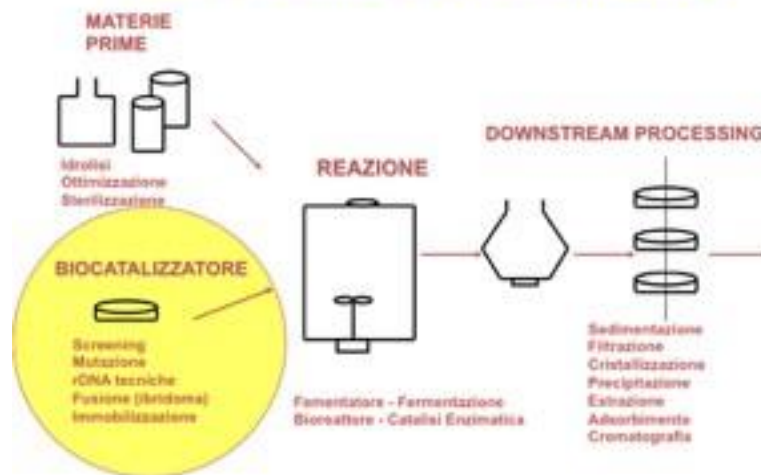


LEZIONE 1

PRINCIPALI COMPONENTI E OPERAZIONI DEL PROCESSO BIOTECNOLOGICO INDUSTRIALE



In questo corso ci si occupa di ciò che riguarda la fase di upstream e di reazione. Tutto ciò che accade prima (upstream) serve alla preparazione della reazione; mentre ciò che accade dopo (downstream) serve a separare i prodotti ottenuti dalla reazione per ottenere così il prodotto finale.

Biocatalizzatore: sostanza presente negli organismi viventi, che agisce da catalizzatore organico favorendo le reazioni del metabolismo; sono considerati biocatalizzatori gli ormoni, le vitamine e soprattutto gli enzimi. Possono agire da biocatalizzatori anche alcuni batteri, che perciò vengono impiegati per la produzione di composti chimici nell'industria farmaceutica e per la degradazione di sostanze inquinanti.

Possiamo avere due tipologie di biocatalizzatori:

- Microrganismi o cellule: come lieviti, muffe, batteri, cellule di mammifero, cellule di insetto. Quando questi fungono da biocatalizzatore, la reazione che avviene all'interno del reattore viene definita una fermentazione.
- Enzimi: in questo caso la reazione che avviene nel reattore è definita una bioconversione o biocatalisi.

Fermentazione:

- In biochimica è una via metabolica di produzione di energia in cui una sostanza organica è utilizzata come accettore di elettroni in condizioni anaerobiche. La differenza tra fermentazione e respirazione è che la prima ha come accettore finale degli elettroni una qualsiasi molecola organica, mentre la respirazione ha come accettore finale l'ossigeno.
- Nei processi industriali è un processo produttivo che prevede la crescita dei microrganismi o delle cellule che catalizzano il processo ed è un processo autocatalitico. È storicamente l'area più importante in biotecnologia. C'è stato un estensivo sviluppo con nuovi prodotti come farmaci, solventi, prodotti alimentari, etc. Questo include anche la ricerca di differenti design di fermentazione per ottimizzare il processo.

Bioconversione o biocatalisi: nuove tecnologie come la "mutagenesi sito-diretta" e il "DNA-shuffling" permettono di sviluppare nuovi enzimi fatti su misura per specifiche applicazioni.

Parametri che determinano la scelta del biocatalizzatore:

- Finalità del processo
- Tipologia dell'impianto — influisce sui costi dell'impianto stesso e quindi del processo.
- Condizioni sperimentali del processo — parametri chimico-fisici da controllare durante il processo.
- Produttività — quantità di prodotto ottenuto / tempo di durata del processo. È uno dei parametri più importanti di cui si tiene conto nei processi industriali.
- Sostenibilità ambientale

Esempio:

... Il lavaggio automatico della biancheria!

@finalità del processo	↳ Rimozione delle macchie (lipidi, proteine)
@tipologia dell'impianto	↳ lavatrice
@condizioni sperimentali del processo	↳ temperatura variabile, tensioattivi, alti valori di pH
@produttività	↳ %sporco rimosso/tempo di lavaggio
@sostenibilità ambientale	↳ minor uso possibile di detergenti

Nel caso di questo esempio, sono stati scelti e utilizzati come biocatalizzatori degli enzimi quali lipasi e proteasi, in quanto lo sporco nella biancheria è costituito principalmente da lipidi e proteine. Quindi questo mix di enzimi è stato aggiunto ai detergenti utilizzati per fare il bucato. Fino agli anni 80' questi enzimi sono stati isolati da organismi ipertermofili, questo perché servivano degli enzimi termoresistenti. Altre caratteristiche è che devono resistere a valori di pH alti e alla denaturazione da parte dei detergenti. Tutto questo ovviamente deve essere accompagnato da un'elevata efficienza catalitica, in modo che una minore quantità di enzimi debba essere inserita nel detergente, riducendone così il costo.

Verso l'inizio degli anni 90' per questioni di costo sia per l'utilizzo di acqua che in termini energetici, furono utilizzate temperature di lavaggio più basse (temperatura ambiente). Per questo motivo gli enzimi utilizzati nei detergenti furono estratti da microorganismi psicrofili (0-15°C) e non più termofili.

Per i **bioprocessi innovativi** può essere sfruttata la biodiversità dei microrganismi. Ovvero, grazie a varie tecniche si può risalire al gene che va a codificare per l'enzima che ha delle caratteristiche di mio interesse per uno specifico processo.

Tra queste tecniche ritroviamo:

- Screening: questo se non ho il microrganismo o l'enzima con le caratteristiche che mi servono.
- Mutazione/selezione: se ho un microrganismo o un enzima con le caratteristiche richieste. Può essere applicato sia su un microrganismo che su un enzima. Questo ciclo è costituito da due fasi; nella prima viene applicata una mutagenesi random sul microrganismo o sull'enzima, si genera così una collezione di mutanti random sulla quale viene applicata una selezione (seconda fase) scegliendo gli individui idonei al processo.
- Tecniche di DNA ricombinante: se conosco la sequenza del gene o la struttura della proteina.
- Ingegneria metabolica: genesi di nuovi organismi con proprietà metaboliche specifiche. In pratica si agisce sul genoma di questi organismi.

Conservazione dei biocatalizzatori: esistono diversi metodi. Ciascun metodo deve assicurare la vitalità del biocatalizzatore nel tempo di conservazione; inoltre deve assicurare la stabilità

genetica del biocatalizzatore, questo perché anche durante la conservazione il metabolismo non è mai completamente arrestato, ma è semplicemente rallentato. Per questo motivo il biocatalizzatore potrebbe essere danneggiato durante il periodo di conservazione.

I metodi di conservazione sono:

- liofilizzazione, ovvero il campione viene congelato e fatto passare in una pompa da vuoto in modo da privarlo dell'acqua liquida.
- criopreservazione, una conservazione a temperature tra -20 e -80°C per i batteri; a -196°C in azoto liquido le cellule eucariotiche. In entrambi i casi vengono usati dei crioprotettivi, quali glicerolo e DMSO.

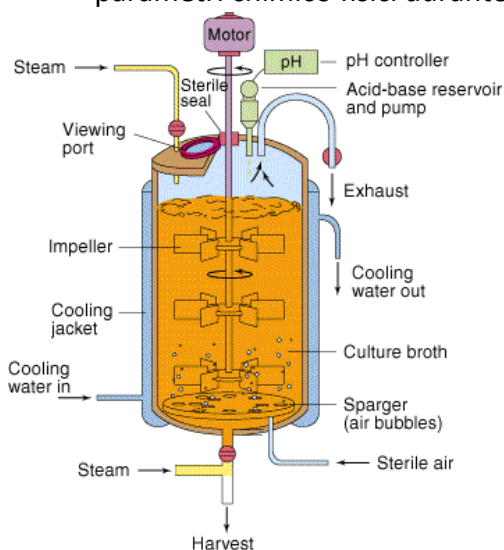
Bioreattore: apparecchio all'interno del quale avviene una reazione di fermentazione o biocatalisi.

- **Beuta:** è un recipiente di vetro in cui è possibile immettere un terreno di coltura. Essendo loro di vetro, sarà possibile sterilizzarle in autoclave, il terreno quindi risulterà essere asettico. È possibile registrare solo alcuni parametri (pH, concentrazione substrati, ecc....) all'inizio e alla fine del processo ma non è possibile controllarli. Nella seguente immagine sono visibili due beute di diversa dimensione, entrambe contengono un terreno di coltura liquido e sono tappate con della garza contenente cotone che permette di mantenere l'ambiente interno alla beuta sterile e contemporaneamente permette lo scambio di ossigeno. La crescita microbica parte quando nella beuta sterilizzata viene immesso un preinoculo dall'esterno (starter), questo potrà grazie ai nutrienti nel terreno di coltura, crescere. Dopo si pone la beuta su di una piastra agitante in modo tale da rendere più efficaci gli scambi gassosi tra il liquido e la colonna d'aria che si trova al di sopra del liquido.



- **Fermentatore (automatizzato):** è un recipiente che è stato ottimizzato e progettato da ingegneri chimici in modo tale che esso possa massimizzare l'omogeneità della brodocoltura e gli scambi gassosi. Il recipiente inoltre, può ospitare dei sensori che servono a monitorare continuamente delle fluttuazioni di parametri chimico fisici durante la crescita: pH, temperatura, ossigenazione inviati ad un software

durante tutto il processo. Inoltre, permette di intervenire su questi parametri, se i valori si modificano in maniera significativa mediante dei sistemi "attuatori" che quindi permettono di riportare il sistema in condizioni ottimali.



Distinzione

BIOREATTORE: ambiente **controllato** in cui si allestisce una reazione biochimica

FERMENTATORE: un bioreattore nel quale si realizza una fermentazione

Scala da laboratorio	1-10L
Scala pilota	50-1000L
Scala industriale	100,000-300,000 L

Queste tre scale sono relative alle dimensioni dei fermentatori. Ad es. in un laboratorio i fermentatori hanno una capacità di 1-10L. **N.B.:** esistono anche i microfermentatori (mL).

Fermentatori

L'obiettivo di qualsiasi fermentatore è di ottimizzare la crescita dell'organismo e/o la formazione di un prodotto da parte di un organismo. Si distinguono due tipi di fermentatori.

- 1) **Sistemi non asetti:** non è necessario operare con colture pure di microrganismi. Sono i sistemi più diffusi a livello mondiale, tuttavia nel nostro ambito vengono utilizzati unicamente i sistemi asetti.
- 2) **Sistemi asetti:** sono usati per la produzione di composti come antibiotici, amminoacidi, polisaccaridi ecc...

Un fermentatore deve quindi:

- escludere l'ingresso di organismi contaminanti
- contenere gli organismi desiderati
- mantenere il volume della coltura costante
- mantenere il livello di ossigeno disciolto sopra valori critici di aerazione e agitazione per organismi aerobici
- controllare parametri come temperatura e pH
- consentire una buona miscelazione della coltura
- I materiali che sono in contatto con le soluzioni che entrano nel fermentatore o con la coltura devono:
 - essere resistenti alla corrosione
 - essere non-tossici perché la dissoluzione del materiale non inibisca la crescita
 - sopportare ripetuti cicli di sterilizzazione ad alta pressione
- Il sistema di agitazione, le porte d'ingresso devono essere sufficientemente rigidi da non essere deformati o rotti per lo stress meccanico.
- L'ispezione visiva del mezzo e della coltura è vantaggiosa, per cui se possibile dovrebbero essere usati materiali trasparenti.

N.B.: date queste caratteristiche possiamo vedere che il vetro pyrex (per fermentatori piccoli) e una particolare tipologia di acciaio inox (per fermentatori dai 7L in poi) sono dei materiali ideali per la costruzione di fermentatori. Dato però che non è possibile vedere oltre l'acciaio inox, i fermentatori possiedono degli oblò che permettono di vedere al loro interno la coltura in fermentazione.