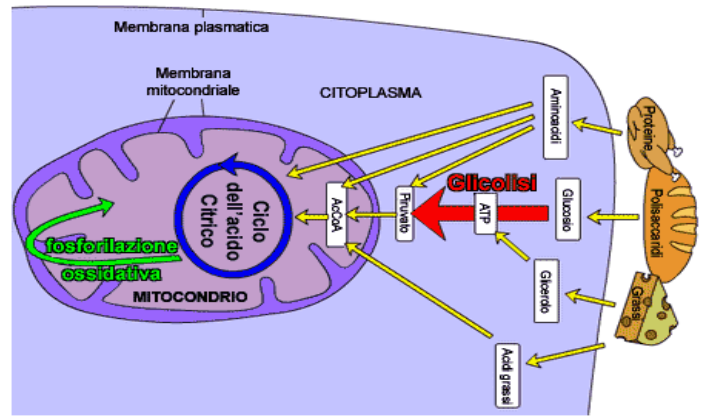
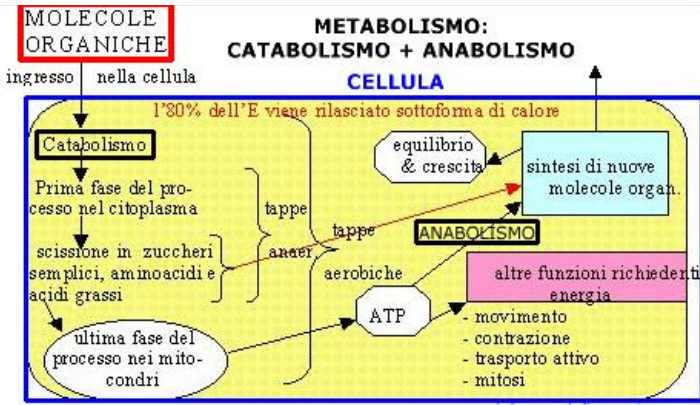
**ESEMPI di processi di SEPARAZIONE-PURIFICAZIONE:**

IND.BIOETANOLO: dal brodo fermentativo viene separata per centrifugazione/filtrazione la biomassa (smaltimento) e la soluzione zuccherina-alcolica, che viene sottoposta a distillazione in colonne a piatti per incrementarne la concentrazione in etanolo.

IND.BIOPENICILLINA: per filtrazione si separa la biomassa (smaltimento) dal brodo di coltura, contenente il prodotto; segue raffreddamento a T=4°C per evitare degradazioni enzimatiche, quindi acidificazione a pH4 (ac.solforico) per migliore estrazione con solventi; segue estrazione liquido/liquido continua controcorrente [immiscibilità totale] con solvente acetato di amile; quindi filtrazione su carbone attivo (eliminare impurezze), poi precipitazione della penicillina sale sodico con acetato di sodio, cristallizzazione lavaggio essiccamento.

APPENDICI:

A1- METABOLISMO CELLULARE:



A2- Altre definizioni di biochimica:

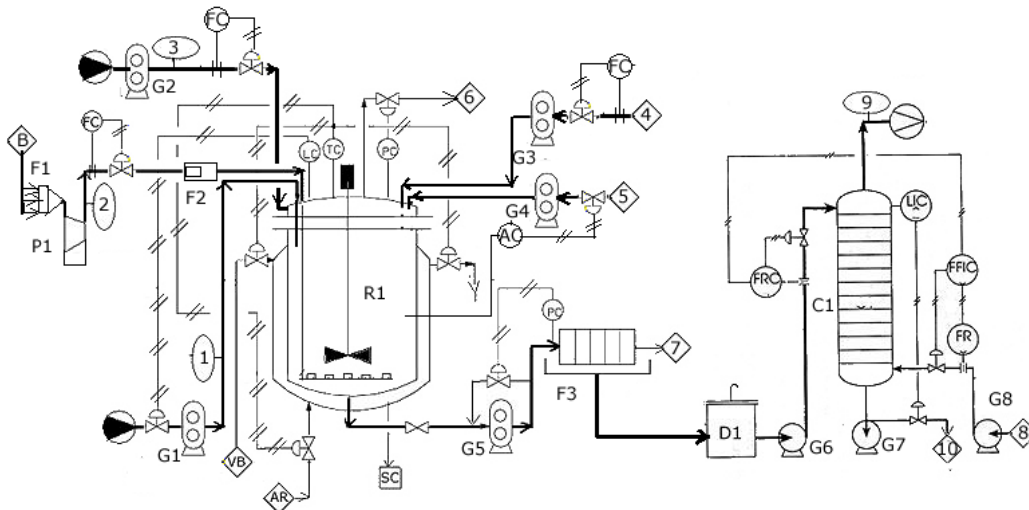
MICROORGAN. **AUTOTROFI**: organismi che si nutrono di sostanze inorganiche semplici (H₂O, CO₂, ioni inorganici). Partendo da sostanze inorganiche sintetizzano ogni tipo di molecola organica (glucidi, lipidi, proteine). Utilizzano fonti di energia luminosa o chimica. Organizzazione del carbonio. → Piante verdi; Alghe; *Batteri autotrofi,...

MICROORGAN. **ETEROTROFI**: organismi che si nutrono di sostanze organiche complesse (glucidi, lipidi, proteine). Dipendono strettamente dagli autotrofi per nutrirsi. → Animali, Funghi, Batteri,...

METABOLITI **PRIMARI**: sono essenziali alla vita (carboidrati, lipidi, proteine, ac. nucleici, ...)

METABOLITI **SECONDARI**: non sono essenziali alla vita, sono deputati a meccanismi biochimici propri della cellula o dell'organismo, legati a processi secondari e/o "di relazione" (es. antiossidanti, difesa....)

A3 - SCHEMA DI PROCESSO GENERICO DI BIOFERMENTAZIONE:



SCHEMA DI PROCESSO DI BIOFERMENTAZIONE AEROBICA E RECUPERO METABOLITA CON ESTRAZIONE LIQ-LIQ IMMISCIBILI

- LEGENDA:
- 1 BRODO DI COLTURA
 - 2 ARIA
 - 3 INOCULO
 - 4 AUSILIARI DI FERMENTAZIONE
 - 5 REAGENTI ACIDO/BASICO
 - 6 SCARICO GAS
 - 7 BIOMASSA
 - 8 SOLVENTE ESTRATTIVO
 - 9 ESTRATTO (SOLVENTE+METABOLITA)
 - 10 RAFFINATO (BRODO ESAUSTO)
 - G1-4 POMPE DOSATRICI
 - G5 POMPA ROTATIVA
 - G6-8 POMPE CENTRIFUGHE
 - R1 REATTORE DI FERMENTAZIONE
 - P1 COMPRESSORE ARIA
 - F1 FILTRO
 - F2 ULTRAFILTRO STERILIZZANTE
 - F3 FILTROPRESSA
 - D1 SERBATOIO POLMONE
 - C1 COLONNA DI ESTRAZIONE CONTINUA A PIATTI

Prof.A.Tonini

N.B.: La sterilizzazione si compie **diretta** per l'apparecchiatura (Vap.) e **indiretta** (per il brodo) attraverso la camicia; durante il funzionamento agiscono i controlli TC (acqua raffreddamento) PC (gas uscenti) PC (alimentazione filtropressa) AC [pH acido/base] FC (portate entranti) FFC (brodo/solvente in rapporto, nell'estrazione)

[INIZIO]

A4 - ENZIMI E TECNICHE DI IMMOBILIZZAZIONE

■ CARATTERISTICHE:

ENZIMI: sostanze proteiche, catalizzatori biologici (accelerano velocità reaz.bio) molto specifici, attivi anche in condizioni più drastiche rispetto ai microrganismi viventi; possono essere impiegati in reattori industriali.

USI: ind.alimentare – bevande – detergenti – nell'ind.tessile cartaria - ...

possono essere presenti in soluzione o fissati su substrato; nel primo caso l'E. si ritroverà nel prodotto o, se necessario, il prodotto deve essere purificato, nel secondo si potrà riutilizzare l'E. in un secondo ciclo di produzione dopo aver estratto il prodotto e/o si potranno programmare diversi stadi di lavorazione con enzimi differenti sequenziali.

■ TECNICHE DI ESTRAZIONE degli ENZIMI:

PROCESSO:

PRODUZIONE CELLULE – DISTRUZIONE CELLULE [con sistemi meccanici, chimici, bio] – SEPARAZIONE S/L [filtraz., centrifugaz.] – RIMOZIONE AC.NUCLEICI [bioprecipitazione] – PURIFICAZIONE [precipitaz, cromatografia] → ENZIMA

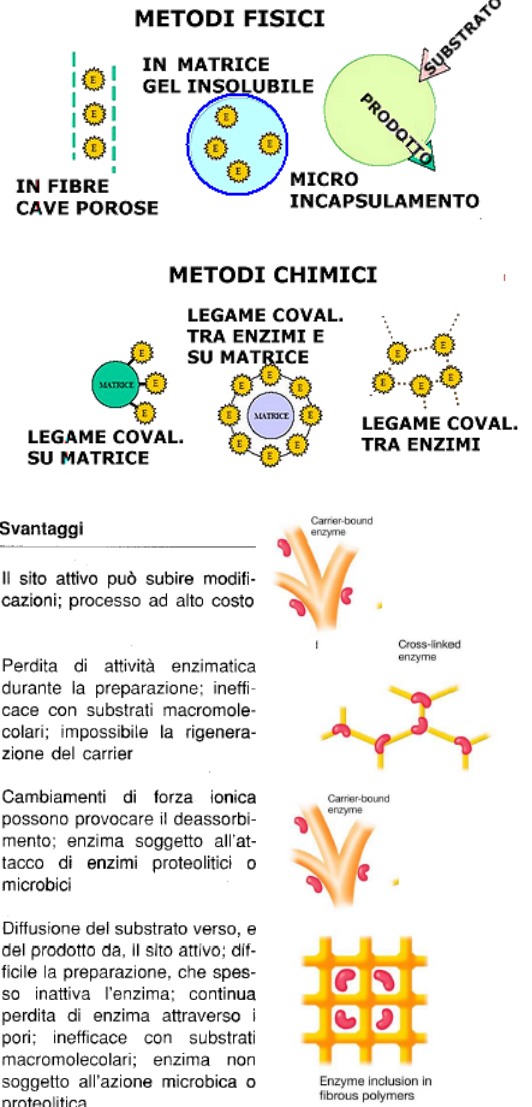


TECNICHE DI IMPIEGO degli ENZIMI:

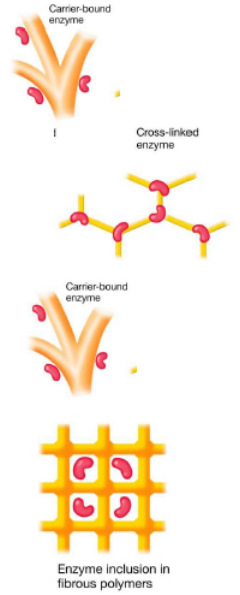
- ▶ **PRESENTI LIBERI** nel brodo di fermentazione;
 - ▶ **CON SISTEMI DI IMMOBILIZZAZIONE:** [R.catalitico eterogeneo] [scelta in base a costo operazione, efficienza, possibilità rigenerazione]:
 - **USO SUPPORTI SOLIDI INSOLUBILI:** MATRICE cellulosa –poliacrilammide- ceramica, vetro, carbone, sabbia,...
- E. legato con legami covalenti, ionici, o adsorbito; non sono sistemi molto stabili ma di facile attuazione; l'E in eccesso viene lavato via prima dell'impiego; [ind.penicilline,aminoacidi, diagnostica,...];

- **INTRAPPOLAMENTO - INCAPSULAMENTO:** in gel o polimero, che sono scaldati includendo l'E in un reticolo spugnoso; separazione dal substrato; la membrana è permeabile a substrato e prodotto ma non all'E stesso; [VEDI PIU' AVANTI **REATTORI** PER ENZIMI IMMOBILIZZATI]

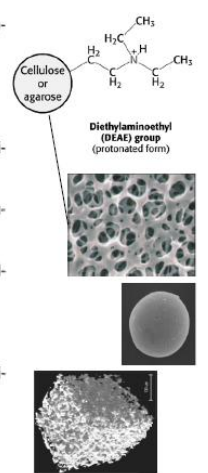
Enzimi per l'industria alimentare – limiti delle tecniche di immobilizzazione degli enzimi e alcune applicazioni industriali degli enzimi immobilizzati:



| Metodo | Vantaggi | Svantaggi |
|---------------------------|--|--|
| Legame covalente | Non è influenzato dal pH, dalla forza ionica del mezzo o dalla concentrazione del substrato | Il sito attivo può subire modificazioni; processo ad alto costo |
| Legami covalenti crociati | Legame forte, poco probabile la sua rottura | Perdita di attività enzimatica durante la preparazione; inefficace con substrati macromolecolari; impossibile la rigenerazione del carrier |
| Adsorbimento | Semplice, senza modificazione dell'enzima; possibile la rigenerazione del carrier; tecnica a basso costo | Cambiamenti di forza ionica possono provocare il deassorbimento; enzima soggetto all'attacco di enzimi proteolitici o microbici |
| Intrappolamento | Nessuna modificazione chimica dell'enzima | Diffusione del substrato verso, e del prodotto da, il sito attivo; difficile la preparazione, che spesso inattiva l'enzima; continua perdita di enzima attraverso i pori; inefficace con substrati macromolecolari; enzima non soggetto all'azione microbica o protenolitica |



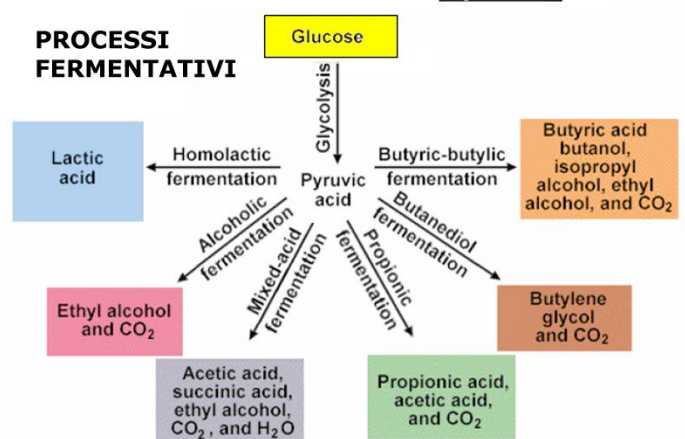
| Settore industriale | Enzima | Metodo di immobilizzazione | Processo |
|---------------------|--------------------|--|---|
| Alimentare | Glucosio isomerasi | DEAE-cellulosa Omogenati di cellule uniti da legami crociati mediante la glutaraldeide | Conversione del glucosio in fruttosio |
| | Aminoacilasi | DEAE-sefadex | Risoluzione di D,L-amminoacidi alla forma L |
| Caseario | Lattasi | Fibre di acetato di cellulosa | Idrolisi del lattosio a glucosio e galattosio |
| Farmaceutico | Penicillin acilasi | BrCN-attivato Sefadex Fibre di triacetato di cellulosa; poliacrilammide | Produzione di 6-APA dalla penicillina G |
| Chimico | Nitrilasi | Poliacrilammide | Produzione di acrilammide da acrilonitrile |



A5 – SCHEMA DI ALCUNI PROCESSI FERMENTATIVI: N.B.:

nella fermentazione industriale non si ha completa demolizione del composto di partenza, ma la fermentazione parziale che porta a prodotti finali (organici) con parte di contenuto energetico; la resa energetica della fermentazione è inferiore a quella dei processi respiratori, e l'ATP è generato solo attraverso la fosforilazione a livello del substrato.[vedi biochimica e fermentazioni].

Per es.:
F.alcolica/lattica → 2 ATP; F.butirrica → 3 ATP; Respirazione → 32 ATP.



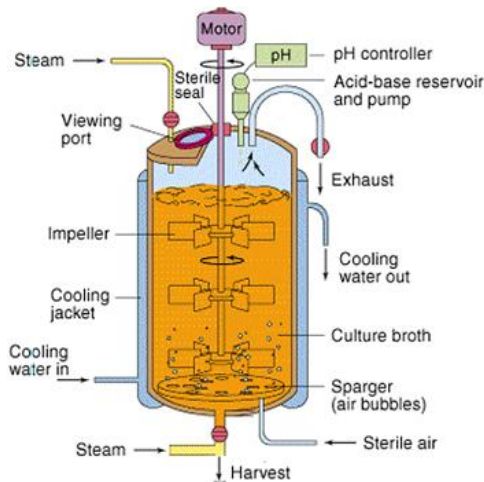
[INIZIO]

Scala di laboratorio:1-10 dm³
 Scala pilota: 50-1000 dm³
 Scala industriale:100 -300 m³;

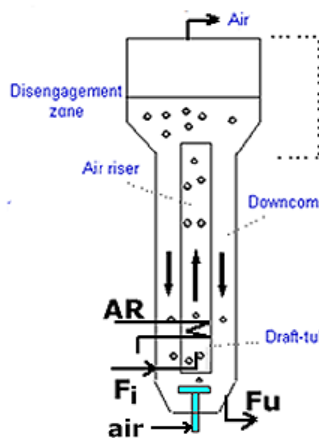
A6 – APPROFONDIMENTI – TIPI DI BIO-REATTORI:

BIOREATTORE: ambiente confinato e controllato in cui avviene una reazione biochimica;
FERMENTATORE: ambiente confinato e controllato in cui avviene una reazione di fermentazione;

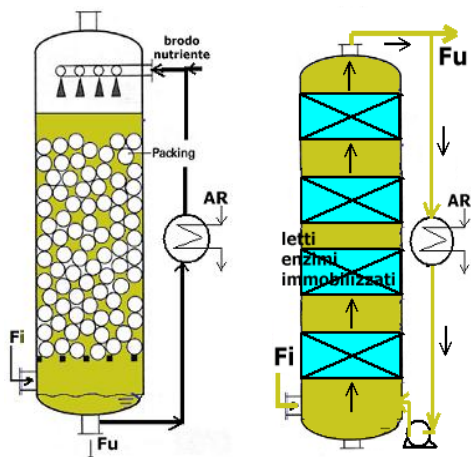
TIPI PRINCIPALI:



bioreattore STR: mescolato meccanicamente
 buona omogeneità;
 elevata ossigenazione;
 flessibilità;costi per agitazione;aggiunta di antischiuma (glicoli,...);
 problemi per tenute su albero rotante;
 migliore agitazione con aggiunta di setti laterali

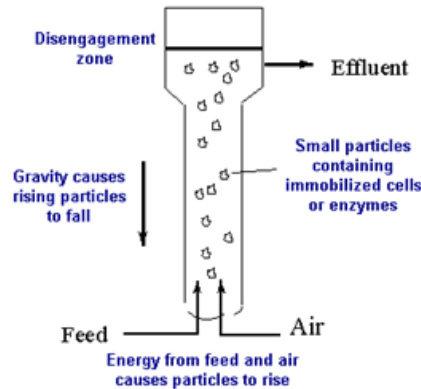


Bioreattori AIR LIFT-elevatori ad aria
 brodo di coltura agitato e aereato per gorgoglio di aria sterile, con tubo per migliore ricircolo;
 semplicità ed economia di esercizio;
 buona ossigenazione;
 minor formazione schiume;
 costo energetico alto;



bioreattori a LETTO FISSO-discontinuo/continuo
 è presente una fase solida (supporto per cellule/enzimi immobilizzati) ed un eluente o brodo nutriente; per supporti aerobici il liquido cola giù attraverso la colonna incontrando una corrente d'aria che va verso l'alto; spesso si opera un riciclo, con raffreddamento esterno.
 Semplicità ed economia di esercizio;
 per svolgimento di reazioni enzimatiche e trattamento depurazione acque; svantaggi:

formazione di aggregati o di percorsi preferenziali.
 Nei reattori a **enzimi immobilizzati** l'alimentazione, continua, è costituita dal brodo nutriente; con il processo di immobilizzazione l'enzima diventa insolubile nella miscela di reazione.



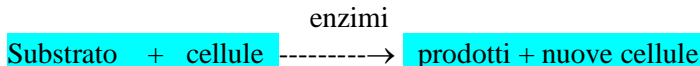
Bioreattori a LETTO FLUIDIFICATO
 particelle mantenute in sospensione dal flusso dell'eluente e/o dal gas in entrata; semplici ed economici; uso in trattamento depurazione acque; abrasioni; anche per **enzimi** immobilizzati.

[INIZIO]

2° PARTE - PRINCIPI DI BIOREATTORI -

CARATTERISTICHE GENERALI:

- reazioni biotecnologiche:



- velocità di reazione = generazione di nuove cellule:

$r_c = dC_c/dt$ = variazione concentraz. delle cellule/tempo che porta a generazione di nuovo prodotto o scomparsa di substrato.

- studio della cinetica: individuazione delle condizioni in cui il processo può essere condotto con elevata velocità; la velocità di sviluppo dipende da: tipo di microrganismo; T°; pH; tipo di terreno di coltura;

- accrescimento batterico = variazione del numero di cellule $N^{\circ}c$ nel tempo descritto dal grafico in figura

- REATTORE TIPO BATCH (chiuso) –

diagr. a lato: $\log N_c/t$ e μ/t ; zone: latenza - accelerazione – crescita esponenziale – rallentamento – fase stazionaria – decadimento –

→ variazione vel. accrescimento specifica: $\mu = 1/N^{\circ}cell \times dN^{\circ}c/dt = 1/C_c \times dC_c/dt$ con C_c = concentrazione cellule = $N^{\circ}c/Vol$;

L'equazione della velocità, relazione tra velocità di sviluppo e variare della concentrazione del substrato, è data dalla equazione di Monod:

batteri generati/tempo: $\mu = \mu_{max} \times C_s/(K_s + C_s)$;

μ = [tempo⁻¹], variazione del numero di individui nel tempo, vel. crescita specifica;

μ_{max} = velocità di accrescimento massima, in t⁻¹ ;

C_s = [g/dm³], concentrazione del substrato, variabile nel tempo; $C_s/(K_s + C_s)$ = velocità specifica lorda;

K_s = [ppm], costante di affinità substrato/microrganismi, caratteristici dei batteri e del substrato.

- fase di crescita esponenz. illimitata: - grande disponibilità di substrato- $C_s \gg K_s$, e sarà $C_s/(K_s + C_s) \cong 1$ da cui: → $\mu = \mu_{max}$; da $\mu = 1/N \times dN/dt$ sarà → $N = N_0 e^{\mu_{max} \cdot t}$ con N_0 = n°batteri per t=0; vale eq. Monod;

- fase rallentamento: disponibilità substrato= fattore limitante la crescita; per basso C_s , circa $\cong K_s$ si ha $C_s/(K_s + C_s) \ll 1$; vale l'equazione di Monod $\mu = \mu_{max} \times C_s/(K_s + C_s)$;

- fase stazionaria: si ha $\mu_{max} \times C_s/(K_s + C_s) \cong K_d$; → $\mu \cong 0$, con n° cellule che rimane costante.

- fase decadimento: $\mu = \mu_{max} \times C_s/(K_s + C_s) - k_d < 0$; K_d : costante di decadimento;

REATTORE CONTINUO – CHEMOSTATO – CSTR (continuous stirred tank reactor):

in fase stazionaria- alimentazione continua con portata di uscita uguale a quella di ingresso - i microrganismi presenti usano il substrato della portata di alimentazione F per la crescita; il substrato non si accumula all'interno del reattore e la biomassa prodotta è uguale a quella allontanata nell'unità di tempo.

1 - BILANCIO DI MATERIA DEI MICRORGANISMI-BATTERI

Accumulo di BATTERI = batteri entranti nell'unità di tempo + batteri generati nell'u.di t. – batteri uscenti nell'u.di t. con:

a) accumulo di batteri = $dC/(dt) \times Vol$

b) batteri entranti nell'unità di tempo = 0

c) batteri uscenti nell'unità di tempo = $F \times C_c$;

d) batteri generati nell'unità di tempo = $r_c \times Vol$; i batteri generati nell'unità di tempo saranno (Monod)= $\mu_{max} \times C_s/(K_s + C_s) \times C_c \times Vol$

$dC_c/dt \times Vol = 0 + [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V] - [F \times C_c]$
ACCUMULO = B.Entr. + BATTERI GENERATI – B.uscenti

In condiz.stazionarie, accumulo =0, C_c =cost., costante n°batteri, da cui avremo [crescita=uscita]:

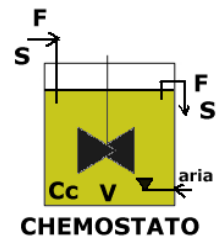
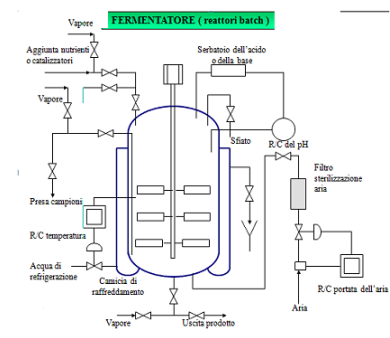
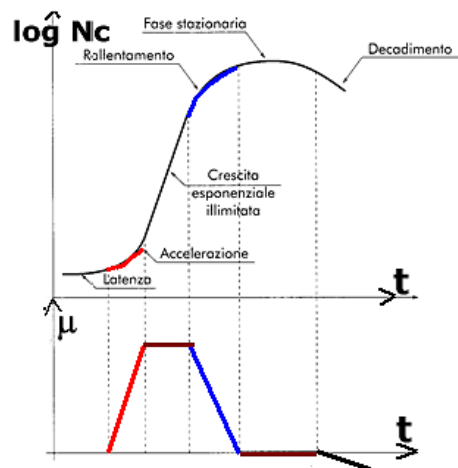
$0 = [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times V] - F$;

quindi → $V = F(K_s+C_s)/(\mu_{max} \times C_s)$, volume del reattore;

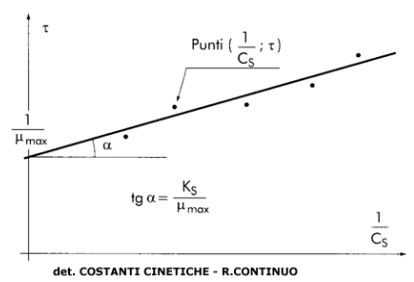
con $V/F = (K_s+C_s)/(K_s C_s) = VEL.SPAZIALE$ o t medio permanenza (τ tempo di ritenzione) del substrato nel Reattore.

Questa equazione si utilizza sia per il dimensionamento di reattori continui che per la determinazione delle costanti cinetiche μ_{max} e K_s . Sviluppando ancora si ha $\tau = K_s/\mu_{max} \times 1/C_s \times 1/\mu_{max}$ che rappresenta una retta con $1/C_s$ variabile indipendente e τ var. dipendente.

Riportando su grafico si possono determinare le costanti cinetiche in un reattore continuo: con $tg \alpha = K_s/\mu_{max}$ e intercetta $1/\mu_{max}$. Si misura la concentrazione del substrato per ogni valore di portata F e quindi il τ , ottenendo una serie di coppie di valori $1/C_s$ e τ , da rappresentare su diagr.



C_c = concentrazione attuale di batteri (biomassa)
 F = portata volumetrica (m³/h)
 K_d = costante di decadimento
 $C_s/(K_s + C_s)$ = velocità specifica lorda
 C_s = conc. del substrato nel reattore
 K_s = cost. di affinità substrato/ microrganismo
 V = volume reattore, m³



2 - BILANCIO DI MATERIA DEL SUBSTRATO:

Accumulo di substrato = substrato entrante/unità di t. – sub.uscente/unità di t. – sub. scomparso/unità di t.

- accumulo = $dC_s/dt \times V$;

- substrato entrante nell'u. di t. = $F \times C_{s0}$; C_{s0} è la conc. del substrato in ingresso.

- substrato uscende nell'u. di t. = $F \times C_s$

- substrato scomparso = $r_c/Y_{C/S} \times V = \mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V \times 1/Y_{C/S}$;

da cui: $0 = FxCS_0 - FxC_s - [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V \times 1/Y_{C/S}]$

con $Y_{C/S} \equiv \text{resa}$ in cellule rispetto al substrato scomparso, = kg cellule generate/kg substrato scomparso;

La **concentrazione** dei microrganismi sarà:

$$\rightarrow C_c = F \times (C_{s0} - C_s) \times [Y_{C/S} \times (K_s + C_s)] / [V \times \mu_{max} \times C_s];$$

2 - BILANCIO DI MATERIA DEL PRODOTTO:

Accumulo di prodotto = Prod. Entrante/unità di t. – Prod. Generato/unità di t. – prod. Uscente

$0 = 0 - [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V \times Y_{P/S}/Y_{C/S}] - F \times C_p$

con $Y_{P/S} = \text{Kg di prod. generato/ kg substr.scomparso} \equiv \text{resa}$ in prodotto rispetto al substrato consumato.

N.B.: per i processi aerobici il tasso di consumo di ossigeno è: $Y_{O_2/C} = \text{Kg di Ossig. Consumato/ Kg di cellule prodotte}$, e anche $OUR = (\text{Kg di Ossig. Consumato/h}) / \text{Kg di cellule prodotte}$.

[INIZIO]

- ESERCIZI applicativi: - REATTORE CONTINUO CSTR-

ES.1 - Un reattore continuo è alimentato con una portata di $F = 50 \text{ m}^3/\text{h}$ di **substrato** in cui la concentrazione del fattore limitante è $C_{s0} = 2000 \text{ ppm}$ (conc.substr.ingresso). Si determini il volume del reattore e la concentrazione cellulare sapendo che:

1. concentrazione di regime del fattore limitante $C_s = 1200 \text{ ppm}$;
2. costante di affinità $K_s = 400 \text{ ppm}$;
3. velocità specifica massima $\mu_{max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$;
4. resa cellule /substrato $Y_{C/S} = 0,1$.

Soluzione:

$C_{s0} = 2000 \text{ ppm} = 2 \text{ kg/m}^3 = 2 \text{ g/dm}^3$

$C_s = 1200 \text{ ppm} = 1,2 \text{ kg/m}^3 = 1,2 \text{ g/dm}^3$

$K_s = 400 \text{ ppm} = 0,4 \text{ kg/m}^3 = 0,4 \text{ g/dm}^3$

Calcolo del Volume Reattore:

Bilancio di **materia** relativo ai **microrganismi** (batteri):

$$dC_c/dt \times \text{Vol} = [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V] - [F \times C_c]$$

accumulo= generazione micr. - portata dei microrg.uscenti ; (K_d trascurabile)

In condizioni stazionarie si considera conc. di microrganismi C_c costante e accumulo nullo.

Si ha semplificando:

$0 = [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V] - F$; da cui è possibile calcolare il volume del reattore:

$$\rightarrow V = F / \mu_{max} \times (K_s + C_s) / C_s = 50 / 0,35 \times (0,4 + 1,2) / 1,2 = 80 / 0,42 = 190,5 \text{ m}^3$$

Calcolo della concentrazione cellulare - La concentrazione dei microrganismi sarà (dal bilancio substrato):

$$0 = FxCS_0 - FxC_s - [\mu_{max} \times C_s/(K_s+C_s) \times C_c \times V \times 1/Y_{C/S}];$$

$$\rightarrow C_c = F \times (C_{s0} - C_s) \times [Y_{C/S} \times (K_s + C_s)] / [V \times \mu_{max} \times C_s] =$$

$$= 50 (2 - 1,2) \times [0,1 (0,4 + 1,2)] / [190,5 \times 0,35 \times 1,2] = 6,4 / 79,8 = 0,08 \text{ g/dm}^3$$

ES.2 - Un reattore continuo è alimentato con una portata di $F = 10 \text{ m}^3/\text{h}$ di **substrato** in cui la concentrazione del fattore limitante è $C_{s0} = 150000 \text{ ppm}$ (conc.substr.ingresso). Si ha consumo di substrato = 50%. Si determini il volume del reattore e la concentrazione cellulare sapendo che: concentrazione di regime del fattore limitante $C_s = 1200 \text{ ppm}$; costante di affinità $K_s = 200 \text{ ppm}$; velocità specifica massima $\mu_{max} = 0,51 \text{ h}^{-1}$; resa cellule /substrato $Y_{C/S} = 0,08 \text{ kg cell/kg substr.}$

Soluzione:

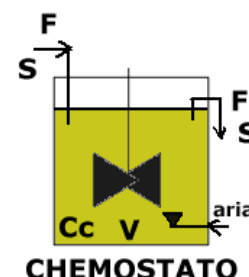
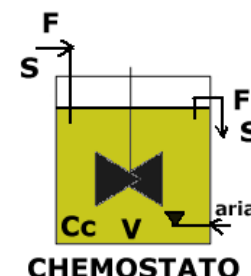
$C_{s0} = 150000 \text{ ppm} = 150 \text{ kg/m}^3 = 150 \text{ g/dm}^3$

$C_s = 0,50 C_{s0} = 75 \text{ kg/m}^3 = 75 \text{ g/dm}^3$, conc. a regime di fattore limitante;

$K_s = 400 \text{ ppm} = 0,2 \text{ kg/m}^3 = 0,2 \text{ g/dm}^3$;

$$\rightarrow V = F / \mu_{max} \times (K_s + C_s) / C_s = 10 \times (0,2 + 75) / (0,51 \times 75) = 19,7 \text{ m}^3;$$

$$\rightarrow C_c = F \times (C_{s0} - C_s) \times [Y_{C/S} \times (K_s + C_s)] / [V \times \mu_{max} \times C_s] = 10 \times (150 - 75) \times [0,08 \times (0,2 + 75)] / (19,7 \times 0,51 \times 75) = 6 \text{ g/dm}^3.$$



ANNOTAZIONI E APPROFONDIMENTI:

N1. Biotecnologie e inquinamento

Per risolvere il problema dell'inquinamento le biotecnologie sono utilizzate sia attraverso l'impiego di metodi biologici per eseguire preparazioni e lavorazioni, sia attaccando gli inquinanti dopo la loro formazione.

Il problema è sempre più complesso perché vi è un numero sempre maggiore di sostanze che hanno tendenza a **non degradarsi**, come idrocarburi, pesticidi, detergenti, ecc. Per questo motivo le varie tecniche biotecnologiche sono rivolte all'impiego di miscele di microrganismi ed enzimi e rispettive sostanze nutritive o alla creazione di supermicrorganismi i quali, contenendo in ciascuna cellula vari tipi di geni, sono capaci di digerire diversi tipi di sostanze inquinanti. Contro gli **inquinamenti da petrolio**, anche quelli che causano disastri ecologici in mare, si impiegano batteri *Super pseudomonas putida*; contro i metalli in acque di scarico si impiegano batteri *Pseudomonas aeruginosa* ed i batteri del genere *Thiobacillus*. Questi ultimi sono utilizzati per la loro particolarità di non nutrirsi di sostanze organiche, ma di sostanze minerali, infatti sono abbondantemente presenti nel sottosuolo, soprattutto più in profondità. Anche la **desolfurazione** dei combustibili, necessaria contro l'inquinamento da piogge acide, si può realizzare con metodi biologici poiché vi sono batteri che hanno grande avidità per i composti dello zolfo, dei quali si nutrono.

N2. Il biogas

La produzione di biogas ha origine remota; la natura ne produce da sempre ma ha impiegato milioni di anni per trasformare, grazie all'azione di microrganismi di vario genere, le cellule morte vegetali e animali in biogas per formare i giacimenti di biogas.

La produzione biologica del **metano** può essere effettuata grazie a batteri chiamati *metanigeni* (che si trovano, tra l'altro, nello stomaco dei bovini); le materie prime impiegate sono piuttosto abbondanti e poco costose: scorie industriali, acque di fogna urbane, liquami, rifiuti domestici, scarti agricoli e delle industrie alimentari. Un altro metodo sfrutta l'azione di **alghe**, che vengono fatte crescere in appositi macerari contenenti liquami di fogna e poi raccolte in grandi ammassi per essere digerite dai batteri metanogeni.

L'utilizzazione di **biocombustibili** (tra cui il biogas e il bioetanolo derivati da sostanze vegetali) consente di limitare l'effetto serra; infatti l'anidride carbonica immessa nell'atmosfera per combustione di biocombustibili equivale a quella fissata per sintesi clorofilliana dalle nuove colture, trasformandosi nuovamente in biomasse.

Invece l'anidride carbonica prodotta dall'utilizzazione di combustibili fossili non si trasforma, in tempi brevi, nuovamente in petrolio o carbone. [vedi altro documento – bioalcohol]

Produzioni biotecnologiche su larga scala:

- **produzione di bioetanolo (vedi altro documento);**
- **produzione di antibiotici (penicilline,...) (vedi altro documento)**

[\[INIZIO\]](#)

N3. LA STORIA DELLE BIOTECNOLOGIE-

Si può dividere in due fasi di diversa durata: una **prima fase** contraddistinta da un uso inconsapevole delle biotecnologie che va dall'antichità fino a circa 2 secoli fa e una seconda fase scientifica, che continua anche oggi e che vede le biotecnologie in piena crescita. Già i Sumeri e i Babilonesi, prima del 6000 a.C., erano capaci di produrre la birra mediante il lievito; più tardi, intorno al 4000 a.C., gli Egiziani scoprirono che l'anidride carbonica prodotta dall'azione del lievito di birra, poteva far lievitare il pane.

Nel **XIV secolo** d.C. era ormai diffusa in tutto il mondo la pratica della produzione di bevande alcoliche per mezzo di granaglie fermentate e distillate (anche se si pensa che abbia avuto origine precedentemente in Cina o nel Medio Oriente) e di fermentati del latte (yogurt e formaggi).

Ma fu solo nel **XIX secolo** che, in seguito all'invenzione del primo rudimentale microscopio (risalente al secolo XVII), si scoprì il legame esistente tra i processi fermentativi e particolari microrganismi.

Solo a partire dal 1857 Louis Pasteur evidenziò come i processi di fermentazione fossero il risultato dell'azione di specifici microrganismi e nel 1897 Eduard Buchner scoprì che la fermentazione poteva anche avvenire con estratti di lievito assolutamente privi di cellule viventi, chiarendo che questi microrganismi agiscono per mezzo di enzimi che producono essi stessi.

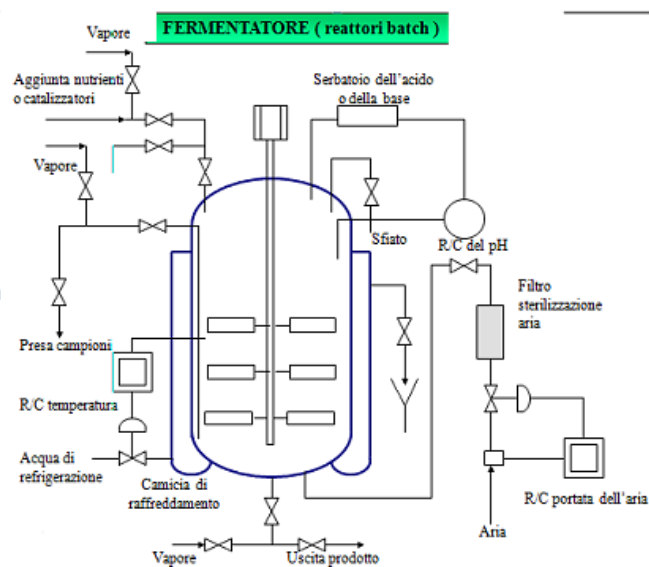
Una tappa importante dell'evoluzione delle biotecnologie è stata segnata proprio da **Louis Pasteur**, che nel 1885 riuscì ad ottenere un vaccino contro la rabbia facendo passare un virus nel cervello di un coniglio. Il vaccino così prodotto, se somministrato all'uomo, portava il virus a perdere la propria virulenza nei suoi confronti: questo era proprio un prodotto biotecnologico.

Lo **sfruttamento industriale** delle fermentazioni ha inizio nei primi decenni del **XX secolo** con i primi tentativi di produzione industriale di etanolo, acetone, glicerina, butanolo ed acido citrico (1923), ma dopo la Seconda Guerra Mondiale, con l'accresciuta disponibilità di petrolio, molti processi furono abbandonati perché antieconomici rispetto a quelli di sintesi.

Al declino dei processi di produzione di sostanze chimiche si contrappose però, a partire dagli anni '40, la rapida ascesa dei processi di produzione di **antibiotici**, tra cui la *penicillina* (ottenuta dalla muffa *Penicillium notatum*), la cui efficacia sugli stafilococchi era stata sperimentata da Alexander Fleming nel 1928. La penicillina segnò l'inizio dell'era degli antibiotici: ricerche successive portarono alla scoperta di numerosi nuovi tipi.

Da allora si è avuta una vera e propria proliferazione di processi di fermentazione industriale e di prodotti economicamente attuabili: la via biotecnologica si rivelò più vantaggiosa rispetto alla sintesi chimica per un gran numero di prodotti.

Nuovi formidabili impulsi vennero dalle scoperte dell'**ingegneria genetica**, ovvero dal complesso delle tecniche utilizzate per modificare il codice ereditario delle cellule viventi, in maniera da impartire nuove e particolari capacità.



Grazie a queste tecniche, sperimentate per la prima volta nel 1973, è possibile, tramite particolari enzimi detti di restrizione (o forbici molecolari), tagliare il DNA in punti particolari per inserirvi dei nuovi geni che consentono alle cellule di svolgere funzioni ben precise (tecnica del DNA ricombinante).

Questa tecnica ha moltiplicato enormemente le applicazioni commerciali, soprattutto nel campo dei prodotti **farmaceutici** (si ricorda ad esempio la produzione dell'insulina umana, sperimentata per la prima volta nel 1982) ed **agroalimentari**.



LINEA DEL TEMPO DELLA BIOTECNOLOGIA CHE CELEBRA L'INNOVAZIONE BIOTECNOLOGICA

L'Evoluzione della Rivoluzione

2000 a.C.
Gli Egiziani e i Sumeri imparano a produrre birra e formaggi

4000 a.C.
Gli Egiziani sono maestri nell'arte della produzione di vino.

500 a.C.
In Cina, grumi ammassati di semi di soia rappresentano il primo antibiotico, usati per il trattamento di infezioni e malattie

8000 a.C.
Inizio delle biotecnologie: dato che l'uomo comincia a scegliere le colture e ad incrociare i bestiami per addomesticarli. Le patate diventano il primo alimento coltivato.

300 a.C.
I Greci sviluppano tecniche di innesto per la coltivazione selettiva delle piante.

1663
Il fisico-matematico ed inventore inglese Robert Hooke scopre l'esistenza delle cellule.

1796
Viene scoperto il primo vaccino contro il vaiolo. Edward Jenner scopre il processo della vaccinazione inoculando in un bambino il vaiolo delle mucche e poi reiniettandolo col vaiolo umano. Il bambino era guarito dalla forma più leggera del vaiolo di mucca, diventando così immune al vaiolo umano. Il virus del vaiolo è stato chiamato "vaccinia", dal termine latino per la mucca, "vacca". Da qui nasce il termine "vaccino".

1839-1855
Gli scienziati tedeschi Matthias Schleiden e Theodor Schwann affermano che tutti gli organismi sono costituiti da cellule.

1861
Il chimico francese Louis Pasteur sviluppa la pastorizzazione, un processo che protegge il cibo uccidendo col calore i microbi dannosi.

1865
Dopo aver coltivato e testato piante di pisello per sette anni, Gregor Mendel pubblica una descrizione delle regole che determinano come i tratti ereditari siano trasmessi alla progenie: è la fondazione della genetica moderna.

1870-1910
Il padre del miglioramento genetico vegetale Luther Burbank sviluppa più di 800 nuovi ceppi di frutta, verdura e fiori. La patata resistente alle malattie fungine da lui sviluppata viene ampiamente piantata in tutta l'Irlanda, determinando la fine della Grande Carestia irlandese. Il botanico William James Beal produce in laboratorio il primo ibrido sperimentale di mais.

1885
Scoperto il vaccino contro la rabbia. Pasteur vaccina un ragazzo che era stato morso da un cane rabbioso. Il vaccino era stato ottenuto dall'estratto della colonna vertebrale di un coniglio affetto da rabbia. Tutt'oggi viene utilizzata una versione modificata di quel vaccino, che ha salvato centinaia di vite.

1888
Viene pubblicato "L'Origine delle specie", pietra miliare di Charles Darwin.

1892
Il chimico svedese Jöns Jakob Berzelius scopre le proteine.

1919
In una stampa viene utilizzato, per la prima volta il termine **biotecnologia**

1922
A Toronto, il Dott. Frederick Banting e il suo assistente Charles Best scoprono l'insulina come trattamento per il diabete.

1941
Il microbiologo danese A. Justin conia il termine **"ingegneria genetica"** una tecnica che consiste nel trasferimento di una determinata porzione di materiale genetico da un organismo all'altro.

1943
Lo scienziato canadese Oswald Theodore Avery isola del DNA puro.

1953
James Watson e Francis Crick sono i primi a descrivere la struttura a doppia elica del DNA.

1958
Il DNA viene prodotto in vitro per la prima volta.

1961
Scoperta del "filamento stampo" RNA messaggero. L'RNA messaggero gioca un ruolo fondamentale della sintesi proteica. Gli RNA messaggeri, noti anche come mRNA, sono molecole di RNA che trasportano l'informazione genetica dal DNA nel nucleo della cellula al complesso di creazione delle proteine nel citoplasma cellulare. Per diverso tempo dopo la scoperta della funzione genetica del DNA e la decifrazione della sua struttura a doppio filamento (grazie a Watson e Crick), i ricercatori non hanno saputo esattamente come l'informazione genetica venisse portata dai geni al citoplasma per produrre le proteine richieste dalle funzioni cellulari. Nel 1965, i biologi francesi François Jacob e Jacques Monod hanno ricevuto il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina per il loro contributo in questa ricerca.

1962
Premio Nobel per la scoperta della struttura "A Doppia Elica" del DNA. Il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina 1962 è stato assegnato congiuntamente a Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson e Maurice Hugh Frederick Wilkins "per le loro scoperte riguardanti la struttura molecolare degli acidi nucleici e la sua importanza per il trasferimento di informazioni nella materia vivente"

1968
Marshall W. Nirenberg e Har Gobind Khorana vincono il Premio Nobel per aver decifrato il codice genetico dei 20 amminocidi, permettendo così ai ricercatori di affermare che il codice genetico è universale in tutti gli organismi viventi.

1970
Lo scienziato svizzero Werner Arber scopre che i batteri si difendono dai virus tagliando il DNA virale mediante specifici enzimi di restrizione. Questi enzimi sono oggi ampiamente usati nelle moderne tecnologie che usano il DNA.

1970
Normal Borlaug diventa il primo coltivatore di piante a vincere un Premio Nobel per le nuove varietà di grano che aumentano i raccolti del 70%. Ciò segna l'inizio della Rivoluzione Verde nel mondo dell'agricoltura. Il microbiologo americano Daniel Nathans scopre il primo enzima di restrizione che può tagliare in pezzi il DNA per studi e applicazioni varie. La tecnica degli enzimi di restrizione diventa uno strumento fondamentale nella ricerca genetica moderna, aiutando a creare l'industria biotecnologica e ponendo le basi per il Progetto Genoma Umano.

1971
Prima sintesi completa di un gene. Primo DNA ottenuto da diversi organismi.

1973
Stanley Cohen e Herbert Boyer sviluppano la tecnologia del DNA ricombinante. Considerata come la nascita della moderna biotecnologia, hanno completato il primo esperimento di ingegneria genetica di successo inserendo in DNA batterico un gene proveniente da una rana acquatica.

1976
Per la prima volta è determinata, per uno specifico gene, la sequenza delle coppie di basi che si combinano per formare il DNA.

1977
Herbert Boyer, fondatore della pioniera azienda biotecnologica Genentech, usa il batterio E. coli per produrre l'insulina umana. La tecnica rappresenta un miglioramento significativo nell'efficienza e nella realizzabilità a lungo termine della produzione di questa terapia medica vitale, precedentemente estratta da scorte limitate di tessuti animali che potevano determinare reazioni allergiche. La stragrande maggioranza dell'insulina è oggi prodotta grazie a questo metodo.

1978
Viene sviluppato il primo vaccino da DNA ricombinante per uso animale.

1982
Viene sviluppato il primo vaccino da DNA ricombinante per uso animale.

1984
Viene scoperta l'impronta genetica, usata oggi per stabilire le relazioni familiari e identificare i sospetti criminali.

1985
Per la prima volta negli USA, le prime piante geneticamente modificate vengono fatte crescere all'aperto nei campi. Si tratta di piante di tabacco geneticamente modificate. Nello stesso anno nasce Assbiotech.

1986
Per la prima volta negli USA, le prime piante geneticamente modificate vengono fatte crescere all'aperto nei campi. Si tratta di piante di tabacco geneticamente modificate. Nello stesso anno nasce Assbiotech.

1988
Il verme C. elegans diventa il primo organismo pluricellulare di cui viene completamente sequenziato il genoma.

1989
Scoperta del gene difettivo causa della fibrosi cistica da parte del Dott. Lap-Chee Tsui al Toronto's Hospital for Sick Children. Successivamente, scoperte analoghe collegano geni specifici ad altre malattie, quali l'autismo, la Malattia di Huntington, e un raro problema cardiaco noto come Cardiomiopatia Ventricolare Destra. Ognuna di queste scoperte ha contribuito ad accelerare la conoscenza della complessa relazione tra la funzione di un gene e la malattia.

1990
La chimosina, un enzima impiegato nella produzione del formaggio, diventa, in Canada, uno dei primi prodotti utilizzati nella catena alimentare a derivare da tecniche ricombinanti. Normalmente estratto dal caglio, enzima complesso che si trova nello strato interno dello stomaco delle mucche, la chimosina è oggi prodotta direttamente in organismi come i batteri E. coli. Viene lanciato il Progetto Genoma Umano. Questo sforzo internazionale, della durata di 13 anni, per determinare la sequenza delle 3 miliardi di paia di basi che compongono il DNA di una persona, ha infine identificato 20.000-25.000 geni.

1997
Il mondo conosce la pecora Dolly, il primo animale clonato. L'UNESCO adotta la Dichiarazione Universale del Genoma Umano e dei Diritti Umani, riconoscendo il genoma umano come patrimonio dell'umanità che deve essere salvaguardato dalla manipolazione inappropriata.

1998
Viene scoperta l'impronta genetica, usata oggi per stabilire le relazioni familiari e identificare i sospetti criminali.

1999
Scienziati tedeschi e svizzeri sviluppano il "riso dorato", arricchito di betacarotene, che stimola la produzione di vitamina A, prevenendo così alcune forme di cecità.

2003

2003 Viene completato il Progetto Genoma Umano. I ricercatori al Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre alla British Columbia sono stati i primi a sequenziare il genoma del virus SARS.

2005

Il miliardesimo acro biotech è piantato da uno degli 8.5 milioni di agricoltori in uno dei 21 paesi.



2009

Il Winnipeg's National Microbiology Laboratory completa il primo sequenziamento genetico del virus dell'influenza H1N1, proprio mentre la malattia sta raggiungendo proporzioni pandemiche internazionali.



L'azienda Medicago, con sede a Quebec, coltiva il vaccino contro H5N1 (virus dell'influenza aviaria) in piante di tabacco. Questo prodotto diventa, in Canada, il primo vaccino influenzale coltivato in piante ad essere sottoposto a studi clinici sull'uomo.

2011



Esperimenti sull'uomo del Vaccino contro la Malaria. Esperimenti sull'uomo del vaccino contro la malaria si stanno attualmente eseguendo e mostrano risultati positivi. Questo potrebbe essere il primo vaccino contro un'infezione da parassita. Accesso al trattamento per HIV/AIDS. Le Nazioni Unite adottano una dichiarazione politica atta ad aumentare a 15 milioni di persone, entro il 2015, l'accesso al trattamento dell'AIDS. In Europa, le disposizioni sono in condizione di avvio per raggiungere questo scopo. Gli scienziati biotecnologici europei hanno lanciato un test clinico di un farmaco biotech anti-HIV prodotto usando del tabacco geneticamente modificato - il primo degli studi di questo tipo, in Europa. Se lo studio in Fase I verrà eseguito con successo, seguiranno studi più ampi e i ricercatori già immaginano un nuovo anticorpo che potrà essere combinato con un altro farmaco per offrire una migliore protezione contro HIV/AIDS ad un prezzo molto inferiore, permettendo così un accesso più ampio al trattamento nei paesi più poveri.

2012

Bozza del Genoma del Grano. Un team internazionale pubblica una bozza del genoma del grano. Ibrido di tre erbe, il grano di razza possiede 3 genomi e più di 96.000 geni in una sola pianta, rendendolo così particolarmente difficile da decifrare.



2013

Il primo occhio bionico ha visto la luce negli USA, fornendo una speranza alle persone non vedenti di tutto il mondo. Sviluppato dalla Second Sight Medical Products, la Argus II Retinal Prosthesis System ha aiutato più di 60 persone a recuperare parzialmente la vista, in alcuni casi con risultati migliori che in altri.

2014

Un gruppo americano riesce ad espandere, in vitro, l'alfabeto genetico per includere due nucleotidi idrofobici artificiali, dSSiCS and dNaH. Floyd Romesberg e i suoi colleghi hanno dimostrato che le forme trifosfato di entrambi i nucleotidi vengono importate in E.coli ed efficientemente incorporate nel genoma senza che i meccanismi di riparazione del DNA. Li riconoscano come lesioni. Né la presenza di un trifosfato anormale, né la replicazione di paia di basi innaturali modifica la crescita della cellula in modo significativo. Il risultante batterio contenente DNA con una coppia di basi innaturali è così il primo organismo a riprodurre un alfabeto genetico espanso, senza che la replicazione cellulare sia particolarmente compromessa.



2007

Il primo vaccino contro il papillomavirus umano. Il primo vaccino contro il papillomavirus umano - causa di un tipo di cancro - è approvato per essere usato su donne e ragazze in più di 80 paesi.



2009

Un team canadese di scienziati e ingegneri dell'Università di Toronto sviluppano un microchip con componenti nanometriche per individuare marcatori chimici per il cancro, una tecnica che potrebbe rendere la diagnosi molto più rapida.



2010

Prima cellula sintetica. Nel maggio 2010, l'Istituto J. Craig Venter crea la prima cellula batterica completamente sintetica e auto-replicante, chiamata Synthia. Mentre il governo USA ha stanziato \$ 430 milioni nella biologia sintetica fin dal 2005, la maggior parte di essi è stata utilizzata per sviluppare carburanti alternativi. Alcune aziende stanno ora iniziando a sfruttare la tecnologia per scopi medici.

2013

Il mondo celebra il 60° anniversario della scoperta della doppia elica di Watson e Crick.



FEDERCHIMICA
ASSOBIOTEC

Associazione nazionale per lo sviluppo della biotecnologie