

Biotecnologie Microbiche Industriali e Ambientali - Modulo II

▪ Contatti Docente

Nome: Pietro Altimari; Ufficio: Dipartimento di Chimica, Ed. Cannizzaro, stanza C.I.11 (secondo piano)

Email: pietro.altimari@uniroma1.it

▪ Modalità di esame

Colloquio orale sulle tematiche oggetto del corso attraverso analisi di un problema proposto dal docente.

▪ Modalità di svolgimento e orario delle lezioni

Modalità di svolgimento: in presenza. Le lezioni saranno svolte attraverso presentazioni ppt e/o con il docente che illustra scrivendo alla lavagna (o su slide)

Martedì 9.00 - 11.00; Mercoledì 9.00 - 11.00;

▪ Materiale per lo studio

Dispense e slide fornite dal docente; Testi:

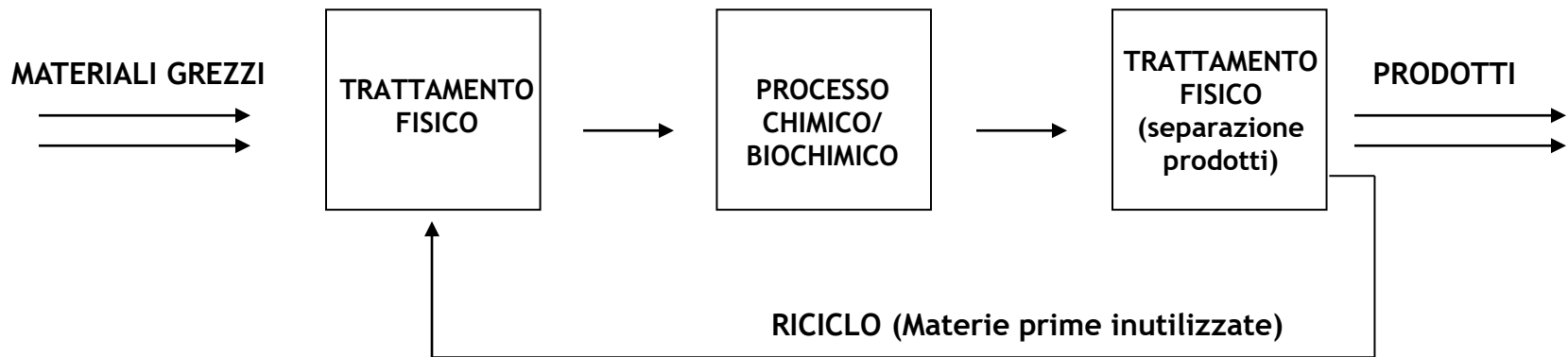
Wei-Shou Hu, Engineering Principles in Biotechnology, Wiley, 2017

J.E. Bailey, D.F. Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, 1986

PROCESSI INDUSTRIALI CHIMICI E BIOCHIMICI

Obiettivo di ogni **processo chimico/biochimico** industriale è la sintesi di un prodotto desiderato (bene materiale o servizio) attraverso la trasformazione (reazioni chimiche) di materie prime.

TIPICO PROCESSO CHIMICO/BIOCHIMICO



Processo chimico: viene realizzato il contatto tra materie prime (reagenti) e sono imposte le condizioni operative (e.g. temperatura, pressione, presenza di un catalizzatore) che rendono possibile lo svolgimento della reazione.

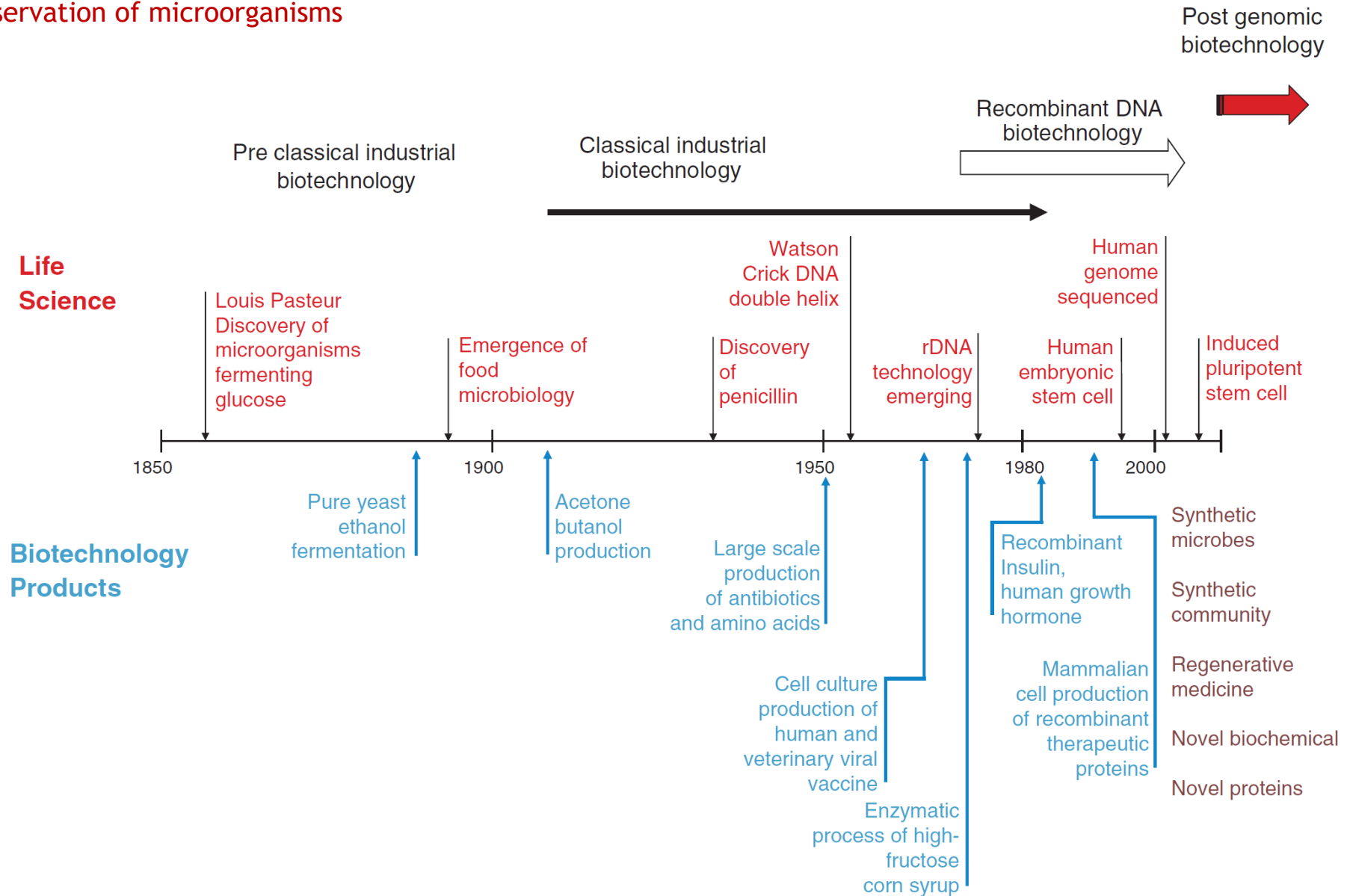
Processo biochimico: le reazioni di trasformazione delle materie prime sono direttamente condotte in un microorganismo, oppure in assenza di microorganismi utilizzando i prodotti del metabolismo di un microorganismo (enzimi, DNA).

PROCESSI INDUSTRIALI BIOCHIMICI

- I processi biochimici utilizzano **cellule microbiche, vegetali o animali** e i materiali da esse derivati, come **enzimi o DNA**, per produrre prodotti di interesse industriale (farmaci, integratori alimentari, smaltimento di rifiuti).
- Negli ultimi due decenni, il fatturato derivante dalla implementazione su scala industriale dei processi biochimici è aumentato drasticamente. Tale crescita economica è stata raggiunta portando sì **scala industriale** importanti **innovazioni** raggiunte attraverso la ricerca sulla **scala di laboratorio**.
- Se l'innovazione è stata frequentemente il risultato della ricerca di biochimici, biologi, l'applicazione su scala industriale è stata resa possibile dalla **cooperazione di numerosi scienziati e ingegneri di diverse discipline**.
- Il successo di un progetto, di un team o addirittura un'azienda nel campo della biotecnologia spesso dipende dalle **capacità di scienziati e ingegneri di differenti aree di lavorare efficacemente insieme**.

PROCESSI INDUSTRIALI BIOCHIMICI: ALCUNI CENNI STORICI

Antoni van Leeuwenhoek (Delft, 1632-1723)
observation of microorganisms



PROCESSI INDUSTRIALI BIOCHIMICI: ALCUNI CENNI STORICI

- **1860** - **Louis Pasteur** scoprì che i microbi sono responsabili della produzione di acido lattico e della fermentazione etanolica dello zucchero, collegando direttamente metabolismo alla sintesi dei prodotti
- **(1860-1900)** - i microbi sono utilizzati in modo più mirato. Le maggiori applicazioni restano legate alla produzione di alimenti (fermentazione latte e vino). Questo periodo è considerato l'alba della microbiologia o microbiologia applicata.
- **(1900-1940)** - l'uso di microrganismi è stato esteso oltre alla **produzione di composti chimici**. **L'acido lattico** è stato prodotto per fermentazione con *Lactobacillus spp.* segnando l'inizio della fermentazione microbica industriale. Importanti applicazioni sono state la fermentazione dello zucchero in **acetone, etanolo e butanolo** mediante *Clostridium acetobutylicum*, e la produzione di **acido citrico** con *Aspergillus niger*.
- **1928** - **A. Fleming** scopre la **pennicillina**. La necessità di produrre elevate quantità di pennicillina porta allo sviluppo di sistemi di coltivazione in sospensione solido-liquido (**Colture in sospensioni solido-liquido**).
 - L'estrazione e purificazione della penicillina fu resa possibile intorno al 1939 da un gruppo di biochimici di Oxford guidati da Howard Florey (Nobel 1945)
 - La produzione su larga scala (1944) fu raggiunta grazie allo sviluppo e alla applicazione di sistemi di coltivazione in sospensione alla collaborazione di importanti aziende statunitensi (tra cui la Pfizer)

PROCESSI INDUSTRIALI BIOCHIMICI: ALCUNI CENNI STORICI

- **1940-1960** - Molti altri microorganismi sono stati isolati e impiegati per produrre amminoacidi e antibiotici. Sono stati fatti molti progressi tecnici nella progettazione dei bioreattori per migliorare il trasferimento di ossigeno, il controllo della sterilità e le prestazioni del processo.
- **1953** - **James Watson e Francis Crick scoprono la struttura del DNA.** I ricercatori acquisiscono una conoscenza di base della struttura e della biochimica del DNA e del suo ruolo nella genetica.
- **1973** - **Stanley Cohen and Herbert Boyer** dimostrano la possibilità di trasferire un segmento di DNA in un organismo ospite per la sua espressione. E' la nascita della tecnologia del DNA ricombinante che ha consentito di produrre una proteina umana in una cellula ospite, sia essa un batterio o una coltura di cellule umane o di criceto. Ci ha permesso di modificare la via metabolica di un organismo amplificando, eliminando o modificando un enzima nel percorso.
- Questa tecnologia ha anche stimolato molte startup finanziate da capitali di rischio come Genentech, Cetus e Biogen. Inizia così una nuova era di imprenditori guidati innovazione, formando le prime fasi della prossima fase di rapida espansione industriale biotecnologia. Utilizzando la tecnologia rDNA, Genentech ha prodotto insulina umana in *Escherichia coli* (insulina era precedentemente isolata dal pancreas di maiali, ma con un amminoacido differente rispetto a quella umana) e concesso in licenza da Eli Lilly Company nel 1981.

PROCESSI INDUSTRIALI BIOCHIMICI: OPERAZIONI

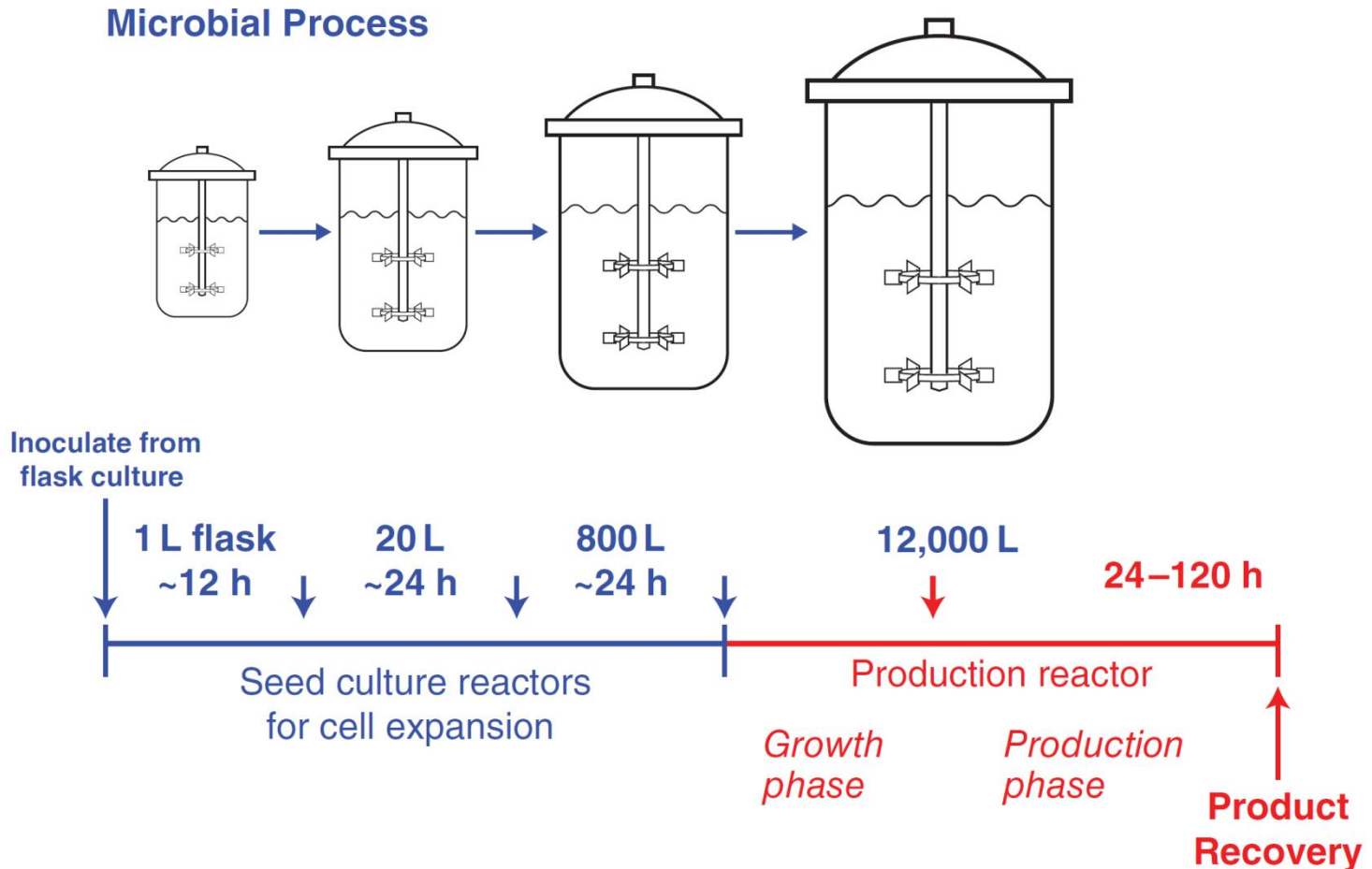
Il cuore di un processo biochimico industriale è rappresentato dalla coltivazione dei micorganismi responsabili della trasformazione delle materie prime trattate in prodotti di interesse industriale.

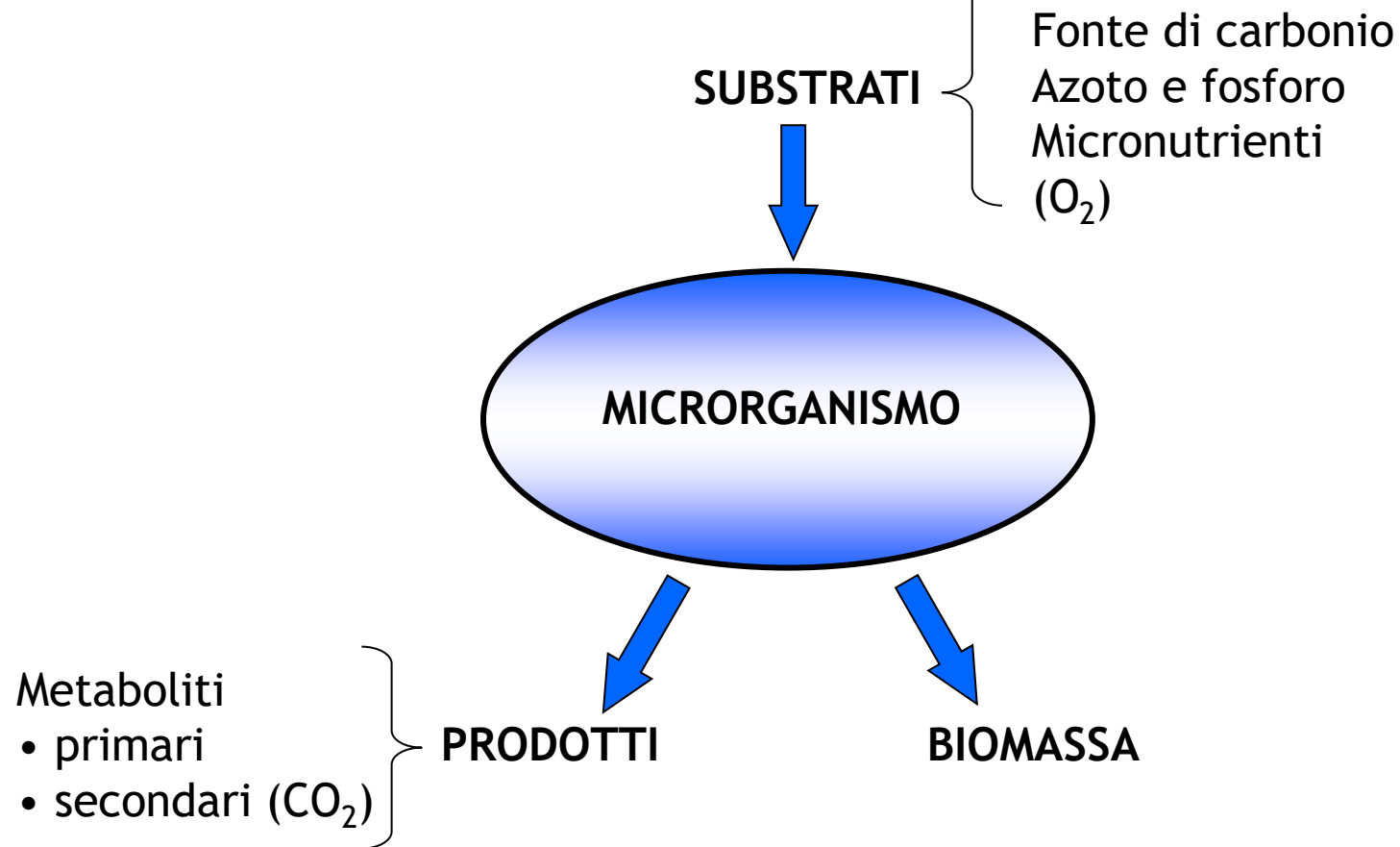
Operazioni unitarie di un processo biochimico industriale

- Sterilizzazione
- Preparazione delle materie prime/reagenti
- Preparazione dell'inoculo (cells expansion)
- Produzione in bioreattori
- Recupero
- Derivatizzazione
- Formulazione
- Impacchettamento

PREPARAZIONE INOCULO E PRODUZIONE IN BIOREATTORI

Una coltura iniziale viene trasferita in serie in volumi di coltura maggiori. Durante l'espansione seriale, il rapporto tra i volumi di colture consecutive varia tipicamente da 1:20 a 1:50 per le cellule microbiche. Durante la fase di espansione cellulare, le cellule vengono mantenute in a stato di rapida crescita.





CLASSIFICAZIONE PROCESSI

Produzione di metaboliti e/o biomassa: l'obiettivo è la sintesi di composti di interesse industriale (produzione di farmaci, alimentari).

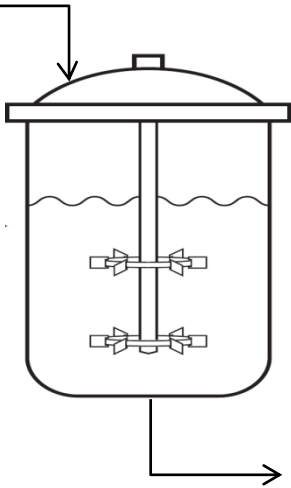
Biodegradazione di substrati: l'obiettivo centrale è degradare il substrato (smaltimento di rifiuti).

Processo integrato di produzione di biomassa e bio-degradazione di substrati: si punta allo sviluppo di un processo integrato che permetta contestualmente di biodegradare un substrato (smaltimento di un rifiuto) e produrre composti di interesse.

PROCESSI DI CRESCITA MICROBICA: PROGETTAZIONE E CONTROLLO

Ai fini della produzione di composti di interesse attraverso processi di crescita microbica risulta centrale predire come le variabili di stato del sistema variano al variare dei **parametri operativi** (equiv. **condizioni operative di funzionamento**) e dei **parametri di progetto**.

Nutrienti



Biomassa (cellule, metaboliti), nutrienti non consumati

Parametri operativi: quei parametri che possono essere modificati dall'operatore (e.g., portata di alimentazione, velocità agitatore) o a causa di eventi che sfuggono al controllo dell'operatore (disturbi).

Parametri di progetto: tutte le variabili che è necessario fissare per poter permettere la costruzione del bioreattore (geometria costruttiva, lunghezza, volume).

Variabili di stato: le variabili che definiscono lo stato del sistema di processo la cui determinazione è direttamente influenzata dai parametri operativi e di progetto (e.g., concentrazione di biomassa all'interno del reattore, concentrazione di substrato nel reattore, concentrazioni di metaboliti, temperatura).

Variabili di interesse: Si tratta delle variabili utilizzate per definire le prestazioni di un sistema di processo e sono tipicamente calcolate a partire dalle variabili di stato e dai parametri operativi e di progetto.

Esempio: In un bioreattore come quello in figura la concentrazione della biomassa all'interno del reattore (g/L) è una variabile di stato. Tuttavia la variabile di interesse è la produttività di biomassa pari al prodotto della portata (L/h) e della concentrazione di biomassa (g/L):

Concentrazione biomassa C_x [=] g/L
Portata volumetrica F [=] L/h

Produttività biomassa = $F \cdot C_x$ [=] g/h

PROCESSI DI CRESCITA MICROBICA

Problema di progetto: Determinazione dei parametri di progetto e dei parametri operativi che permettono di ottenere valori desiderati delle variabili di interesse.

Problema di controllo: come cambiare nel corso del tempo i valori dei parametri operativi in modo che le variabili di interesse assumano valori desiderati.

Rappresentazione ingresso uscita

Parametri operativi e di progetto: $u_1, u_2, u_3, \dots, u_M$

Variabili di stato: $x_1, x_2, x_3, \dots, x_N$



Per poter risolvere problemi di progetto e controllo è necessario determinare come variano nel tempo le variabili di stato al variare dei parametri operativi e di progetto.

Modello matematico di processo

$$X_i(t) = F_i(u_1, u_2, u_3, \dots, u_M, x_{01}, x_{02}, x_{03}, \dots, x_{0N})$$

t : tempo; x_{0i} = condizioni iniziali

PROCESSI DI CRESCITA MICROBICA

Modello matematico di processo

$X_i(t) = F_i(u_1, u_2, u_3, \dots, u_M, x_{01}, x_{02}, x_{03}, \dots, x_{0N})$ t : tempo; x_{0i} = condizioni iniziali

- I valori delle variabili di stato possono essere diversi per gli stessi valori dei parametri se si parte da condizioni iniziali diverse. Si pensi ad esempio ad un reattore in flusso con una corrente sterile di terreno fresco. A seconda di se il reattore sia stato inoculato o meno con la biomassa, si potrà osservare una produzione continua di biomassa.
- Le funzioni F_i sono generalmente costruite attraverso la risoluzione di equazioni algebriche e/o differenziali e in molti casi non è possibile derivare una soluzione analitica:

Sistema di N equazioni algebriche
nelle N incognite $x_1 \dots x_N$

$$G_1(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N) = 0$$

$$G_2(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N) = 0$$

.....

$$G_N(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N) = 0$$

Sistema di N equazioni nelle N
incognite $x_1 \dots x_N$

$$dx_1/dt = H_1(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N)$$

$$dx_2/dt = H_2(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N)$$

.....

$$dx_N/dt = H_N(u_1, \dots, u_M, x_1, \dots, x_N)$$

PROCESSI DI CRESCITA MICROBICA

Oltre a permettere la risoluzione di problemi di progetto e controllo, lo sviluppo di un modello matematico costituisce uno strumento fondamentale per lo studio dei meccanismi che governano la dinamica di un sistema di processo. A tal proposito, è possibile implementare il seguente algoritmo concettuale:

1.Elaborazione di una rappresentazione astratta (qualitativa) del sistema: il punto di partenza per lo sviluppo di un modello matematico è una analisi qualitativa dei dati sperimentali che descrivono come cambiano le variabili di stato al variare dei parametri. Sulla base di tale analisi si elabora una descrizione dei meccanismi che governano la dinamica del sistema (e.g. network di reazioni, fenomeni coinvolti)

2.Elaborazione di un modello matematico: tradurre la descrizione qualitativa elaborata per i meccanismi di processo in equazioni che permettano di determinare quantitativamente come cambiano le variabili di stato al variare dei parametri.

3.Verifica: Le equazioni conterranno nella maggior parte dei casi dei parametri non conosciuti (e.g. costanti cinetiche):

- Se esistono dei valori dei parametri fisicamente ammissibili tali per cui il modello è in grado di descrivere i dati sperimentali, allora la rappresentazione elaborata al punto 1 può ritenersi ragionevolmente corretta (almeno fino a quando non si trovino dati sperimentali che non possono essere predetti dal modello).
- Se il modello non descrive correttamente i dati sperimentali allora è necessario ritornare al punto 1 e rivedere la rappresentazione qualitativa dei meccanismi.

La modellazione dei sistemi biologici

- Modelli di crescita microbica

Che cos'è un modello?

- Un modello è una rappresentazione esemplificativa di un sistema reale, in cui vengono schematizzate le sole caratteristiche (chimiche, fisiche o biologiche) che interessa studiare, tramite una serie di regole (in generale un sistema di Equazioni Algebriche o Differenziali) che legano i parametri (grandezze non manipolabili), le variabili indipendenti (gli ingressi) e variabili dipendenti (le uscite).

Principio di massima parsimonia

Il principio generale che bisogna tener presente è che il modello migliore per rappresentare un sistema è quello che a parità di livello di accuratezza ha il numero minore di parametri

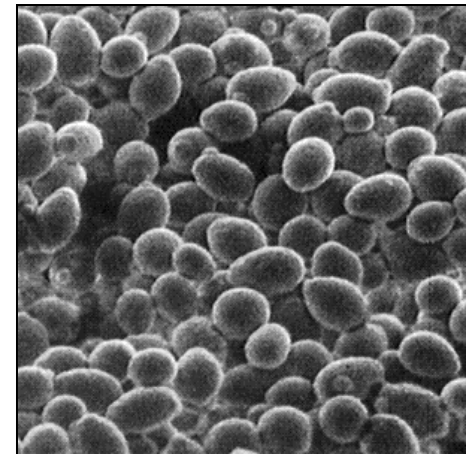
Modelli di crescita microbica

Modelli di crescita microbica ₁

Il processo di crescita microbica può manifestarsi in due modi a seconda della morfologia delle cellule considerate:

1) per gli organismi unicellulari la crescita della biomassa (massa di cellule viventi) è caratterizzata da un aumento del numero delle cellule presenti o dalla crescita della popolazione cellulare;

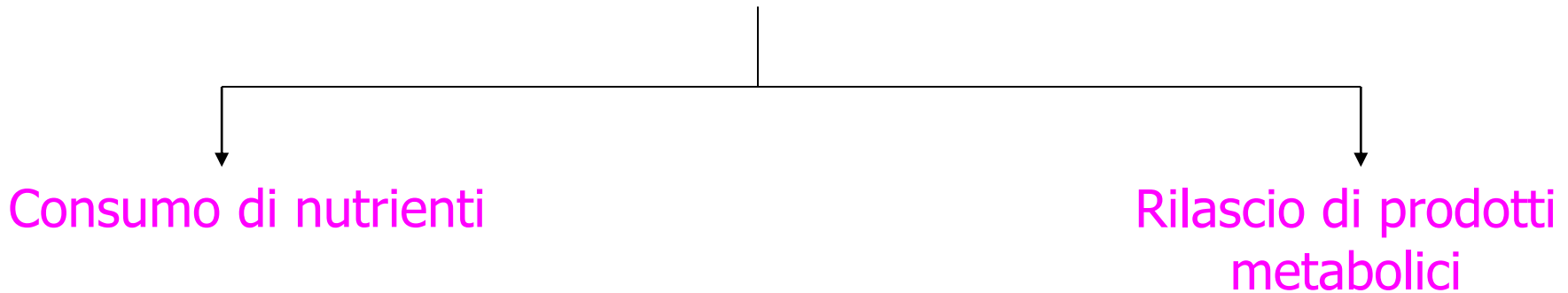
2) per organismi quali le muffe, la crescita cellulare è caratterizzata da un aumento delle dimensioni e della densità dei miceli, ma non necessariamente del loro numero.



Modelli di crescita microbica

2

La crescita cellulare è strettamente associata a



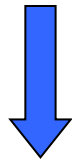
Le velocità con cui questi processi avvengono possono variare molto nel corso della crescita cellulare, anche se alcuni schemi generali di utilizzo del substrato e formazione del prodotto sono osservati con maggior frequenza.

L'analisi di questi schemi costituisce il passo preliminare per lo sviluppo di modelli tesi alla descrizione di schemi e meccanismi diversi di consumo del substrato e di bioproduzioni.

Modelli di crescita microbica 3

Nello studio delle cinetiche di crescita è necessario considerare la presenza di due sistemi interagenti:

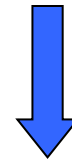
Popolazione cellulare



Ogni cellula è un complicato sistema multicomponente che spesso non è spazialmente omogeneo anche a livello della singola cellula

Occorre considerare anche l'eterogeneità *cellula-cellula*

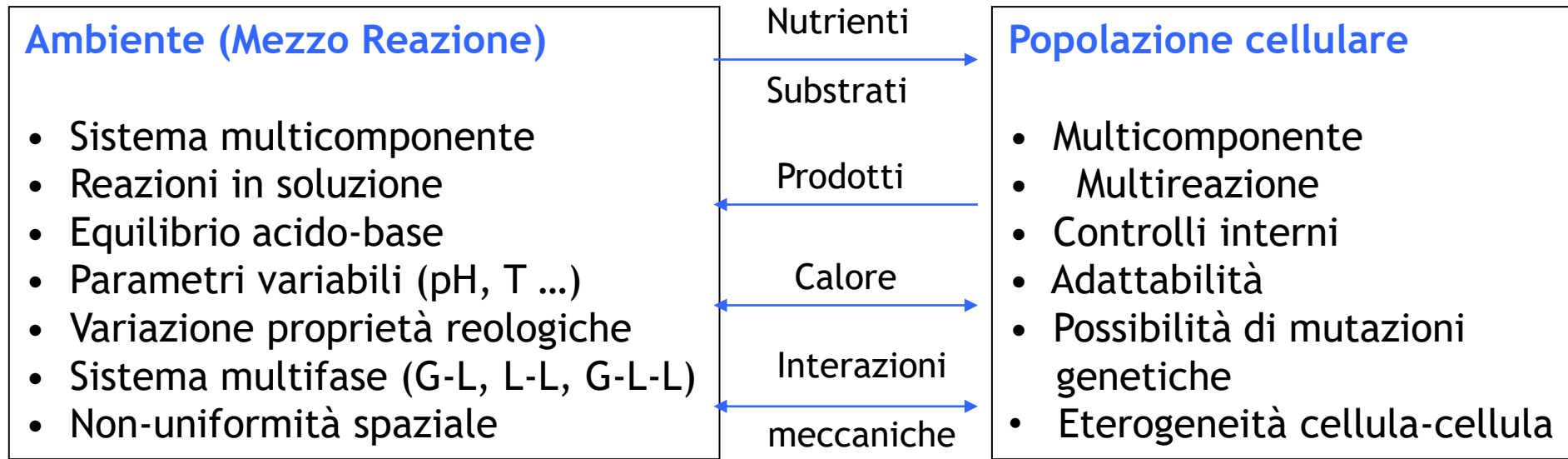
Mezzo di crescita



Il mezzo di reazione è un sistema multicomponente contenente tutti i nutrienti necessari per la crescita e in cui si accumulano vari prodotti terminali del metabolismo cellulare

Il mezzo di reazione è anche un sistema multifasico

Esempio: alcuni dei parametri, dei fenomeni e delle interazioni che possono influenzare il comportamento cinetico di popolazioni cellulari.

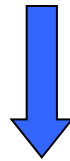


 Data la complessità del sistema, sono necessarie delle approssimazioni

- Approssimazione mezzo di crescita
- Approssimazione fase cellulare

Approssimazioni - mezzo di crescita

Il mezzo di crescita viene formulato in modo tale che tutti i componenti eccetto uno siano presenti a concentrazioni sufficientemente alte che la loro variazione non determini significative variazioni della velocità di crescita



un solo nutriente diventa **cineticamente-limitante** e quindi si considera solo la concentrazione di questo componente per determinare l'effetto della composizione del mezzo sulla cinetica di crescita

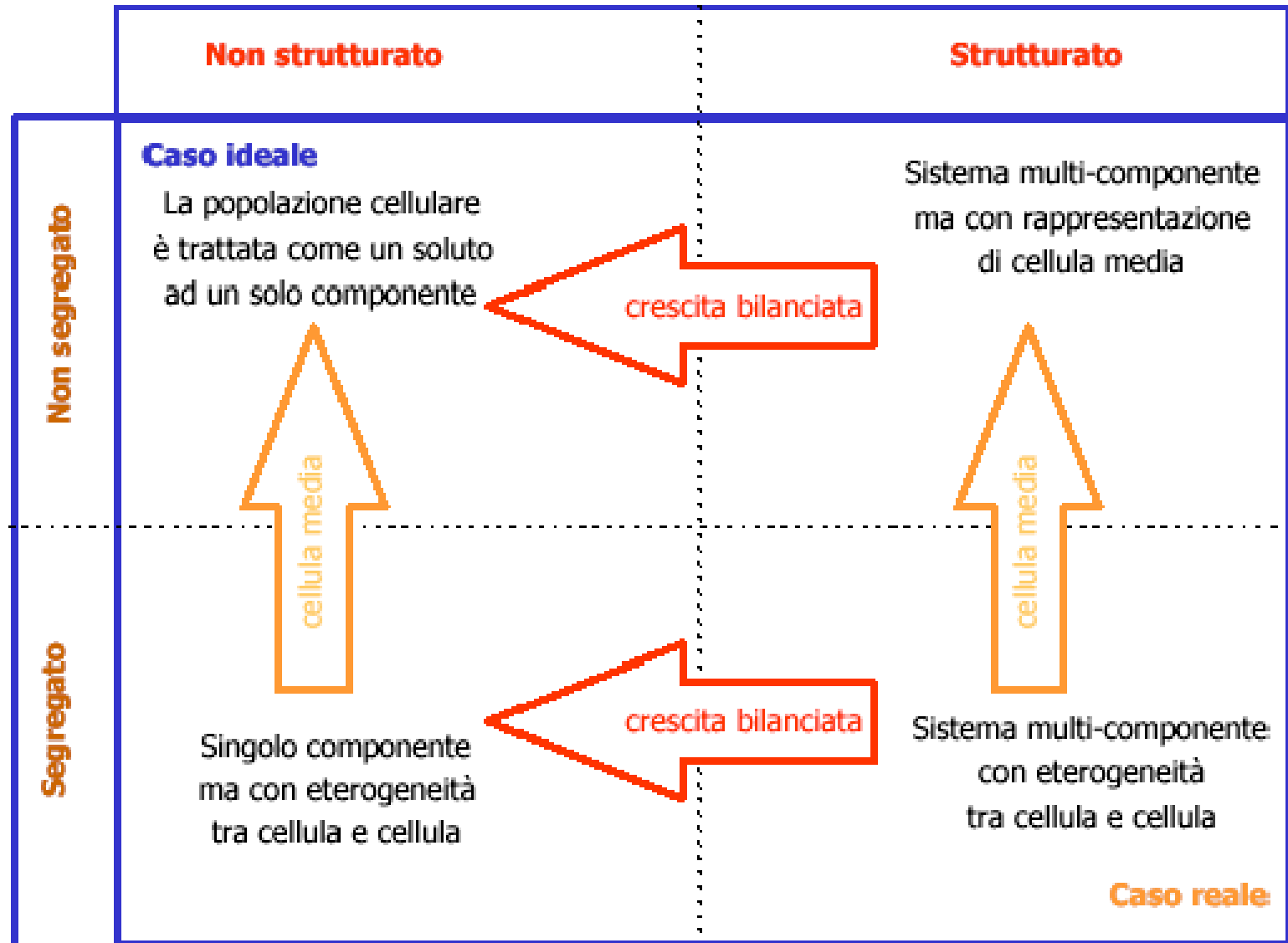
Di norma si mantengono costanti parametri operativi quali pH, T e concentrazione di O_2

Approssimazioni – fase cellulare 1

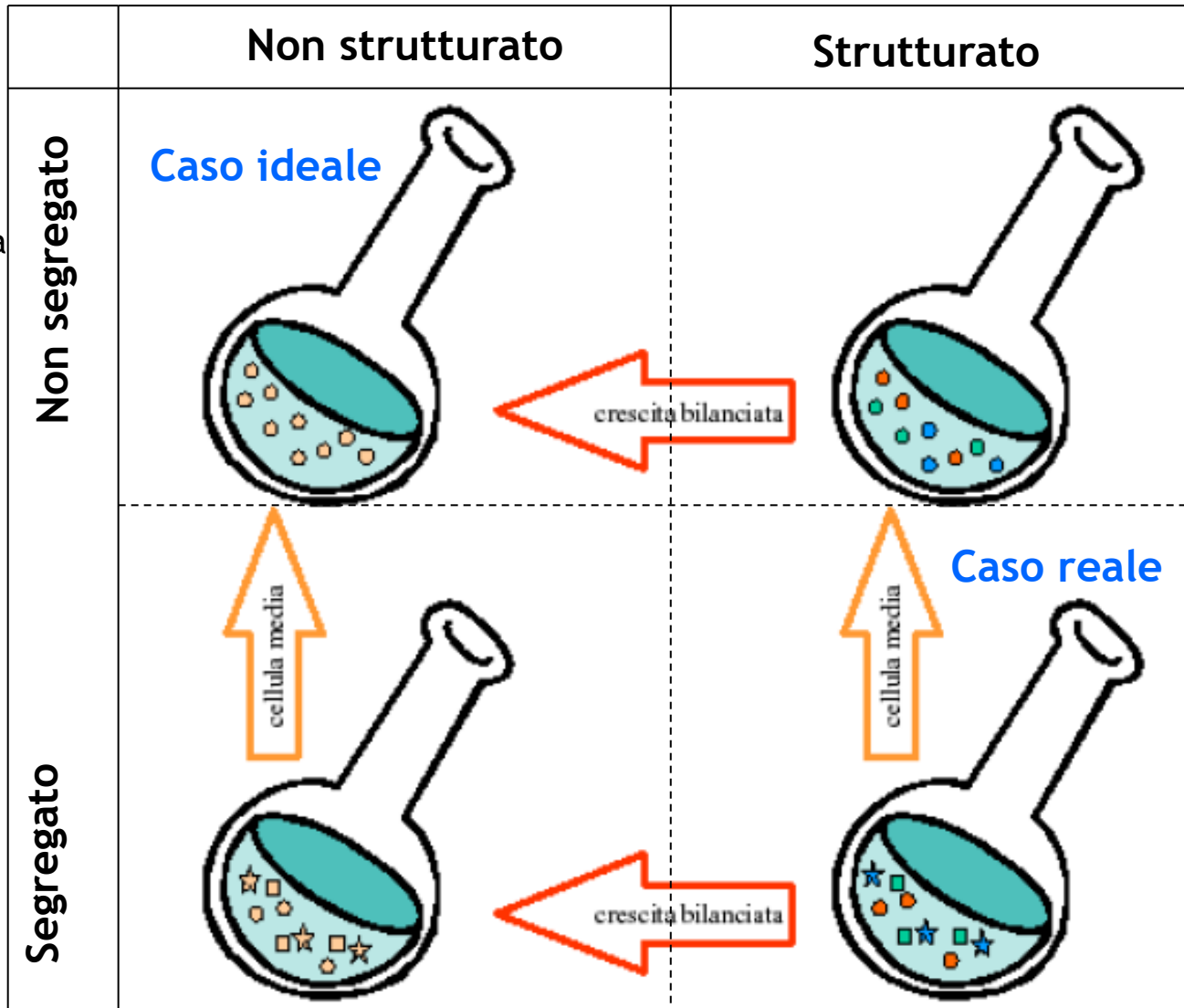
Si fanno due tipi di approssimazioni:

- in funzione del numero di componenti usati per descrivere la fase cellulare
 - MODELLI STRUTTURATI considerano la fase cellulare come un sistema multicomponente
 - MODELLI NON STRUTTURATI considerano la fase cellulare come un unico componente
- se le cellule sono considerate come un insieme eterogeneo di entità discrete o come una sorta di cellula media
 - MODELLI SEGREGATI considerano l'eterogeneità cellula-cellula
 - MODELLI NON SEGREGATI considerano una rappresentazione media della cellula

Approssimazioni - fase cellulare 2



Approssimazioni - fase cellulare 3



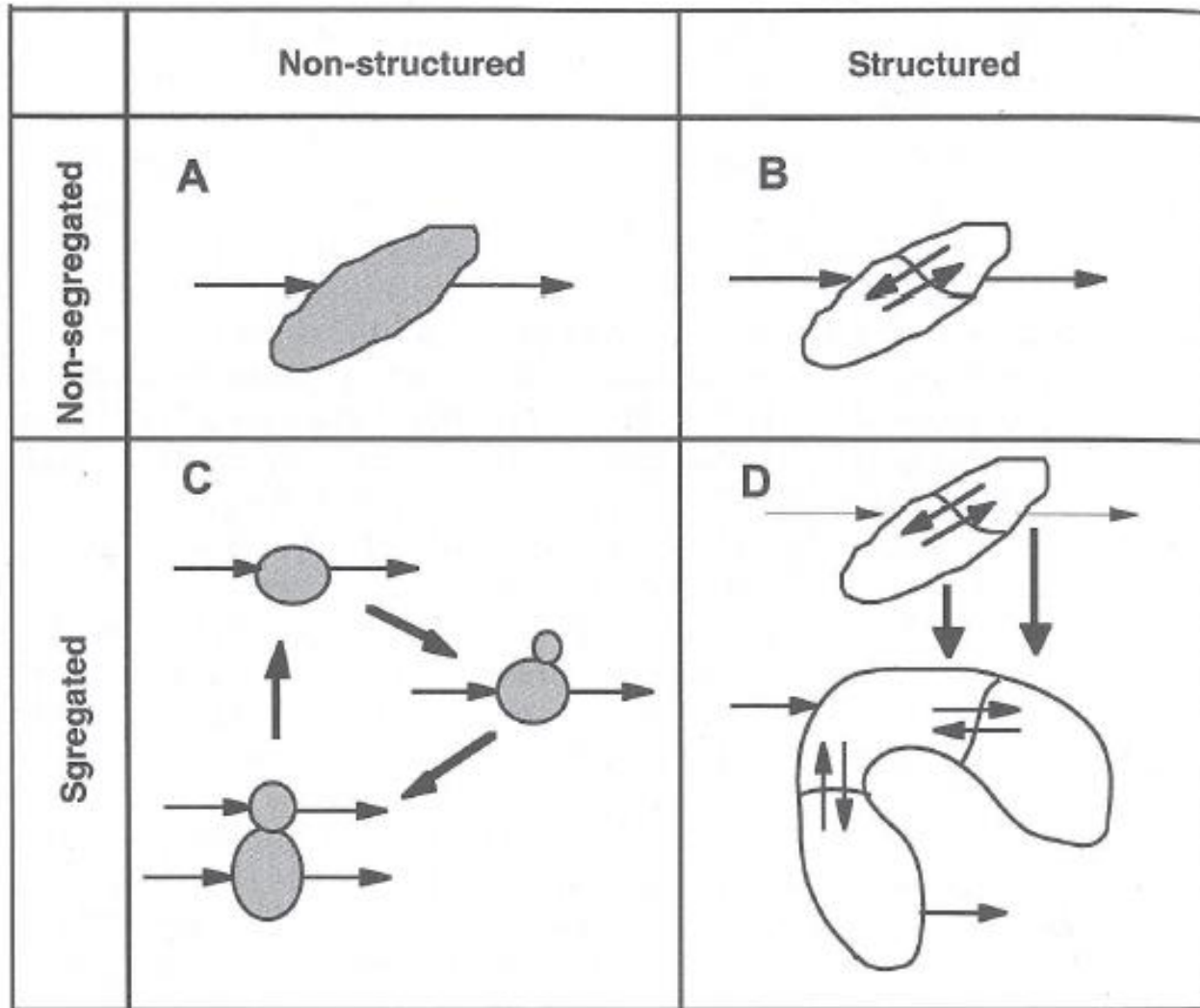
- Singolo componente
- Cellula media

- Sistema multicomponente
- Cellula media

- Singolo componente
- Eterogeneità cellula-cellula

- Sistema multicomponente
- Eterogeneità cellula-cellula

Approssimazioni - fase cellulare 4



Modelli strutturati - non strutturati

- Rappresentazioni che considerano la fase cellulare come un sistema multicomponente vengono definite *strutturate*.
- Nel caso in cui si approssima la fase cellulare come un unico componente si parla di approssimazioni *non strutturate*.
- Una rappresentazione strutturata considera ad esempio la variazione nel tempo della concentrazione di specifiche componenti cellulari come DNA, RNA o enzimi specifici.
- Una rappresentazione non strutturata considera la variazione nel tempo della massa totale delle cellule (mediante peso secco o densità ottica) senza considerarne la composizione ed eventuali cambiamenti nel tempo.

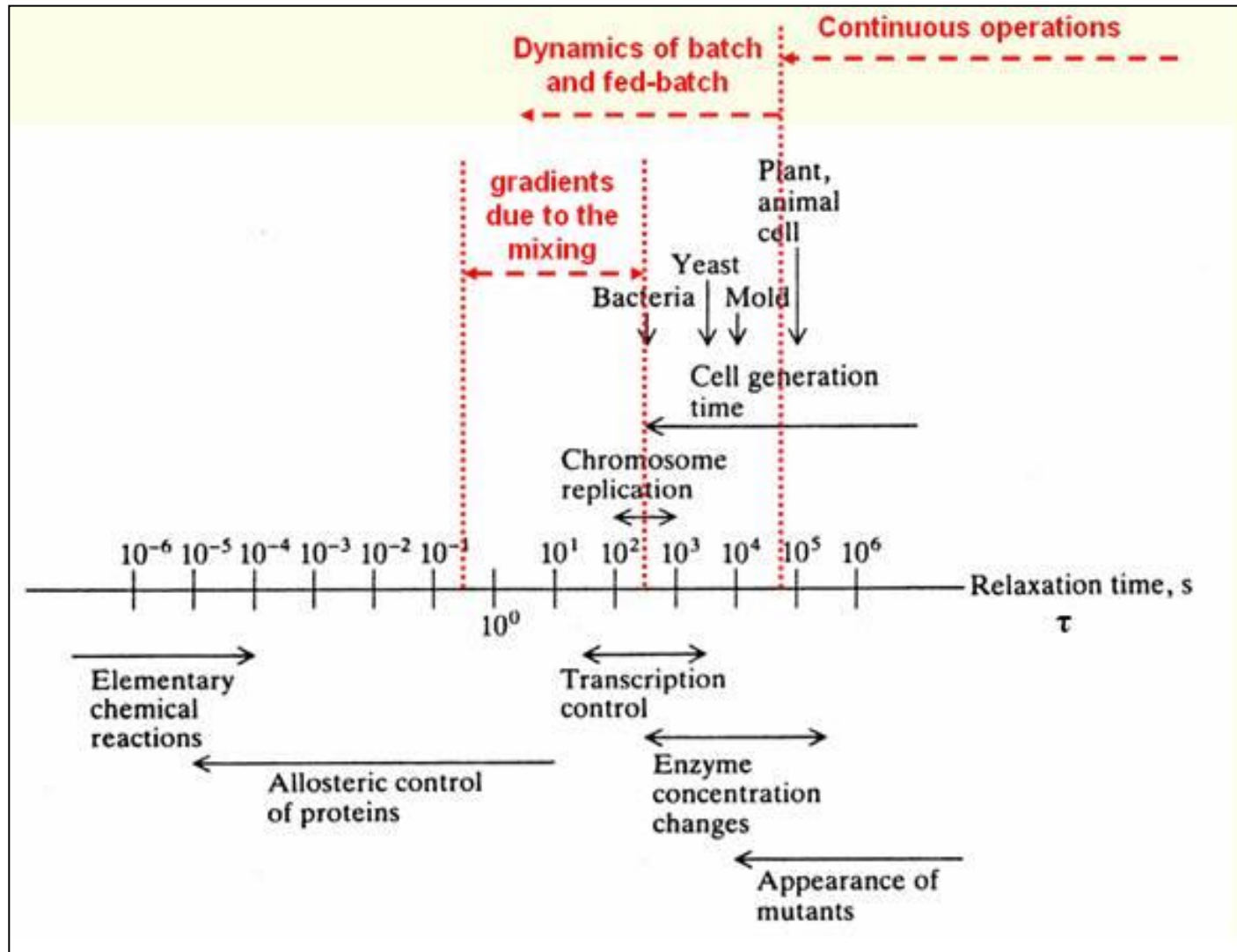
Modelli segregati - non segregati

- Rappresentazioni che considerano l'eterogeneità cellula-cellula si dicono *segregate*.
- Rappresentazioni che considerano una rappresentazione media sono dette *non segregate*.
- Un modello segregato considera ad esempio la distribuzione delle cellule in una popolazione rispetto all'età, il ciclo cellulare o la dimensione.

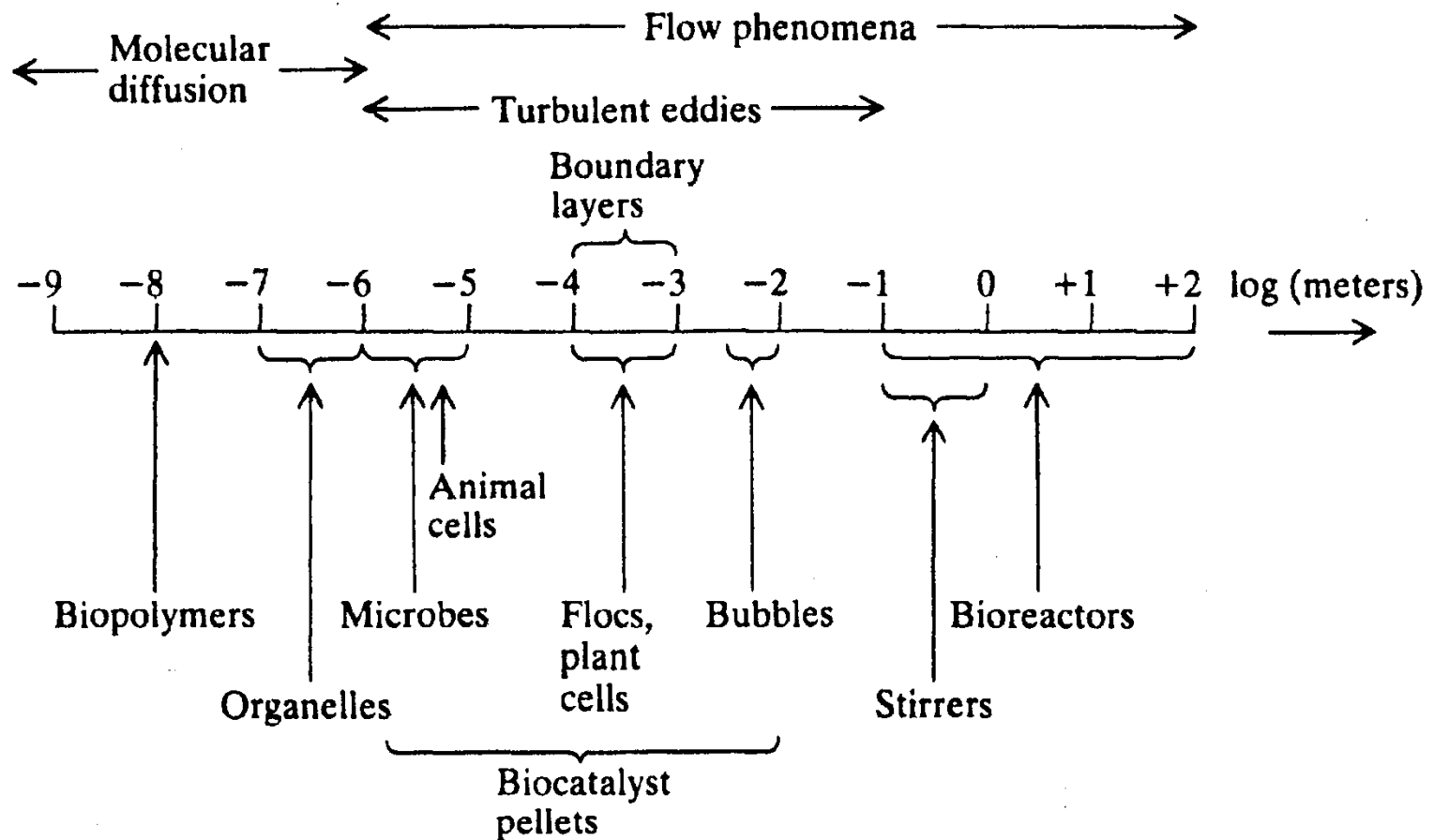
Approssimazioni per la descrizione di bioreattori: tempi e lunghezze caratteristici

Per semplificare la rappresentazione dell'interazioni tra cinetica cellulare e condizioni termo-fluidodinamiche nel reattore considerato, è utile identificare la scala dei tempi o delle lunghezze caratteristica dei fenomeni determinanti il comportamento dinamico del sistema.

Tempi caratteristici per la descrizione di bioreattori



Lunghezze caratteristiche per la descrizione di bioreattori



Approssimazioni per la descrizione di bioreattori: tempi e lunghezze caratteristici 1

- I fenomeni con scale dei tempi o lunghezze “molto inferiori” o “molto maggiori” rispetto a quelle dei fenomeni considerati centrali vengono “trascurati” nella descrizione dinamica del sistema.
- L'applicazione di questo tipo di approssimazione sulla scala dei tempi prende il nome di *approccio dei tempi di rilassamento*, dove per tempo di rilassamento o costante di tempo di un sistema si identifica un parametro dinamico che misura la durata di un transitorio, cioè la velocità del sistema perturbato a riportarsi in un nuovo stato stazionario.

Approssimazioni per la descrizione di bioreattori: tempi e lunghezze caratteristici 2

- L'identificazione dei fenomeni d'interesse per la descrizione dinamica approssimata del sistema viene effettuata attraverso un confronto fra le costanti di tempo dei vari meccanismi coinvolti e i tempi caratteristici dell'ambiente in cui il sistema è studiato.
- Quest'ultimi sono generalmente caratterizzati da una *finestra di osservazione* i cui estremi sono dati dal tempo della prima osservazione dopo il disturbo sul sistema e il tempo totale per cui l'osservazione del sistema si protrae.
- Un fenomeno caratterizzato da una costante di tempo grande è un fenomeno lento, viceversa una costante di tempo piccola indica una durata inferiore del transitorio e quindi una maggiore rapidità con cui il sistema ritorna allo stazionario dopo perturbazione

Finestra di osservazione 1

Time constants of the organism $\rightarrow$		
A)	Time constants of environmental changes	C) τ_R
	B)	
Pseudo steady state Not dynamic Always adapted to environment	Dynamic Lag phenomena, overshoot, oscillation	Frozen Not dynamic Always in initial state

- Le cinetiche dei meccanismi che hanno un tempo di rilassamento più piccolo del limite inferiore della finestra di osservazione possono essere rimosse dalla descrizione del sistema in quanto essi raggiungono lo stato stazionario istantaneamente rispetto all'ambiente. Si tratta di meccanismi che si dice siano in uno *pseudo stato stazionario*. (A)

Finestra di osservazione 2

Time constants of the organism		
A)	Time constants of environmental changes	C)
	B)	
Pseudo steady state Not dynamic Always adapted to environment	Dynamic Lag phenomena, overshoot, oscillation	Frozen Not dynamic Always in initial state

- Meccanismi che hanno un tempo di rilassamento che eccede largamente il limite superiore della finestra di osservazione possono essere ugualmente rimossi dalla descrizione del sistema perché è come se nel tempo in cui si osserva il sistema rimanessero *congelati* nel loro stato iniziale e quindi non contribuiscono alla dinamica del sistema. (C)

Finestra di osservazione 3

Time constants of the organism		
A)	Time constants of environmental changes	τ_R
	B)	C)
Pseudo steady state Not dynamic Always adapted to environment	Dynamic Lag phenomena, overshoot, oscillation	Frozen Not dynamic Always in initial state

- Meccanismi con costanti di tempo dell'ordine di grandezza di quelli della finestra di osservazione (spesso caratterizzata dinamicamente da fenomeni di overshoot e oscillazioni stazionarie del sistema) sono quelli significativi al fine della descrizione dinamica del sistema. (B)

Finestra di osservazione 4

- I limiti inferiore e superiore della finestra di osservazione possono essere utilizzati per calcolare i valori estremi delle costanti di tempo oltre i quali i meccanismi possono essere rimossi dalla descrizione del sistema. Per avere un'indicazione quantitativa:

$$\tau_R < \tau_{Ri} / 3 \text{ pseudo stato stazionario}$$

$$\tau_R > 10\tau_{Ru} \text{ meccanismo "congelato"}$$

dove τ_{Ri} e τ_{Ru} indicano il limite inferiore e superiore della finestra di osservazione.