

ZANICHELLI

Fabio Fanti

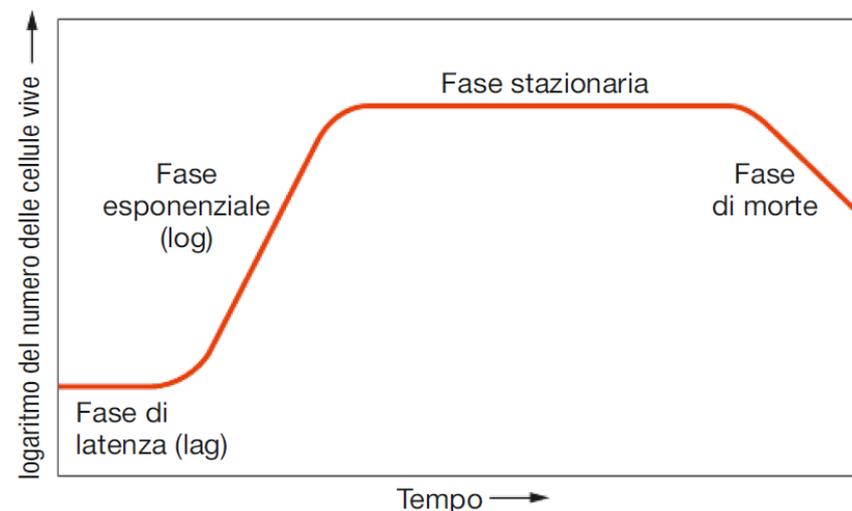
Biologia, microbiologia e tecnologie di controllo sanitario

I processi biotecnologici

Esigenze nutrizionali e condizioni operative

Per ottimizzare le condizioni colturali allo scopo di ottenere concentrazioni rilevanti del prodotto è necessario valutare:

- le **sostanze nutritive**: possono servire in eccesso o in carenza
- i **parametri ambientali**: temperatura, pH, condizioni di aerazione ecc.
- i parametri relativi alla **cinetica di fermentazione**, cioè la relazione fra la fase della curva di crescita microbica e quella in cui si ha la massima resa produttiva



Curva di crescita microbica.

I terreni di coltura per la microbiologia industriale /1

I terreni di coltura possono essere:

- **sintetici:** utilizzati in laboratorio, contengono materie prime pure
- **complessi:** impiegati in microbiologia industriale, contengono materie prime grezze che richiedono pretrattamenti

Fonti di carbonio: CO₂, carboidrati in forma pura (es. lattosio o glucosio) o grezza (derivano da diverse fonti es. melasse, cellulosa ecc.)

Fonti di azoto: composti inorganici (sali di ammonio), composti organici (aminoacidi e proteine, urea), materie prime grezze (es. acqua di macerazione del mais).

I terreni di coltura per la microbiologia industriale /2

Fonti di vitamine: ingredienti delle materie prime grezze utilizzate. Possono essere integrate con altre sorgenti (es. estratto di lievito).

Minerali: dall'acqua di fonte e dalle materie prime grezze impiegate. Se necessario, si possono aggiungere sali di calcio, fosforo, potassio, cloro, magnesio.

Agenti antischiuma: sostanze ad azione tensioattiva che riducono la tensione superficiale, limitando la formazione di schiuma. Si impiegano oli naturali e sintetici.

I terreni di coltura per la microbiologia industriale /3

Sistemi tampone per la correzione del pH: carbonato di calcio (se il sistema è acido) o fosfati (se alcalino).

Precursori: sono incorporati dai microrganismi e andranno a formare parti della molecola che il microrganismo è chiamato a produrre; la resa è altamente potenziata (es. acido fenilacetico, precursore della molecola di penicillina G).

Acqua: importante per il calcolo dei volumi necessari alla preparazione dei terreni di coltura, la conduzione degli impianti, le sue caratteristiche e composizione in oligoelementi.

Le fasi produttive: preparazione dell'inoculo

In ogni **processo biotecnologico** intervengono due componenti fondamentali:

- la materia prima che costituisce il substrato
- i biocatalizzatori con cui esso è inoculato

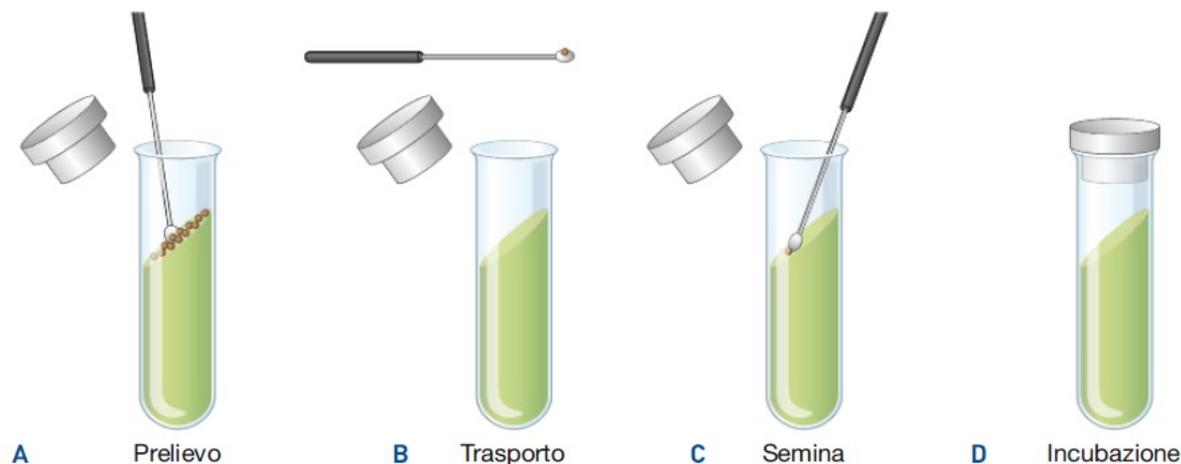
Il **ceppo microbico** deve rispettare alcune caratteristiche:

- facilità di coltivazione e manipolazione
- assenza di qualsiasi carattere di patogenicità
- alta velocità di riproduzione
- elevata capacità produttiva (ceppo alto-produttore)
- stabilità genetica (bassa frequenza di mutazione)

Le fasi della procedura di *scale-up* /1

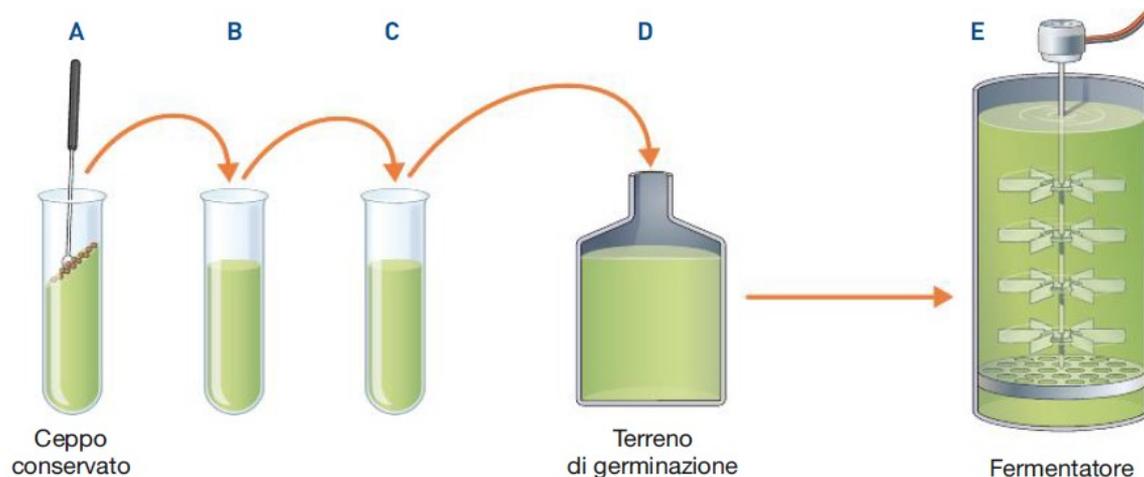
Procedura di ***scale-up***: trasferimento della **coltura-starter** da un microambiente (provetta) ai contenitori industriali (migliaia di litri). Si articola in fasi successive nelle quali l'inoculo è trasferito in contenitori di volume progressivamente maggiore, intervallate da **periodi di incubazione** in condizioni controllate.

1. Una quota è prelevata dal terreno di conservazione e seminata su *slant* e incubata



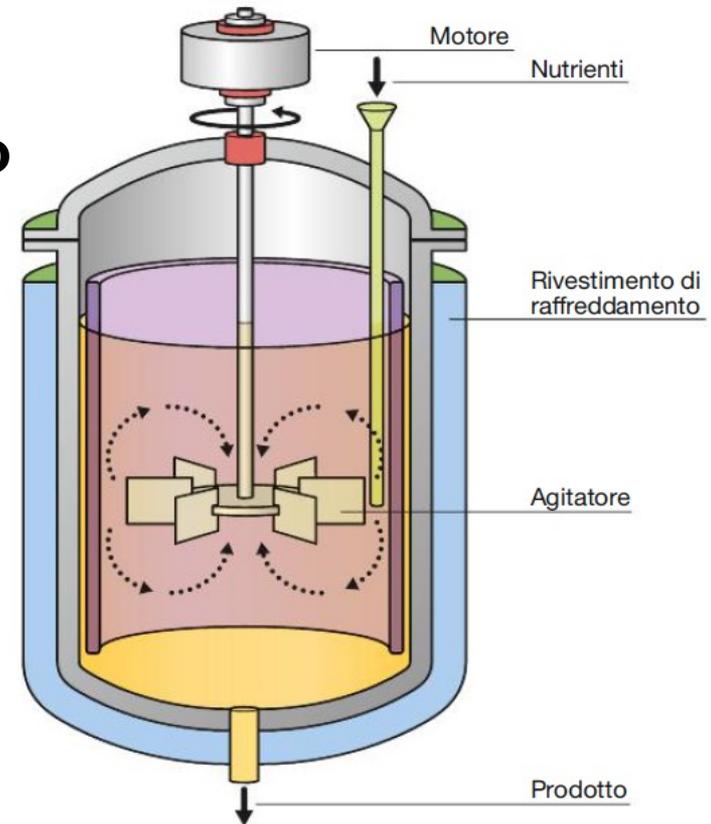
Le fasi della procedura di *scale-up* /2

2. La coltura è trasferita dallo *slant* in provette di terreno liquido (riproduzione più veloce); quando la concentrazione di cellule aumenta, viene trasferita in contenitori progressivamente più capienti.
3. La brodocoltura è travasata in minifermentatori in condizioni operative equivalenti al fermentatore finale
4. Trasferimento al bioreattore di produzione



I fermentatori o bioreattori /1

- **Grandi dimensioni**
- **Acciaio inossidabile elettrolucidato**
- **Forma cilindrica** con aperture di ingresso e di uscita asservite da valvole
- Sistema di **agitazione** meccanica o pneumatica
- Sistemi di **aerazione** (se destinati a trasformazioni aerobiche)
- Sistemi di **termostatazione**
- Manometri per il controllo della **pressione interna**
- **Controllo online** dei parametri di processo: temperatura, pH, ossigeno disciolto, velocità di agitazione, pressione interna, livello di schiuma, flusso di gas



I fermentatori o bioreattori /2

Classificazione in base alla tipologia costruttiva:

- **monofasico:** i costituenti del sistema di reazione sono tutti in fase acquosa e costituiscono una miscela omogenea
- **multifasico:** almeno un costituente è presente anche in fase solida o gassosa

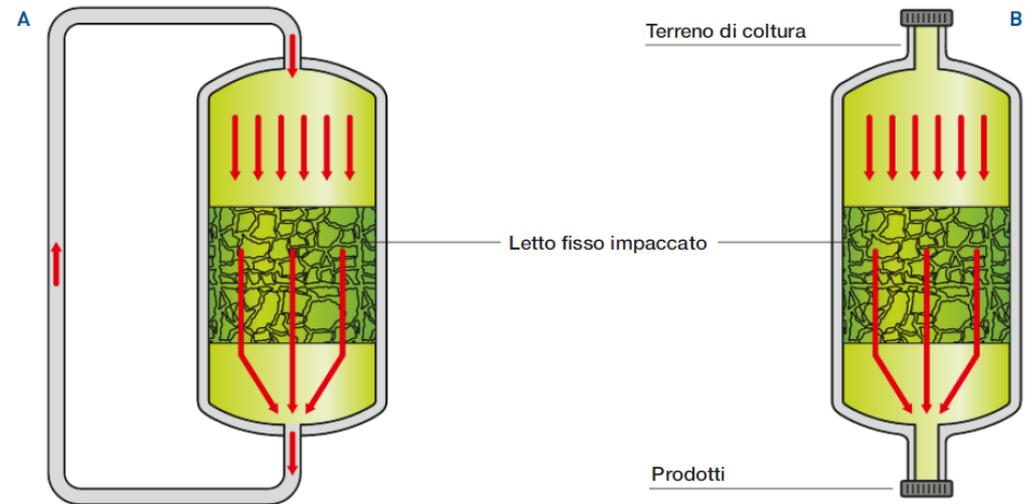
Bifasici (fase acquosa e fase solida):

- **a letto fisso:** colonna di materiale inerte sulla quale è stato immobilizzato il biocatalizzatore
- **a letto fluido:** la sospensione di particelle solide su cui è immobilizzato il biocatalizzatore sedimenta nella parte superiore del bioreattore, sospinta dal un flusso d'aria

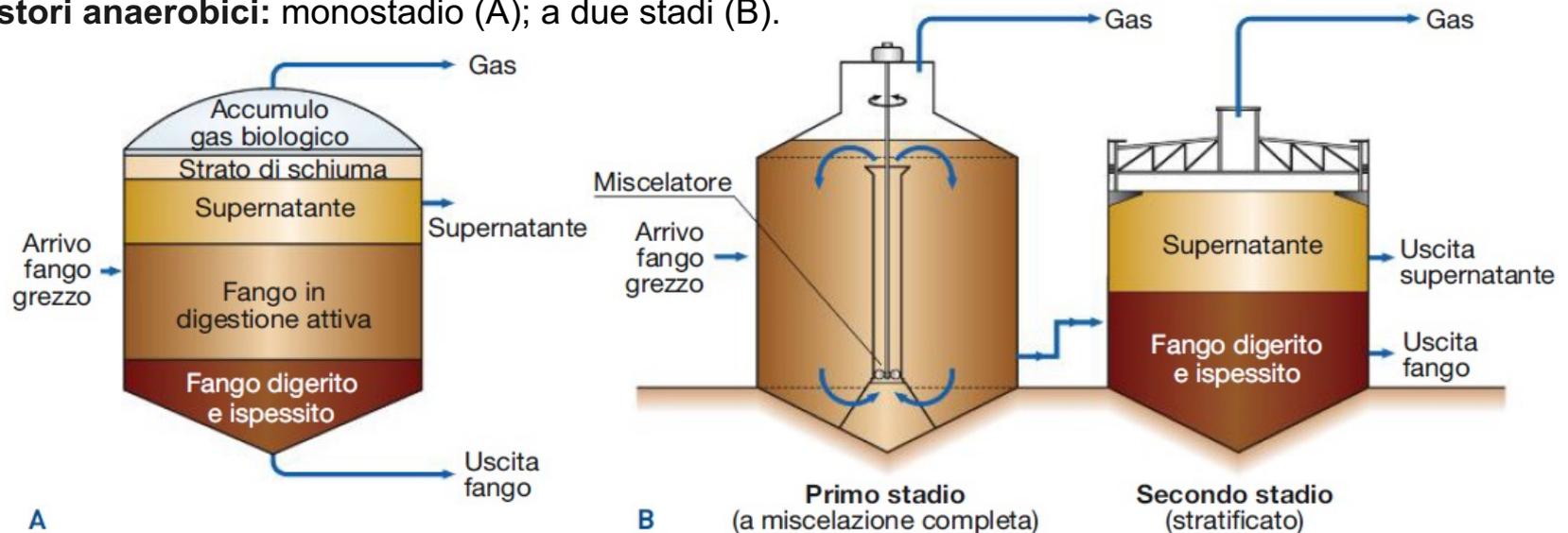
Reattore anaerobico o digestore: bioreattore trifasico (fase liquida, solida e gassosa), impiegato nel trattamento dei fanghi di depurazione e con produzione di biogas (es. metano).

I fermentatori o bioreattori /3

Reattore a letto fisso: a riciclo totale (A); a flusso continuo (B).



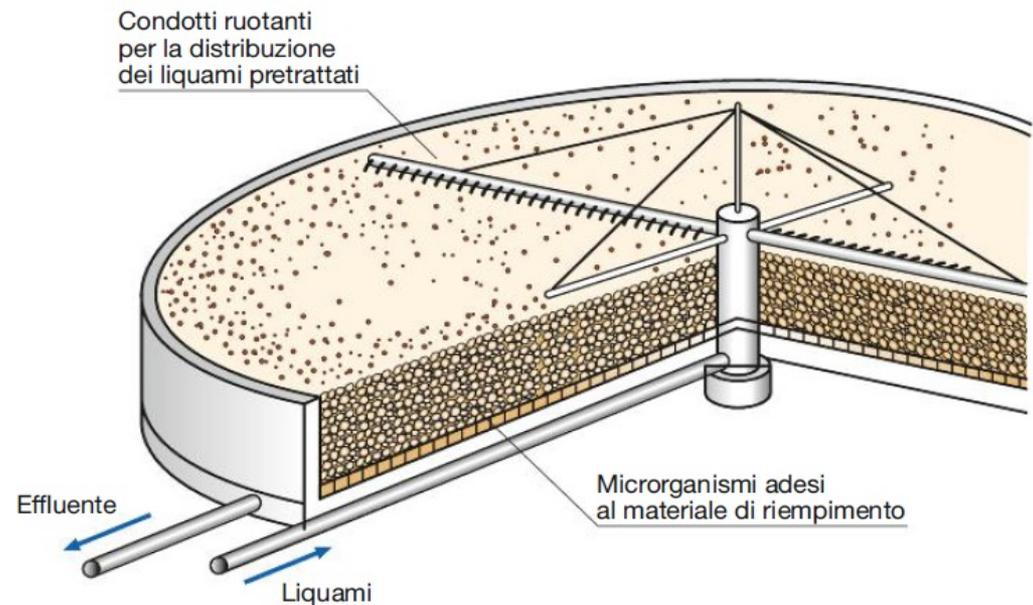
Digestori anaerobici: monostadio (A); a due stadi (B).



I fermentatori o bioreattori /4

Percolatore: bioreattore trifasico in cui il materiale inerte e poroso sul quale è immobilizzato il biocatalizzatore riempie una vasca aperta: su di essa è spruzzato il substrato liquido da trasformare. Tale substrato percola attraverso gli interstizi fra le particelle di materiale poroso in cui circola anche l'aria.

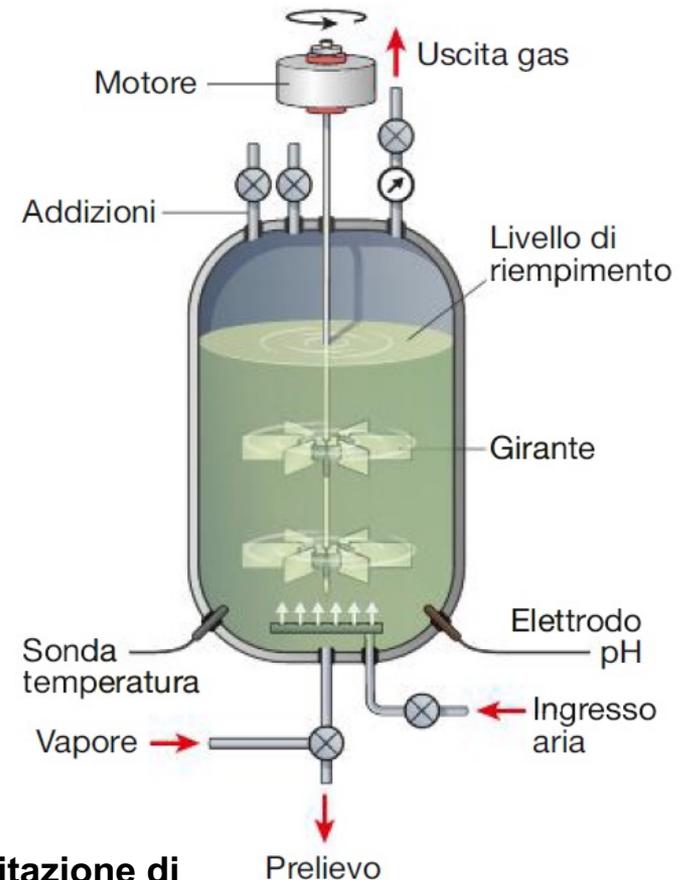
È impiegato nei processi di depurazione biologica aerobica delle acque reflue.



I fermentatori o bioreattori /5

Classificazione in base al sistema di aerazione e di agitazione:

1. Ad **azione meccanica**: l'aria è immessa nell'asse di rotazione cavo e fuoriesce dalle pale che svolgono un'azione meccanica di rimescolamento (es. **STR** - *stirred tank reactor*)

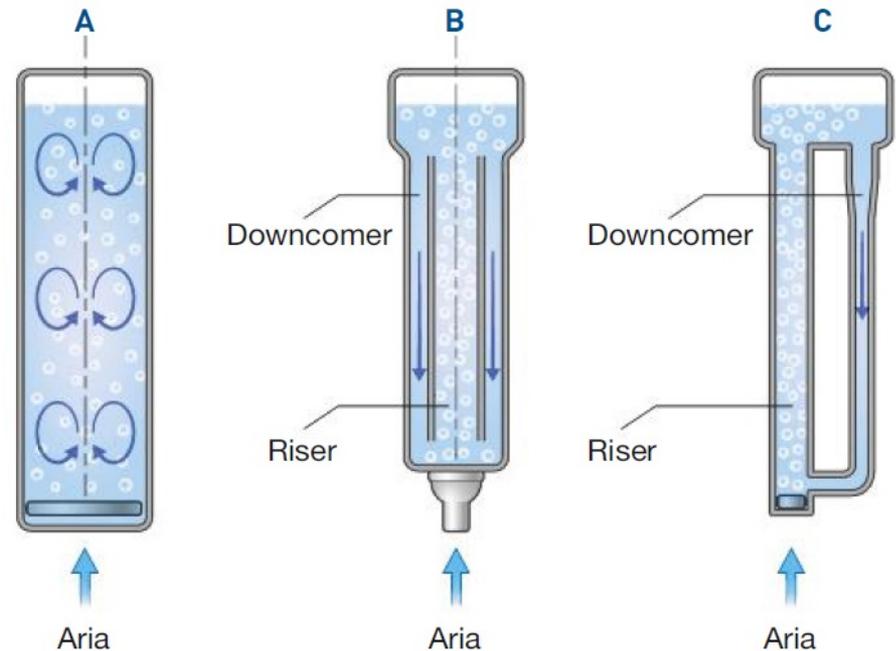


Fermentatore STR con agitazione di tipo meccanico.

I fermentatori o bioreattori /6

2. Ad **agitazione pneumatica** o **air-lift**: l'aria svolge aerazione e rimescolamento della brodocoltura.

- *bubble column*: la colonna di liquido è messa in agitazione dall'immissione e distribuzione di aria pressurizzata dalla base
- *air-lift*: l'aria è immessa alla base del fermentatore ad elevata pressione, per favorire gli scambi di ossigeno, l'agitazione di tutta la brodocoltura e il suo continuo ricircolo.



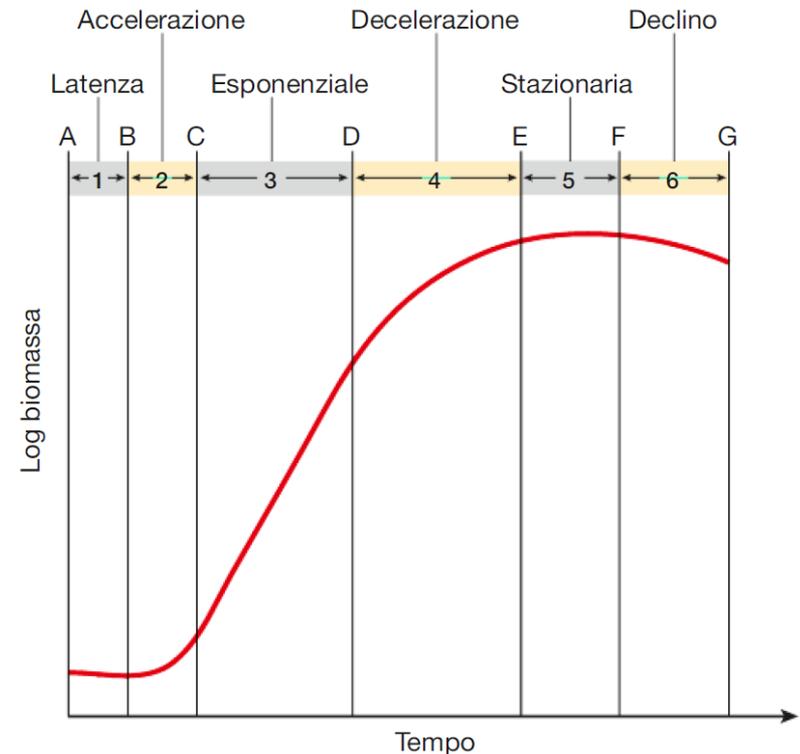
Schema di fermentatori ad agitazione pneumatica:

Bubble column (A); Air-lift a circolazione interna (B); Air-lift a circolazione esterna (C).

La curva di crescita microbica

Fasi della curva di crescita microbica:

- 1. Latenza:** adattamento dei microrganismi all'ambiente
- 2. Accelerazione:** la popolazione inizia lo sviluppo e il metabolismo raggiunge un equilibrio funzionale
- 3. Crescita esponenziale:** la quantità di biomassa raddoppia nell'unità di tempo
- 4. Decelerazione**
- 5. Crescita stazionaria**
- 6. Declino:** esaurimento delle riserve energetiche dei microrganismi. Può essere seguita da lisi cellulare



La classificazione delle fermentazioni su base cinetica

Tipo I: prodotti semplici che derivano direttamente dal metabolismo energetico primario

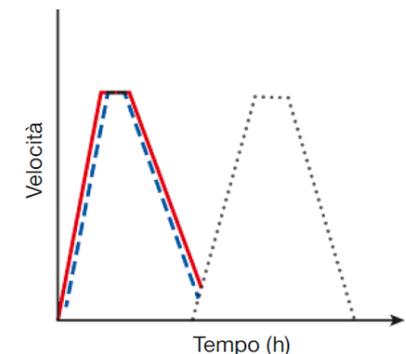
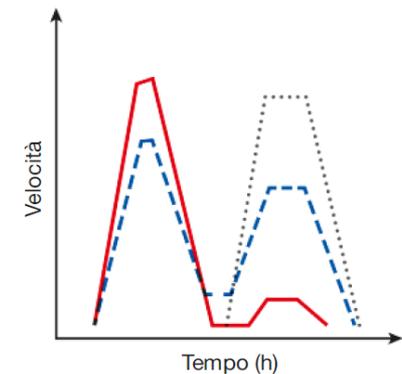
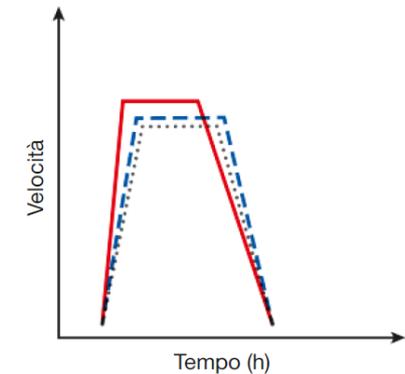
Tipo II:

- Prodotti di complessità intermedia che derivano indirettamente dal metabolismo energetico

Tipo III:

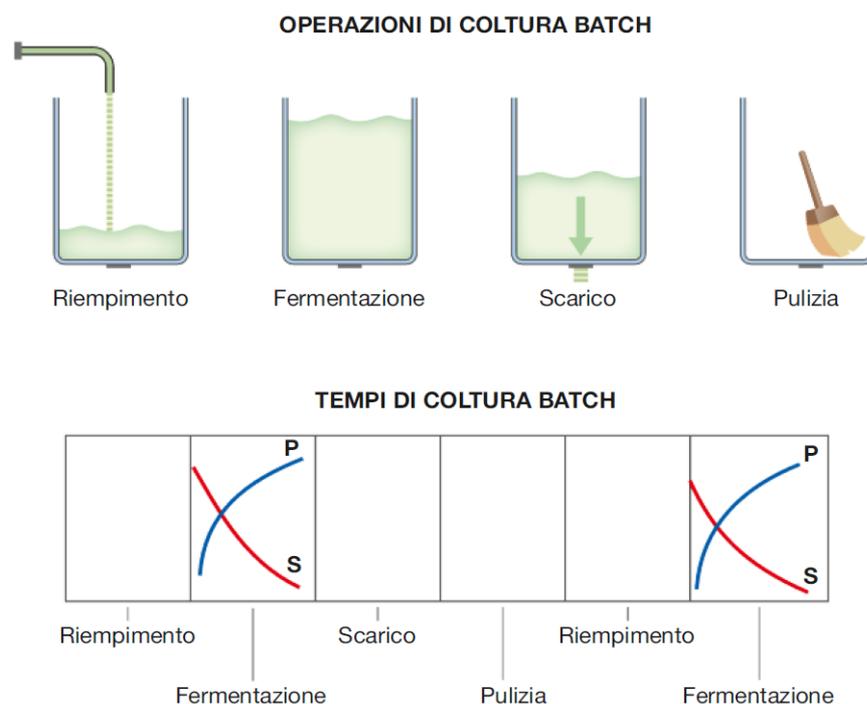
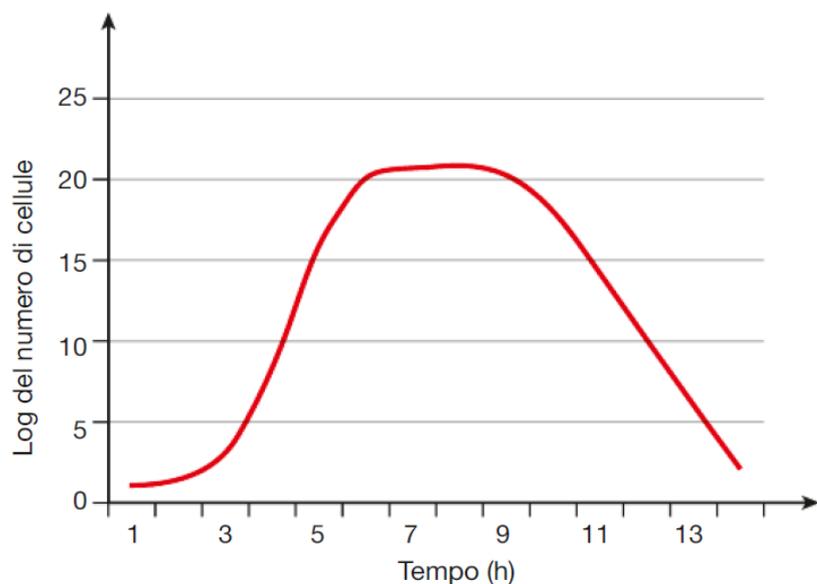
- prodotti *di biosintesi più complessi derivanti* dal metabolismo secondario

Velocità specifica di crescita —; Velocità specifica di consumo di substrato ---; Velocità specifica di formazione del prodotto ····).



Processi *batch*, continui, *fed-batch* /1

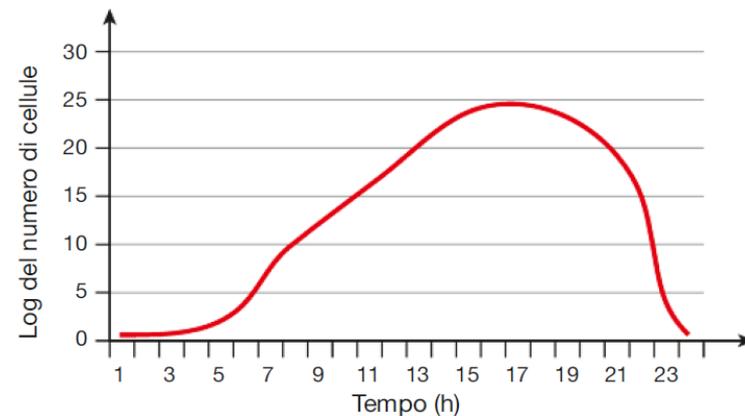
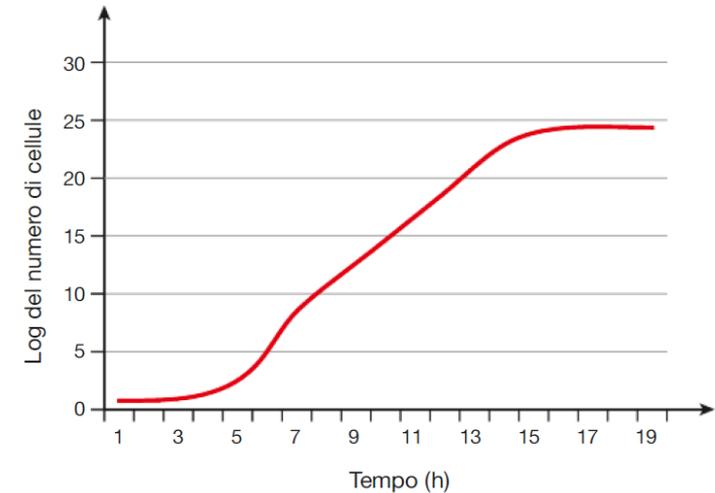
La **coltura discontinua** o **batch** prevede il progressivo *scale-up* dell'inoculo iniziale fino alla semina nel reattore di produzione, il mantenimento della coltura per un tempo prefissato e calcolato per la massima resa produttiva, l'interruzione del processo e il recupero dei prodotti.



Processi *batch*, continui, *fed-batch* /2

I processi **in continuo** consentono lo studio cinetico dello sviluppo cellulare e sono condotti rifornendo il sistema di sostanze nutritive e sottraendo prodotto, così da mantenere costante il volume della biomassa.

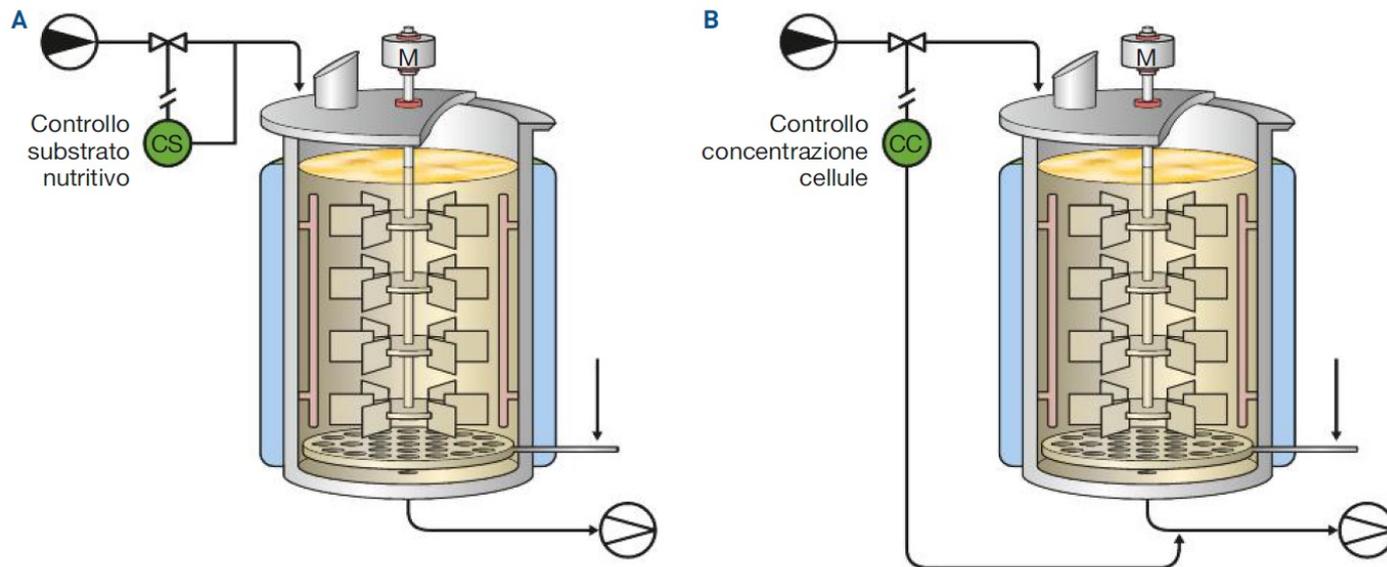
In un sistema **semicontinuo** o ***fed-batch*** il terreno di coltura è introdotto prima in quantità limitata e poi, raggiunta la fase logaritmica della curva di accrescimento, con un flusso costante senza che venga scaricato materiale. Segue lo svuotamento totale o parziale.



Chemostato e turbidostato

I fermentatori a **coltura continua** possono essere di due tipi:

- **Chemostato:** avvengono controlli *in ingresso* (fermentatore a controllo esterno).
- **Turbidostato:** si misura la *torbidità del flusso in uscita*, che è direttamente proporzionale alla concentrazione della biomassa cellulare.



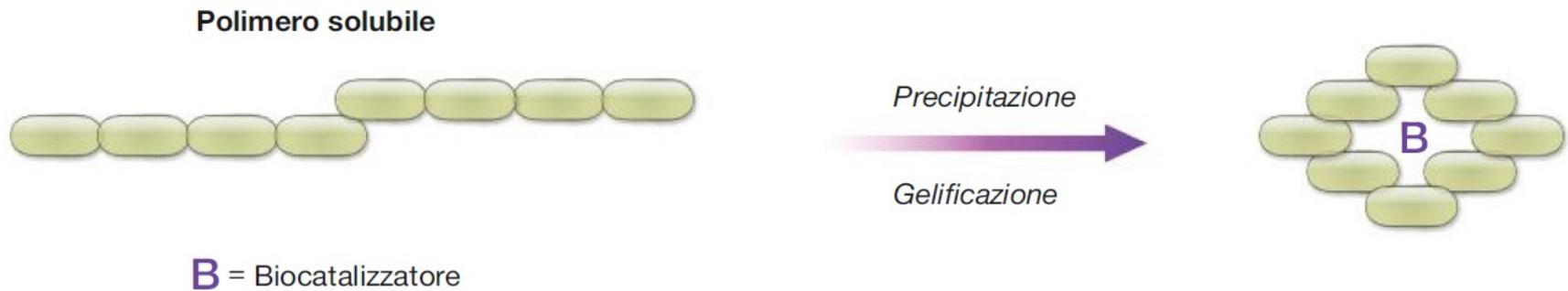
Struttura di un **chemostato** (A) e di un **turbidostato** (B).

L'immobilizzazione dei biocatalizzatori

L'**immobilizzazione** è una tecnica che permette di disporre di **biocatalizzatori** con elevata stabilità e di facile impiego.

Consiste nel confinare una cellula o un enzima in superficie o all'interno di un supporto solido o semisolido per bloccarne la mobilità, senza interferire con la sua attività metabolica o catalitica.

Si utilizzano tecniche diverse, basate su metodi sia chimici che fisici, a seconda che si tratti di cellule o enzimi.



Principio dell'immobilizzazione di biocatalizzatori per **intrappolamento**.

Il recupero dei prodotti

Al termine di un processo mediato da microrganismi si deve procedere alla separazione della biomassa dal brodo di coltura residuo per **centrifugazione** o per **filtrazione**.

- Obiettivo **recupero della biomassa**: rimane come prodotto residuo da eliminare il terreno di coltura esaurito, con separazione e lavaggio.
- Obiettivo **recupero di metaboliti**: è la biomassa a essere eliminata, per procedere poi alla separazione e purificazione dal filtrato colturale (se si tratta di *metaboliti endocellulari* occorre rompere degli involucri cellulari).

