

Lezione 4 13/03/23

3.1 terreni di crescita

Terreni nutritivi: composizione

I nutrienti sono convertiti in: Biomassa cellulare + Prodotti + Calore (processo esoergonico)

Quantità e qualità dei nutrienti dipendono dal tipo di cellula che vogliamo andare a coltivare.

In un terreno sono necessari:

- Fonte di Carbonio
- Fonte di Azoto
- Sali minerali
- Fattori di crescita

I terreni in laboratorio e per la produzione industriale sono diversi.

Terreni di laboratorio

Terreni su cui si fa ricerca. Normalmente contengono elementi puri, sostanze purificate - costo importante.

Fonte di Carbonio: elemento più importante (anche quantitativamente), rappresentata da zuccheri o da composti contenenti carbonio puro.

Fonte di Azoto e nutrienti: sali etc...

Terreni minimi:

Contengono tutti gli elementi ma non in abbondanza, sono presenti nella concentrazione adeguata. Contengono: zucchero come fonte di C, ammonio (azoto - sale di ammonio), sali, alcune vitamine se necessarie, tracce (elementi di cui è necessaria la presenza ma in concentrazioni minime), amminoacidi e nucleotidi se necessari.

Terreni ricchi:

Devono contenere carbonio, azoto e gli elementi necessari di base alla cellula. Oltre agli elementi di base sono sicuramente presenti anche macromolecole: amminoacidi, proteine, nucleotidi, vitamine. Dunque terreno ricco contiene macromolecole già pronte, la cellula non ha bisogno di sintetizzare a se.

Preparati che prendono il nome di Yeast extract: estratto di lievito (cellule di lievito vengono disintegrate, il contenuto della cellula funge da nutriente per altre cellule)

oppure peptone: idrolizzati di proteine, peptidi, tanto azoto.

Terreni industriali: caratteristiche

Devono garantire:

- **Massima resa:** far in modo che la cellula trovi a disposizione tutto il necessario per essere trasformato in prodotto.
Resa: rapporto tra quello che do alla cellula e quello che ne ottengo.
- **Massima concentrazione del prodotto** (grammi/litro)
- **Massima velocità di crescita**
- **Minima concentrazione di prodotti indesiderati:** per produrre la cellula utilizza energia, se produce elementi aggiuntivi spreca energia.
- **Economici:** meno costa più il processo sarà economicamente vantaggioso.
- **Disponibili:** elementi disponibili in qualunque momento dell'anno, le fonti non devono dipendere da stagionalità.
Abbiano anche disponibilità di trasporto non complessa.

Fondamentale utilizzare **materiali di scarto** come fonti di nutrienti per microorganismi:

Fonti di carbonio:

Melassi

Fonte di carbonio, azoto, sali minerali e vitamine.

Sono gli scarti della produzione di zucchero alimentare, possono essere di canna (Brasile) o di bietola da zucchero (EU, USA). Quando ne viene estratto il saccarosio viene prodotto uno scarto: melasso.

Ancora ricco di: 30-40% saccarosio, 50% glucosio e fruttosio, sali minerali e composti organici (molecole naturali, amminoacidi, proteine, vitamine, etc...).

Contengono anche azoto 16-20% (sotto forma di betaina, acido glutammico, proteine), tiamina, riboflavina, pantotenico e biotina.

Enzima invertasi necessario per idrolisi degli zuccheri (saccarosio in glucosio e fruttosio)

A volte i melassi possono contenere sostanze tossiche (pesticidi e prodotti usati per crescere la pianta) quindi devo essere purificati per eliminarle.

Amido

Proviene da patate (EU), mais e cereali (USA), riso (Asia)- molto costosi, non è un vero e proprio scarto ma devo lavorare la materia per estrarne l'amido.

Struttura complessa: polimero ramificato costituito da molecole di glucosio legate alfa 1-4 o alfa 1-6. Materiali amidacei sono formati al 20% di amilosio (polimero lineare dove le molecole di glucosio solo legate alfa 1-4) e 80% di amilopectine (ramificazioni, glucosio legato sia alfa 1-4 che 1-6).

Quando uso amido per terreno di crescita ho la necessita che gli organismi siano in grado di degradare questi polimeri tramite enzimi:

- alfa amilasi: scinde legami 1,4-alfa glicosidici
- glucoamilasi: scinde legami 1,4-alfa delle estremità non riducenti
- pullulanasi: scinde legami 1,6-alfa deramificante

Noi siamo a carico del processo di idrolisi dell'amido perché non tutti i microorganismi sono corredati con gli enzimi necessari.

Dall'idrolisi dell'amido si ottiene uno sciroppo di glucosio o fruttosio.

Amido e enzimi per idrolisi costano, dopo la lavorazione devo anche aggiungere gli altri elementi - processo molto dispendioso.

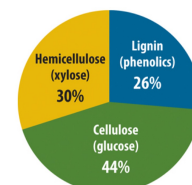
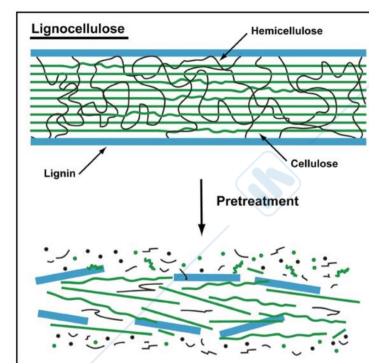
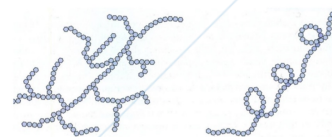
Cellulosa

Clostridi; idrolisi chimica, fisica o enzimatica.

Materiali ligno cellulosi contengono tre polimeri: lignina, emicellulosa e cellulosa. Scarto più abbondante che possiamo trovare in natura e nelle vite quotidiane.

Facendo idrolisi di questi materiali otteniamo: lignina (non la utilizziamo come nutriente - può essere bruciata), cellulosa e emicellulosa che sono polimero costituiti da monomeri di zuccheri che possiamo recuperare con gli enzimi giusti.

Idrolisi di cellulosa ed emicellulosa tramite enzimi endo e eso cellulasi, endo e eso xilanasi e beta xilosidati: ottengo miscela di glucosio e altri zuccheri (colosso, galattosio etc...) che i microorganismi sanno utilizzare. Enzimi non sono presenti in partenza e dunque vanno aggiunti (costo).



Estratto di malto (orzo germinato)

Contiene:

- 90% carboidrati: monosaccaridi esosi (6 C), di e trisaccaridi
- Azoto: proteine, amminoacidi, purine, pirimidine
- Sostanze indesiderate che si possono formare durante il processo di sterilizzazione

Siero di latte

Scarto della produzione dei formaggi

Contiene:

- 75% Lattosio (disaccaride glucosio + galattosio): enzima beta-galattosidasi necessaria per digerire il lattosio
- 1% grassi
- 13% proteine - azoto
- 11% sali minerali

Non solo fonte di carbonio ma anche altri elementi.

Fonti di azoto:

Azoto somministrato sotto forma di:

- N₂: microrganismi come azoto batteri e clostridi che sono autosufficienti e assorbono N₂
- Nitrati
- Sali di ammonio: cloruri, fosfati, solfati - rischi di cadute di pH
- Azoto organico: amminoacidi, peptoni (idrolissati di proteine)
- Corn-steep: macerazione del grano, contiene acido lattico, amminoacidi aromatici, vitamine e sali
- Farine di soia: proteine 50% e carboidrati 30%. Soia

Importanza della quantità oltre alla qualità:

Dobbiamo fornire nutrienti in quantità necessaria per produrre tanto, ma quanto?

Bisogna prestare attenzione anche alla pressione osmotica creata dalle macromolecole sciolte in soluzione di terreno: se troppo elevata la cellula può collassare.

Concentrazione degli zuccheri, delle fonti di carbonio, non deve essere superiore al 15%.

Aggiungiamo i fattori di crescita (biotina, inositolo e acido pantotenico) i melassi supplementari (ammonio, solfato e ammonio fosfato) e infine estratto di lievito di malto e corn steep.

Minerali:

Zolfo - gruppi SH degli aa. Somministrato come SO₄ (solfato), la cellula lo preleva grazie alla presenza delle solfato permesse.

Fosforo - acidi nucleici, ATP, fosfolipidi. Somministrato sotto forma di PO₄ (fosfato).

Sali minori (K, Na, Mg, Mn) - sono fondamentali ma ne bastano pochi. Ne somministravamo milligrammi / litro. Anche: calcio - per le pompe e ferro, zinco e rame - per citocromi e proteine.

Sterilizzazione

Passaggio molto importante per il processo. Microrganismi sono ovunque, se voglio lavorare con un singolo ceppo devo eliminare possibili presenze aggiuntive e non volute sterilizzando.

Sterile: privo di cellule e di spore, stelizazione: inattivazione di ogni specie vivente presente (cellule e spore).

Sterilizzazione dei terreni, dell'aria e del fermentatore: calore secco a 150° per almeno 3 ore o calore umido (vapore) a 110/120° per almeno 30 minuti. Aria e terreni liquidi: filtrazione con membrane da 0.2 micron di diametro - microfiltrazione.

Lezione 5 16/03/23

4. Bioreattore/fermentatore

Luogo dove il processo viene svolto. Adeguato sistema che permette alle cellule di produrre.

Funzioni:

- mantiene la sterilità: il processo dovrebbe avvenire in condizioni
- il più possibile sterile - deve essere possibile lo sviluppo solo
- del microrganismo scelto. sterilità dovrebbe essere mantenuta
- per l'intero processo. (a)
- traferisce i gas/ossigeno: processi posso avvenire in due condizioni - aerobico o anaerobico - ossigeno e gas devono entrare o uscire dal fermentatore. (b)
- Mantiene omogeneità nel fermentatore tra presenza di cellule, gas e terreno liquido. (c)
- Smaltisce il calore: i nutrienti vengono convertiti in cellule, prodotti e calore poichè i processi di crescita sono esoergonici. Il calore va smaltito poichè i processi devono avvenire a temperature precise e costanti.
- Il controllo del processo è facile: continua monitoraggio del processo.

Inoltre il bioreattore deve:

- garantire il più basso consumo di energia;
- Deve avere un sistema di campionamento, ci deve permettere di prelevare dei campioni per analizzarli e controllare il processo;
- Garantisce un'evaporazione non eccessiva: processi spesso avvengono a temperatura maggiore di quella ambiente e è parte del liquido tende ad evaporare, nella maggior parte dei processi è importante che non ci sia troppa evaporazione - porta a diminuzione del volume del terreno liquido;
- Deve essere disegnato in modo da rendere semplici le operazioni di lavoro: tutto deve essere ottimizzato, soprattutto per le operazioni di svuotamento, lavaggio e mantenimento;
- Deve essere versatile per diversi tipi di produzione: facilmente adattabile a seconda del processo (organismo e prodotto del caso);
- Deve avere forma il più simile possibile tra il fermentatore di piccola e grande scala per facilitare lo scale-up: quello che funzionava bene in scala piccola potrebbe non funzionare altrettanto bene in scala grande se i due sono diversi.

Dimensioni di un bioreattore

Lab scale: da 1 a 20 litri

Scala industriale da 100 a 500 litri - produzione di amminoacidi, antibiotici, proteine ricombinanti

Scala per produzione di etanolo (biofuel) da 500 a 1000 litri

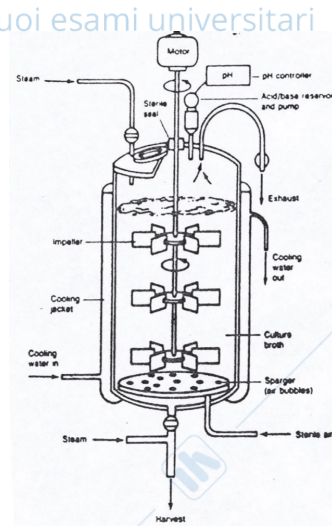
Materiali di costruzione

Piccola scala, fino a 20 litri sono in vetro.

Grande scala sono in acciaio inossidabile.

Sterilizzazione (a)

Ci permette di coltivare solo il microrganismo scelto. Sterilizzato il terreno e dunque anche l'ambiente. Viene usato maggiormente il vapore: si insuffla vapore per rendere sterile l'ambiente. L'aria che entra viene filtrata da membrane.



Tutto nel fermentatore è chiuso: il fermentatore ha un sistema di valvole con punti di ingresso e di uscita.

Tutto ciò che entra deve essere sterile.

Ciò che esce deve uscire in maniera controllata.

Ciò è possibile grazie a tubi e valvole del bioreattore che ha anche una leggera pressione interna. Sistema isolato dall'esterno in modo che niente entri e niente contamini il processo.

Trasferimento di gas/ossigeno (b)

I processi fermentativi possono essere aerobici (in presenza di ossigeno) o anaerobici (in assenza di ossigeno o in presenza di azoto e anidride carbonica).

Per ottenere un sistema in condizioni di anaerobiosi stretta (totale assenza di ossigeno) insufflo nel fermentatore azoto oppure anidride carbonica: gas che vanno ad eliminare qualunque traccia di ossigeno presente nel fermentatore.

Ossigeno - processi aerobici

Ossigeno fondamentale in quanto accettore terminale di elettroni nella respirazione cellulare, è un substrato di alcune reazioni del metabolismo (ossidazione) e in alcuni casi si comporta come inibitore di processi metabolici.

Come entra ossigeno/aria? Attraverso un filtro che la sterilizza. Generalmente entra dalla parte bassa del fermentatore.

Tubo collegato a generatore di aria, entra ad una certa velocità ed entra una certa quantità.

Sparger: superficie bucata (micro fori).

L'ossigeno dall'aria deve arrivare alla cellula: innanzitutto deve sciogliersi nel brodo. Ossigeno può agire come agente limitante. Passaggio dalla bolla al brodo deve avvenire in maniera corretta o le cellule non ricevono abbastanza ossigeno.

Importante quantità e velocità di questo trasferimento da bolla a brodo.

Passaggio più critico è quello dalla bolla al brodo. Dipende dalla dimensione della bolla che tanto più è piccola tanto meglio l'ossigeno passa in soluzione. Ruolo dello sparger.

Azoto o CO₂ - processi anaerobici

Entrano azoto o CO₂ per allontanare ossigeno. Entrano sterili.

Omogeneità - agitazione (c)

Tre fasi in un fermentatore: cellule sono solide, brodo è liquido e aria è gas. Se non mantengo uno stato di agitazione le cellule tendono a depositarsi sul fondo.

In caso di processo aerobico, l'agitazione aiuta. A mantenere un alta concentrazione di ossigeno disciolto in quanto aiuta le bolle a rimanere di piccola dimensione. Senza agitazione le bollicine si fondono a formare una bolla più grande.

Le prime pale si trovano molto vicine allo sparger per aumentarne l'efficacia.

All'interno dei bioreattori sono presenti barre di acciaio per evitare la formazione di onde e di vortici in quanto le quantità sono elevate e il moto del liquido tende a formare onde e vortici.

Diversi sistemi di agitazione:

Agitazione crea stress alla cellula, alcune sono più sensibili altre meno. Devo creare condizioni ideali per la cellula poiché se stressata la cellula funziona male e il processo non ha un alta produzione. Importante non portare la cellula alla morte. (Es: filamentosi).

- turbine: flusso radiale
- Sistemi con eliche a lama piatta: flusso assiale
- sistemi meccanici: stirred Tank - assiale, pale ruotano attorno ad un asse
- Sistemi pneumatici: air lift. Non ci sono pale, non ci sono turbine. Sistema ad aria. È un ascensore. Ha due camere, una interna e una esterna. Aria entra da sotto e viene incanalata del compartimento interno dove trascina il liquido verso l'alto (riser). Una volta in alto il liquido perde l'aria e riascende nella camera esterna (downcomer).

Sistema adatto per cellule sensibili all'agitazione. Agitazione ad aria permette anche di evitare la formazione di calore rispetto a quello generato dall'agitazione meccanica.

- Fermentatore waldhof: con una turbina in basso che crea agitazione radiale. Sistema meno usato.

L'agitazione di una coltura liquida insufflata con aria può portare alla formazione di **schiuma**. Tanto più i terreni sono ricchi di sostanze tanto è più facile la formazione di schiuma.

La schiuma è dannosa perchè:

- va ovunque, rischia di rovinare la condizione di sistema chiuso sterile. Fa da ponte tra interno ed esterno, attraverso la schiuma possono entrare microrganismi presenti nell'ambiente esterno.
- Determina riduzione di ossigenazione
- Perdita di materiale: schiuma si porta dietro le cellule.
- Riduzione della resa

Necessari sistemi antischiama. Posso essere di due tipi:

- fisico: pale sulla parte alta del fermentatore, spezzano la schiuma
- chimico: sostanze che impediscono la formazione di schiuma. Es: oli animali e vegetali, siliconi alcoli a lunga catena, polieterei e derivanti del sorbitano. Devono essere sostanze che non interferiscano con la cellula, non devono essere tossiche, devono agire a basse concentrazioni, devono essere solubili e sterilizzabili. Inoltre non devono dar fastidio nella fase di estrazione e purificazione del prodotto.

Inoculo

Come entrando le cellule nel fermentatore.

Devono essere cellule attive e già pronte a partire, crescere e produrre. Cellule in attiva fase di crescita. Non posso inoculare cellule liofilizzate.

Pre inoculo: cellule in una piccola coltura per averle in attiva fase di crescita.

Al momento dell' inoculo le cellule devono avere una concentrazione minima o la crescita non parte. L'inoculo deve essere circa 5 - 10% del volume di terreno da inoculare.

Necessario dunque fare scale - up. Passo da fermentatore più piccolo per pre inoculo e poi al fermentatore più grande per inoculo.

La maggior parte dei processi industriali seguono una scala di inoculi o di prefermentazione: passaggio da reattori più piccoli a più grandi in scala fino al raggiungimento di una adeguata biomassa per ottenere la massima produzione.

