

CAPITOLO 1

MODELLI DI CRESCITA MICROBICA

1.1 Introduzione

Nella letteratura scientifica è riportata una grande quantità di lavori riguardanti la modellazione del comportamento di biomasse in differenti ambiti quali ad esempio la biotecnologia, la bioingegneria, la biomatematica, l'ingegneria chimica e di controllo. Nonostante ciò molte situazioni riguardanti la descrizione dell'attività di una biomassa rimangono mal rappresentate da un punto di vista matematico-modellistico o non rappresentate affatto. E' il caso ad esempio delle produzioni in continuo, dei sistemi stazionari oscillanti, dell'evoluzione della biomassa, degli effetti della fluidodinamica sulla morfologia e così via. D'altra parte molte applicazioni biotecnologiche attualmente in via di sviluppo necessitano una modellazione accurata che sia in grado di interpretare e prevedere il comportamento di biomasse in specifiche condizioni. Alcuni esempi sono la biodegradazione di sostanze tossiche (fenoli, pentaclorofenoli, PCB etc.) sia in reattori che in contesti naturali in cui queste sostanze sono state sversate (trattamenti in situ di suoli e acque mediante bioremediation), come anche le nuove produzioni bioenergetiche ad opera di consorzi.

La varietà dei lavori pubblicati in questi settori non consente una trattazione completa della materia. Questo corso si prefigge quindi di descrivere differenti approcci modellistici, mettendo in evidenza la complessità crescente che può essere adottata nella descrizione del comportamento di biosistemi. Particolare attenzione verrà posta nella elaborazione della struttura del modello mettendo in evidenza le difficoltà e i limiti associati alle tecniche di determinazione analitica e convalida sperimentale. L'aspetto metodologico rilevante riguarderà quindi la creazione del modello matematico in stretta connessione con l'intento modellistico (ricerca, progetto, convalida, etc). Partendo dal principio generale che il modello migliore per rappresentare un sistema è quello che a parità di fitting ha il numero minore di parametri (principio di massima parsimonia), si mostrerà come la rappresentazione quantitativa e predittiva di sistemi complessi spesso richiede modelli complessi, ma che il meccanismo incorporato nel modello deve essere il più semplice possibile compatibilmente con lo scopo ultimo della modellazione stessa.

Un modello deve quindi essere il più semplice possibile, ma non troppo semplice!

La figura 1 fornisce un'idea della possibile complessità della rappresentazione di un reattore biologico. Come per l'ingegneria dei reattori chimici, la modellazione chimico-fisica di un bioreattore può essere più agevolmente affrontata in termini di variabili macroscopiche tipo portata, calore, temperatura, concentrazione, pressione, ecc. Tuttavia questo approccio risulta inadeguato se non si considera il fatto che la biomassa è costituita da un insieme di cellule autonome, ognuna caratterizzata da una sua storia e da meccanismi di microregolazione interna in risposta a cambiamenti macroscopici esterni. La creazione del modello ottimale sarà quindi una via di mezzo ottimizzata rispetto allo scopo del modello per l'inserimento dei meccanismi di microregolazione biologica in una rappresentazione macroscopica del bioreattore.

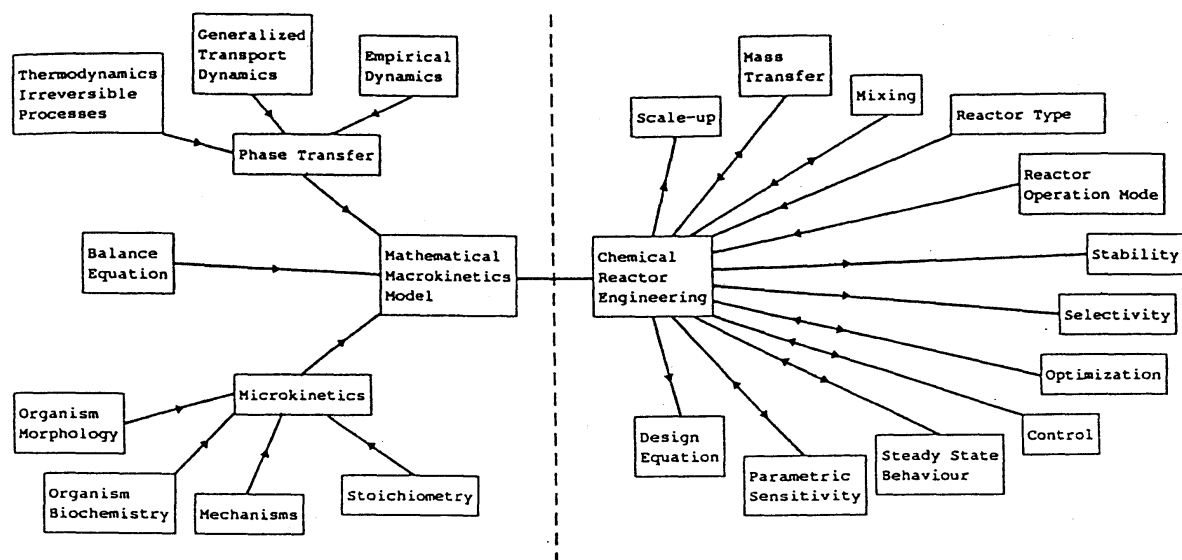


Figura 1: Struttura e complessità dell'ingegneria delle reazioni biochimiche.

1.2 Approssimazioni per la descrizione della crescita cellulare

Quando una piccola quantità di cellule viventi viene aggiunta ad una soluzione liquida contenente i nutrienti essenziali per la vita in opportune condizioni di temperatura e pH, le cellule cominceranno a crescere. Il processo di crescita può manifestarsi in due modi a seconda della morfologia delle cellule considerate. Per gli organismi unicellulari che vanno incontro a divisione cellulare, la crescita della biomassa (massa di cellule viventi) è caratterizzata da un aumento del numero delle cellule presenti o crescita della popolazione cellulare. Nel caso di organismi tipo le muffe, la crescita cellulare è caratterizzata da un aumento delle dimensioni e della densità dei miceli, ma non necessariamente del loro numero.

La crescita cellulare è strettamente associata con due processi: il consumo di alcune sostanze e il rilascio di prodotti metabolici nell'ambiente in cui le cellule crescono. 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 bioproduzioni.

La complessità della descrizione richiesta per la rappresentazione di biosistemi dipende dalla complessità del biosistema stesso e, come già detto, dall'utilizzo finale della rappresentazione sviluppata. Prima di considerare dei casi specifici e le loro rappresentazioni, viene evidenziato lo spettro delle possibilità per reazioni in popolazioni cellulari. Nella discussione seguente ci si focalizzerà sulla crescita cellulare ma simili concetti, commenti e situazioni possono essere estesi ad altri aspetti delle reazioni chimiche nei processi cellulari.

Si cominci con l'immaginare una popolazione cellulare in crescita nel caso più generale e quindi più complicato. Dopodiché si considereranno delle semplificazioni che possono essere utilemente introdotte e le condizioni in cui sono valide.

Nella figura 2 sono riportati alcuni dei parametri, dei fenomeni e delle interazioni che possono influenzare il comportamento cinetico di popolazioni cellulari.

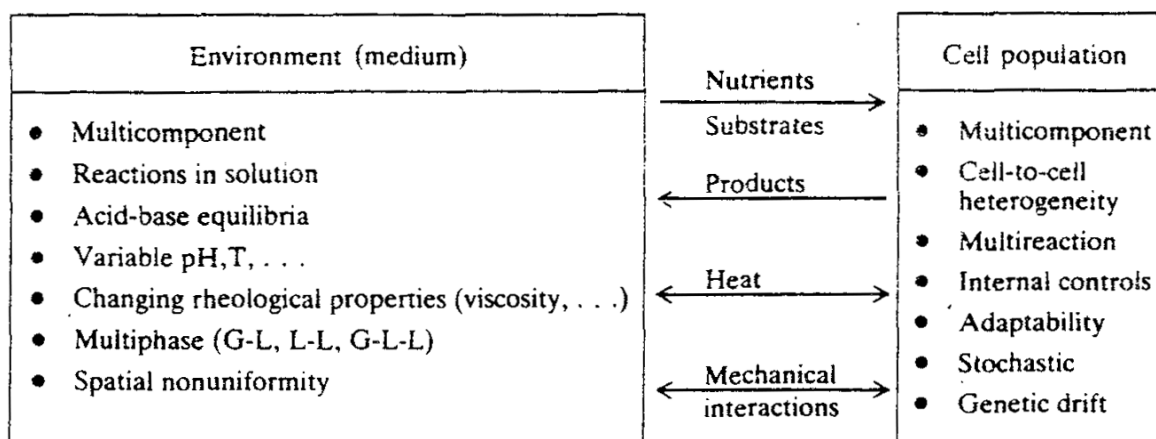


Figura 2: Rappresentazione schematica dei principali parametri e delle interazioni cellule-ambiente.

Nello studio delle cinetiche di crescita è necessario considerare la presenza di due sistemi interagenti la popolazione cellulare e l'ambiente o mezzo di crescita. Le cellule consumano nutrienti e substrati e li trasformano in prodotti. Le cellule generano calore e l'ambiente si porta alla temperatura delle cellule. Interazioni di tipo meccanico possono avvenire per effetto della pressione idrostatica e flussi di materia dal mezzo di reazione alle cellule e per effetto dei cambi della viscosità del mezzo dovuti ad accumulo di cellule e prodotti metabolici.

Il mezzo di reazione è un sistema multicomponente che deve contenere tutti i nutrienti necessari per la crescita cellulare e in cui si accumulano nel corso della crescita vari prodotti terminali del

metabolismo cellulare. I prodotti metabolici accumulati possono andare in contro a reazioni chimiche nel mezzo di reazione come il caso dell'idrolisi della penicillina. Spesso le cellule consumano e producono sostanze che influenzano l'acidità del mezzo e determinano condizioni di pH del mezzo che a sua volta possono influenzare le attività cellulari e i processi di trasporto. In termini generali il mezzo di coltura è caratterizzato da condizioni di temperatura, pH, forza ionica e proprietà reologiche che possono cambiare nel corso della crescita cellulare.

L'ambiente cellulare di crescita è spesso un sistema multifasico che consiste di un liquido con disperse bollicine di gas, di due fasi liquide immiscibili, o alcune volte di un sistema a tre fasi con due liquidi e un gas. In alcuni casi l'apposita aggiunta di sostanze esterne viene effettuata per creare sistemi multifasici liquidi o solidi che consentano simultaneamente alla crescita cellulare la separazione di prodotti specifici.

La scala dei reattori biotecnologici insieme all'alta viscosità e la natura non newtoniana del brodo di coltura determinano spesso condizioni interne non spazialmente omogenee. Tutte le variabili e i parametri ambientali fin qui evidenziati possono influenzare significativamente le cinetiche di crescita cellulare.

Per quanto riguarda la popolazione cellulare, ogni cellula è un complicato sistema multicomponente che frequentemente non è spazialmente omogeneo anche a livello della singola cellula. Molte reazioni chimiche indipendenti avvengono simultaneamente all'interno di ogni singola cellula, sotto il controllo di un sistema complesso di regolazione. Questo controllo interno permette alle cellule di adattarsi a vivere nelle differenti condizioni ambientali in cui si viene a trovare. In coltivazioni a lungo termine di popolazioni cellulari, mutazioni spontanee possono accumularsi imponendo una pressione selettiva che può determinare una deriva del materiale genetico inizialmente caratteristico del ceppo coltivato. Inoltre in una coltivazione cellulare esistono significative differenze tra una cellula e l'altra. Considerando una porzione di brodo cellulare in un certo istante di tempo le singole cellule possono variare tra loro rispetto all'età (cellule appena nate, cellule vecchie, cellule in divisione) e all'attività chimica specifica delle diverse fasi del ciclo cellulare e quindi dell'età della cellula.

Chiaramente non è né pratico né possibile formulare un modello cinetico che includa tutte le caratteristiche e i dettagli menzionati nella figura 2. E' quindi necessario esaminare alcune delle approssimazioni che consentono una semplificazione della rappresentazione utile per la modellazione della cinetica di crescita di popolazioni cellulari.

Una prima approssimazione riguarda il mezzo di crescita. Questo viene usualmente 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. In questo

modo un solo nutriente diventa cinematicamente-limitante e quindi solo la concentrazione di questo componente viene considerato per determinare l'effetto della composizione del mezzo sulla cinetica di crescita. In alcuni casi è necessario includere altri componenti del mezzo di crescita per ottenere una rappresentazione adeguata della crescita cellulare, ad esempio prodotti inibenti che si accumulano. Per quanto riguarda gli altri parametri ambientali è spesso ragionevole assumere che il range delle loro variazioni non influenzino significativamente la cinetica di crescita nella scala dei tempi tipici degli esperimenti e dei processi. Inoltre sistemi di controllo esterni operanti sul bioreattore possono regolare e mantenere costanti alcuni parametri operativi tipo pH, temperatura e concentrazione di ossigeno disciolto. In alcuni casi può comunque essere necessario includere nel modello di crescita cellulare una descrizione multicomponente e multivariabile dell'ambiente per ottenere una rappresentazione adeguata del sistema.

Una rappresentazione concettuale delle differenti approssimazioni e rappresentazioni che sono utilizzate per la fase cellulare del sistema è riportata in figura 3.

Queste rappresentazioni vengono classificate secondo due approssimazioni

- in funzione del numero di componenti usati per descrivere la fase cellulare
- se le cellule sono considerate come un insieme eterogeneo di entità discrete o come una sorta di cellula media.

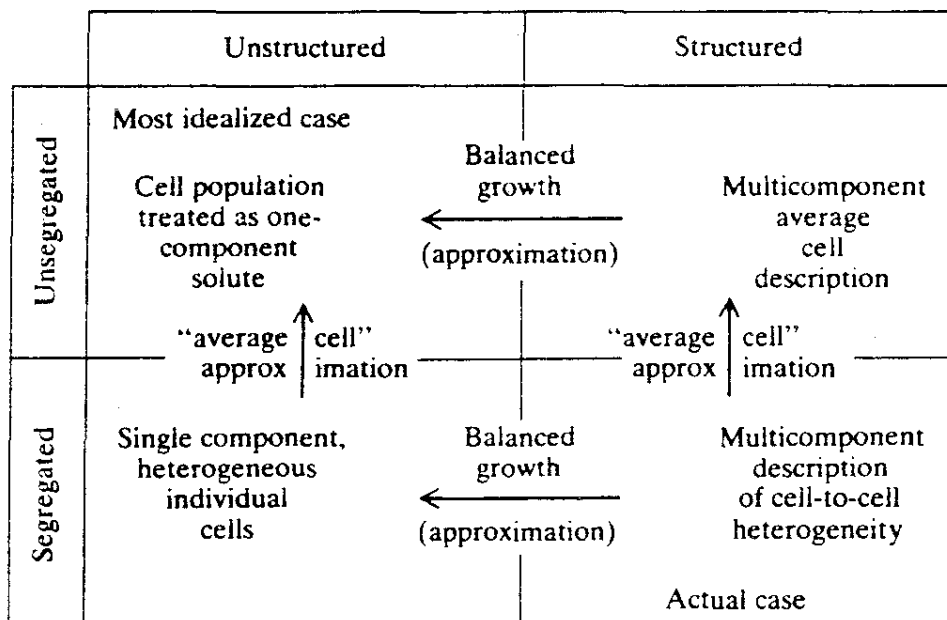


Figura 3: Differenti approssimazioni nella rappresentazione cinetica di popolazioni cellulari.

Rappresentazioni che considerano la fase cellulare come un sistema multicomponente vengono definite *strutturate*, mentre 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. Viceversa 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.

Rappresentazioni che considerano l'eterogeneità cellula-cellula si dicono *segregate*, quelle che invece 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.

Come indicato nella figura 3 il caso reale di una popolazione cellulare è quello strutturato e segregato.

Se l'eterogeneità cellula-cellula non influenza sostanzialmente il processo cinetico d'interesse si può introdurre l'*approssimazione della cellula media* e semplificare la rappresentazione segregata in una di tipo non segregata.

In condizioni di *crescita bilanciata* le attività sintetiche cellulari sono coordinate in modo tale che la composizione media cellulare non cambia con la proliferazione cellulare. In questa situazione modelli che ignorano la natura multicomponente delle cellule possono essere adeguati.

L'approccio più comunemente utilizzato per la descrizione delle cinetiche di crescita cellulari rimane quello più idealizzato non segregato e non strutturato. Tuttavia esistono molteplici situazioni in cui una visione più realistica della fase cellulare è necessaria. Ad esempio per crescite in condizioni non stazionarie (fermentatori batch) in cui l'approssimazione di crescita bilanciata è appropriata solo per una fase della crescita, mentre nel resto del processo la composizione cellulare e le reazioni condotte variano sostanzialmente.

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

Nel paragrafo precedente sono stati indicati alcuni tipi di approssimazioni utilizzabili per una rappresentazione semplificata ma efficace del complesso sistema interagente e multifasico che caratterizza le crescite cellulari. Simili problemi nascono nel momento in cui si progetta un bioreattore e si deve tener conto di come le complesse caratteristiche cinetiche cellulari interagiscono in differenti condizioni di flusso materiale, mescolamento e trasferimento di calore. In problemi di questo tipo risulta utile considerare le scale relative dei tempi e delle lunghezze. Lo spettro di tali scale che si incontra nei bioreattori può essere estremamente ampio (Figure 4 e 5).

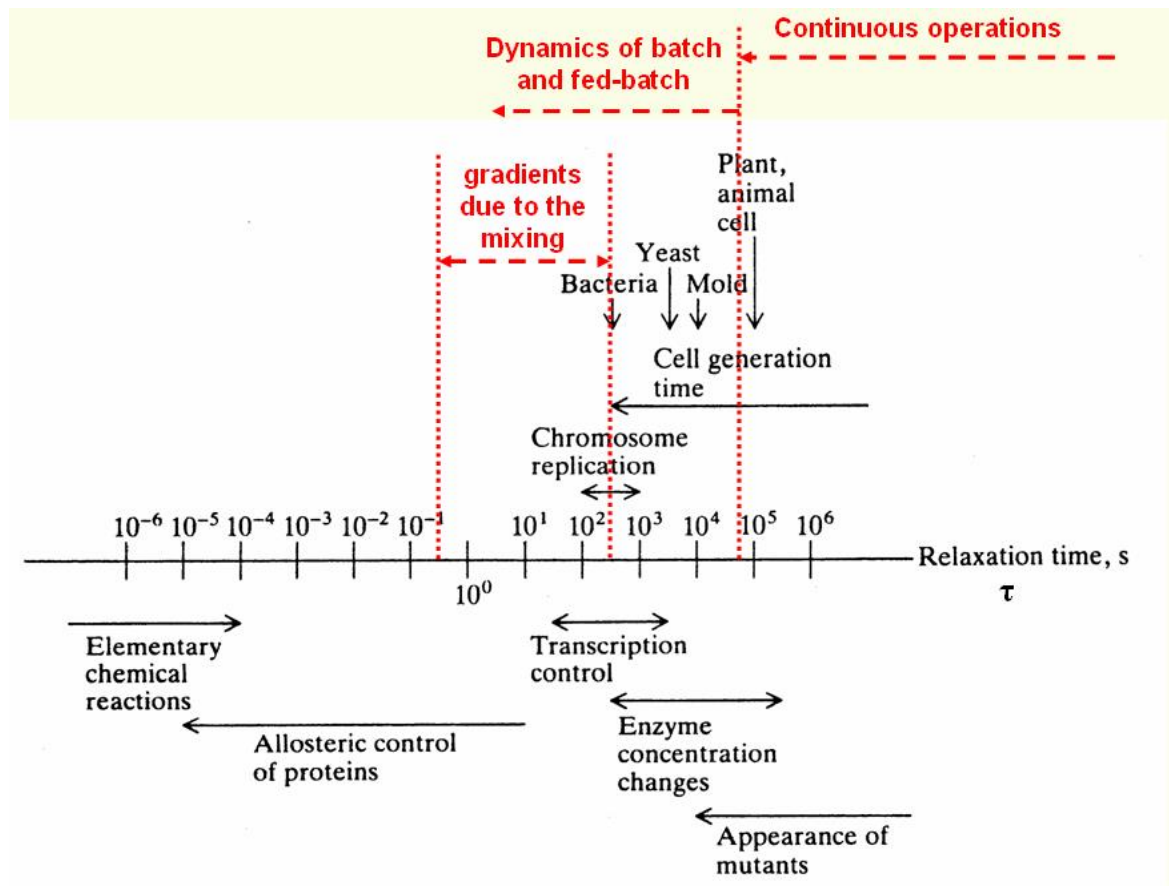


Figura 4: Costanti di tempo caratteristiche di fenomeni biologici rilevanti nell'ingegneria dei bioreattori.

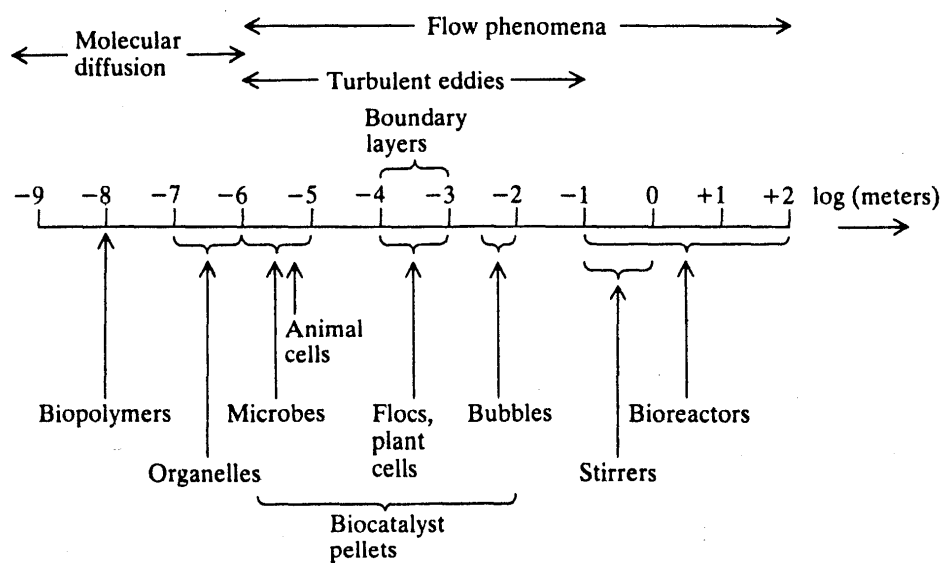


Figura 5: Scala delle lunghezze caratteristiche nel progetto e nell'analisi di bioreattori

Un'approssimazione tesa a semplificare la rappresentazione dell'interazioni tra cinetica cellulare e condizioni termo-fluidodinamiche nel reattore considerato, consiste nell'identificazione della scala dei tempi o delle lunghezze caratteristica dei fenomeni determinanti il comportamento dinamico del sistema. 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 (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). 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. Nella figura 6 vengono confrontate le finestre di osservazione relative a differenti configurazioni reattoristiche rispetto alla scala dei tempi di diversi fenomeni cellulari. 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*. 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. 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.

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

Figura 6: Confronto delle costanti di tempo ed effetti sul comportamento dinamico del sistema

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:

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

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

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

Il problema principale di questo tipo di approccio risiede nella mancanza di conoscenza dei tempi di rilassamento caratteristici di molti dei meccanismi cellulari interni che non permette quindi un confronto immediato con la finestra di osservazione e quindi l'adozione di un'approssimazione valida per il sistema.

1.4 Reattori ideali

E' difficile ottenere informazioni cinetiche su popolazioni cellulari utilizzando reattori caratterizzati da condizioni spaziali non uniformi. Risulta quindi desiderabile studiare fenomeni cinetici in reattori che siano ben miscelati. Nel seguito vengono trattate sotto l'ipotesi di mescolamento perfetto alcune delle configurazioni reattoristiche più comuni.

1.4.1 Reattore discontinuo

La maggior parte dei processi biotecnologici attualmente utilizzati in ambito produttivo vengono effettuati in reattori discontinui o batch. Dopo la fase di semina di un inoculo di cellule vive in un terreno liquido di coltura, niente (eccetto gas tipo ossigeno in alcuni casi) viene aggiunto alla coltura o rimosso da essa mentre la crescita procede.

Il bilancio materiale sulle moli del componente i -esimo mostra che la velocità di accumulo del componente (data dalla derivata nel tempo della quantità totale di componente i nel reattore) è uguale alla velocità netta di formazione del componente i -esimo dovuta alla reazioni nel reattore.

$$\frac{d}{dt}(V_R \cdot c_i) = V_R \cdot r_{fi}$$

dove V_R è il volume dentro il reattore, c_i è la concentrazione in moli/L del componente i , e r_{fi} è la velocità di formazione espressa come moli di i per unità di tempo e unità di volume.

Se non viene aggiunto o rimosso liquido dal reattore e la quantità di liquido perso per effetto di stripping nella corrente gassosa è trascurabile, il volume di coltura nel reattore è costante e ne segue

$$\frac{dc_i}{dt} = r_{fi}$$

La misura della velocità temporale di cambiamento della concentrazione del componente i -esimo permette la determinazione diretta della velocità globale di formazione di i dovuta a tutte le reazioni (incluse quelle cellulari) che avvengono nel reattore batch.

1.4.2 Reattore in continuo

Un reattore che lavora in continuo (definito chemostato o CSTR da Continuous Stirred Tank Reactor) è caratterizzato da una corrente di alimentazione in ingresso e una corrente in uscita con la stessa portata volumetrica (F) in modo tale che il volume all'interno del reattore rimane costante (Figura 7).

In condizioni di mescolamento perfetto la corrente in uscita presenta le stesse caratteristiche di composizione e temperatura presenti in ogni punto all'interno del reattore. Dopo un transiente caratteristico della fase di avviamento del chemostato, il sistema si porta allo stato stazionario in cui tutte le concentrazioni all'interno del reattore sono indipendenti dal tempo. Allo stato stazionario il bilancio di materia per il componente i -esimo diventa:

$$F(c_{i0} - c_{if}) + V_R r_{fi} = 0$$

dove c_{i0} è la concentrazione di i nell'alimentazione e c_{if} è la concentrazione in uscita e nel reattore.

Riarrangiando l'equazione precedente si ottiene che la velocità di formazione può essere valutata semplicemente dalla misura delle concentrazioni in ingresso e in uscita allo stato stazionario:

$$r_{fi} = \frac{F}{V_R} (c_{if} - c_{i0}) = D(c_{if} - c_{i0})$$

dove D è la velocità di diluizione del sistema (numero di volumi di reattore che passano nel reattore per unità di tempo), inversamente proporzionale al tempo di permanenza medio nel reattore.

Confrontando l'espressione per r_{fi} ottenute per reattore batch e chemostato, si conclude che le determinazioni cinetiche possono essere effettuate più agevolmente in un reattore CSTR in cui non è necessario determinare l'andamento temporale e fare la derivata dei dati con tutti gli inconvenienti connessi con gli errori sperimentali associati a tali determinazioni. In aggiunta le determinazioni

cinetiche effettuate su un CSTR si riferiscono a condizioni di stato stazionario in cui le cellule crescono e si moltiplicano in condizioni ben definite, riproducibili e ben approssimabili con condizioni di crescita bilanciata.

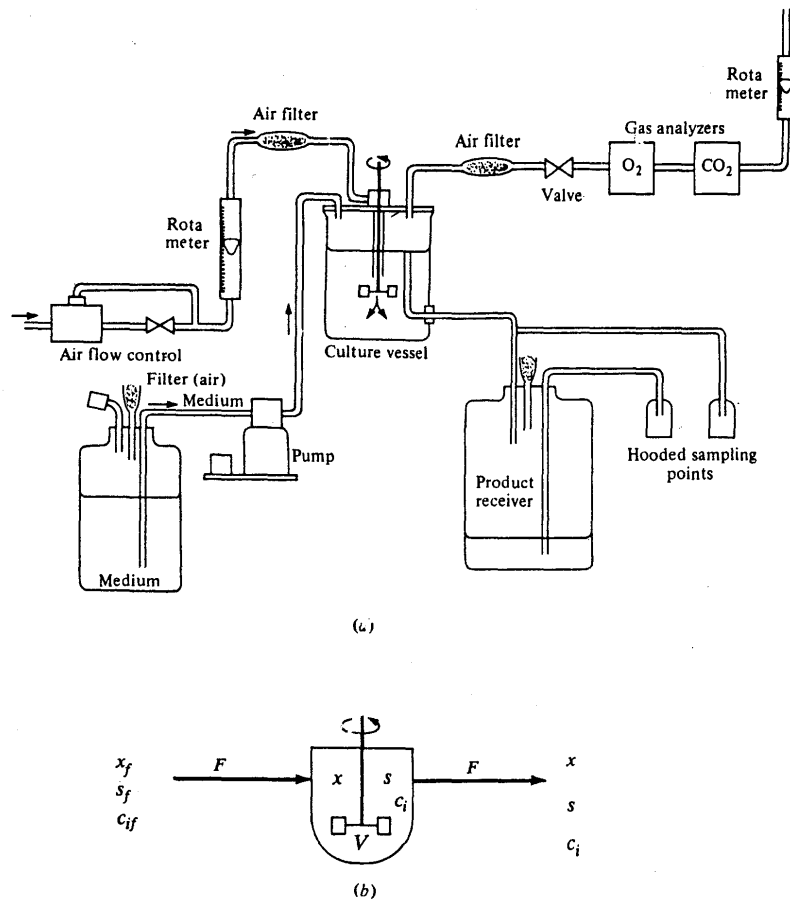


Figura 7: CSTR per coltivazioni cellulari in continuo: a) componenti principali di un CSTR da laboratorio; b) schematizzazione usualmente utilizzata per la modellazione e l'analisi di questi reattori.

Di contro le apparecchiature richieste per un CSTR sono più costose e complicate richiedendo controlli di portate e agitazione. In aggiunta raggiungere condizioni stazionarie in un CSTR può richiedere ore o giorni aumentandola probabilità di contaminazione delle colture studiate. Infine poiché la maggior parte delle applicazioni industriali biotecnologiche su larga scale (eccetto il trattamento biologico delle acque) vengono effettuate in reattori batch, modelli cinetici basati su informazioni cinetiche desunte da CSTR in condizioni stazionarie potrebbero non essere rappresentative dei sistemi discontinui in esame.

1.4.3 Reattore fed-batch

Nei processi biotecnologici è spesso necessario aggiungere delle correnti liquide mentre la crescita batch è in corso (reattore fed-batch). Le motivazioni possono essere varie: aggiungere precursori dei prodotti desiderati; aggiungere composti regolatori come induttori in una determinata fase della crescita; mantenere un basso livello di nutrienti per evitare l'inibizione da substrato garantendo al contempo alte produttività; estendere la fase di crescita stazionaria aggiungendo substrato sempre per incrementare la produttività finale del processo; diluire l'effetto dei prodotti metabolici tossici accumulati. Quando una corrente liquida viene aggiunta ad un reattore batch dopo la fase di avviamento si verifica un cambiamento del volume all'interno del reattore. Considerando una portata in ingresso dipendente dal tempo ($F(t)$) il bilancio di materia per il componente i -esimo in un reattore fed-batch è il seguente

$$\frac{d}{dt}(V_R \cdot c_{if}) = V_R \cdot r_{fi} + F(t) \cdot c_{i_0}$$

Assumendo che la densità della corrente in ingresso e della fase fluida nel reattore sia la stessa, il bilancio di massa totale si può esprimere come

$$\frac{d}{dt}(\rho \cdot V_R) = \rho \cdot F(t)$$

Da cui per densità costanti si ricava la relazione tra la portata $F(t)$ e la variazione temporale del volume del reattore

$$\frac{dV_R}{dt} = F(t)$$

Effettuando la differenziazione a membro sinistro del bilancio di materia del componente i -esimo e tenendo conto della variazione temporale del volume si ottiene

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F(t)}{V_R} (c_{i_0} - c_{if}) + r_{fi}$$

Conoscendo l'espressione cinetica di r_{fi} si possono simulare gli effetti di differenti alimentazioni sulla cinetica di produzione di i .

1.4.4 Reattore tubolare

Un fluido che si muove in un tubo con numeri di Reynolds sufficientemente alti ($Re > 2100$) approssima un flusso a pistone (plug-flow) caratterizzato da assenza di profilo radiale della velocità.

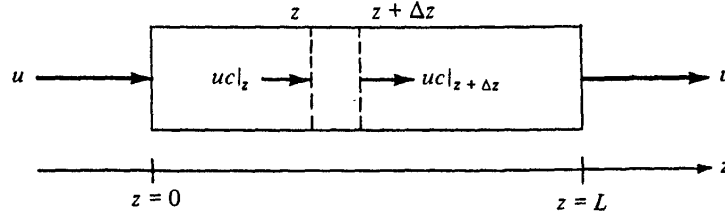


Figura 8: Reattore plug-flow.

Assumendo valida l'ipotesi di flusso a pistone si può formulare il bilancio di materia per un reattore tubolare con flusso a pistone (PFTR, Plug Flow Tubular Reactor), applicando la conservazione di materia allo stazionario in una sottile fettina del reattore tubolare tagliata perpendicolarmente rispetto alla direzione assiale del reattore (Figura 8)

$$Auc_i|_z - Auc_i|_{z+\Delta z} + A\Delta z r_{fi}|_z = 0$$

dove A è la sezione trasversale del tubo, u è la velocità assiale. Riarrangiando l'equazione precedente e dividendo per l'unità di volume $A\Delta z$ si ottiene

$$\frac{uc_i|_{z+\Delta z} - uc_i|_z}{\Delta z} = r_{fi}$$

Il limite per Δz che tende a zero di questa espressione diventa

$$\frac{d}{dz}(uc_i) = r_{fi}$$

Sotto l'ipotesi che le reazioni in corso non cambino la densità, la velocità assiale rimane costante e si ottiene

$$u \frac{dc_i}{dz} = r_{fi}$$

La quantità z/u è uguale al tempo richiesto da una fettina di fluido per muoversi dall'ingresso del tubo alla posizione assiale z . Se si effettua un cambio di variabili introducendo il tempo di passaggio $t = z/u$ come nuova variabile indipendente il bilancio di massa nel reattore tubolare in condizioni di densità costante diventa

$$\frac{dc_i}{dt} = r_{fi}$$

che è esattamente lo stesso del reattore batch.

In un plug-flow con velocità costante ogni sottile fettina di fluido si muove lungo il reattore tubolare senza alcuna interazione con le fettine circostanti. Il sistema è completamente segregato e ogni sottile fettina si comporta come un reattore batch. Conseguentemente se la carica iniziale in un reattore batch ha la stessa composizione dell'alimentazione del plug-flow, e se il tempo medio di

residenza nel reattore tubolare (L/u) è lo stesso che nel reattore batch, la corrente in uscita dal reattore tubolare è identica a quella del reattore batch nel tempo.

1.5 Bioprocessi

Nel caso di bioprocessi possiamo distinguere diversi tipi meccanismi attraverso cui si ottengono i prodotti:

- 1° tipo - Il prodotto della fermentazione è la biomassa (produzione di lievito)
- 2° tipo - Il prodotto è secreto direttamente dalla biomassa o prodotto dal metabolismo ordinario
- 3° tipo - Il prodotto di interesse viene ottenuto dal metabolismo non ordinario della biomassa

Le modalità principali con cui si coltivano microrganismi all'interno di un bioreattore sono tre: colture in sistema chiuso (o colture in *batch*), colture in sistema semicontinuo e colture in sistema continuo. I bioprocessi possono avvenire in fermentatori statici oppure agitati meccanicamente, in presenza o in assenza di ossigeno (ovvero in condizioni aerobiche o anaerobiche), in un mezzo liquido o su substrati solidi. Inoltre i microrganismi possono crescere in sospensione oppure immobilizzati/adesi su superfici adatte.

In una *coltura a sistema chiuso o in batch (batch colture)* si inoculano microrganismi in un volume fisso di terreno liquido; mentre si sviluppa la crescita microbica, le sostanze nutritive si consumano e i prodotti della crescita (essenzialmente biomassa e metaboliti) si accumulano; perciò l'ambiente nutritivo all'interno del bioreattore è soggetto a continue variazioni, che a loro volta provocano cambiamenti nel metabolismo cellulare. Infine, a causa dell'esaurimento o della scarsità dei nutrienti e dell'accumulo delle sostanze tossiche di rifiuto escrete dagli organismi stessi, le cellule cessano di moltiplicarsi. La figura 9 mostra l'andamento della crescita microbica in una coltura in *batch*.

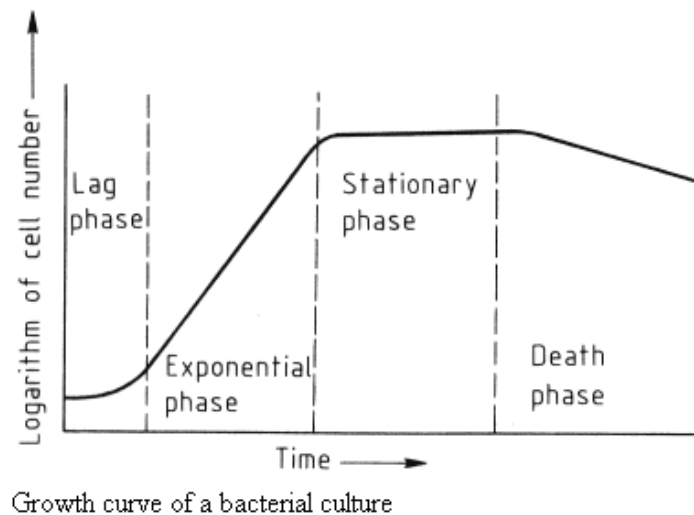


Figura 9: La curva di crescita di un microrganismo in una coltura a sistema chiuso (o in batch): 1) fase iniziale di latenza; 2) fase esponenziale o logaritmica; 3) fase stazionaria; 4) fase di estinzione.

Nella fase iniziale, detta fase di latenza (o *lag phase*; lag = ritardo) non si ha alcuna crescita apparente, ma in realtà si è visto che in questo stadio le cellule si vanno adattando alle condizioni ambientali e la crescita sta per cominciare. Ha poi inizio la *fase esponenziale o logaritmica (exponential phase)*. In questa fase, il tasso di crescita raggiunge il massimo per lo specifico microrganismo, i nutrienti sono presenti in eccesso, i parametri ambientali sono ai livelli ottimali e gli inibitori alla crescita dei microrganismi sono assenti. Nelle colture in batch la fase di crescita esponenziale ha però una durata limitata; infatti, al modificarsi dell'ambiente nutritivo il tasso di crescita comincia a diminuire, per poi cessare nella *fase stazionaria*, in cui la scarsità dei nutrienti determina l'arresto della crescita. Il ciclo termina con la *fase di estinzione*, in cui ogni processo vitale viene a cessare. Nella maggior parte delle colture in batch, i bioprocessi vengono arrestati prima di raggiungere quest'ultimo stadio, per via della diminuita attività cellulare e dei fenomeni di lisi cellulare.

Nella produzione industriale, le colture in batch vengono usate per ottimizzare la produzione di biomassa, per poi consentire all'organismo di effettuare trasformazioni biochimiche specifiche, come la produzione di particolari prodotti finali (ad esempio enzimi e amminoacidi), o la decomposizione di certe sostanze (smaltimento dei rifiuti, biorisanamento). Nelle colture in *batch* il livello ottimale di formazione di molti prodotti, ad esempio gli antibiotici, viene raggiunto nella fase stazionaria del ciclo di crescita.

Esistono tuttavia vari metodi per prolungare la vita di una coltura a sistema chiuso; questi metodi possono consistere: 1) nell'aggiunta graduale dei componenti del terreno in alte concentrazioni, così da aumentare il volume della coltura (coltura alimentata o *fed batch*). Questo metodo viene ad esempio applicato nella produzione industriale del lievito da panificazione; 2)

nell'addizione di una certa quantità di terreno fresco (*perfusione*) e il prelievo di un uguale volume di terreno usato. Questo metodo viene applicato ad esempio nelle colture di cellule animali.

Nella fase stazionaria la popolazione cellulare si comporta come una popolazione colonizzante in cui la velocità di crescita è massima.

Se il numero di cellule iniziali è N_0 , nel tempo di una generazione si arriverà a $2 N_0$ in base alla legge dei microrganismi colonizzanti:

$$N = 2^n N_0$$

dove

n = numero di generazioni ($= t/T$, dove T è il tempo di una generazione e t è il tempo trascorso)

N = numero di microrganismi dopo un certo numero di generazioni

N_0 = numero iniziale di microorganismi

In tali condizioni se supponiamo che il peso di un certo numero di cellule (N) sia proporzionale al suo peso (W); possiamo quindi scrivere che:

$$N_0 = W_0$$

e

$$W_T = 2^{t/T} W_0$$

Quindi se vogliamo rappresentare l'incremento del peso secco (unità di misura usata per determinare in alcuni casi la crescita dei microrganismi) nel tempo, possiamo scrivere:

$$\ln W_T = (t/T) \ln 2 + \ln W_0$$

La fase esponenziale di crescita ($\ln W = \ln W_0 + (t/T) \ln 2$) si può anche scrivere come:

$$\ln (W_T / W_0) = t / \tau$$

dove $\tau = T / \ln 2$.

$$W_T = W_0 e^{t/\tau} \quad \text{legge dei microrganismi colonizzanti}$$

1.6 Modelli cinetici per crescita bilanciata in chemostato

Con la *coltura continua* si ottiene una crescita pressoché bilanciata, con scarse fluttuazioni nelle concentrazioni di nutrienti e metaboliti, nel numero di cellule o nella quantità di biomassa. Questa procedura consiste nell'aggiungere a una coltura in *batch*, durante la fase di crescita esponenziale, una certa quantità di terreno fresco e nel prelevare un identico volume di terreno *con* cellule. Nelle

colture di questo tipo, nel bioreattore entra un flusso costante di terreno sterile e ne esce un flusso costante di brodo di coltura (terreno + sostanze di rifiuto + organismi), per cui all'interno del bioreattore il volume complessivo della coltura resta invariato. Le colture continue consentono di mantenere ai livelli stabiliti parametri quali pH e le concentrazioni dei nutrienti e dei metaboliti, che invece in una coltura in batch si modificano nel tempo; in questo modo la crescita nelle colture continue avviene a velocità costante.

Con i processi in continuo si ottiene:

- una maggiore quantità di inoculo
- la crescita esponenziale avviene in tempi lunghi
- velocità di crescita maggiore rispetto a quella determinata in beuta

Nella figura 10 è riportato lo schema di un reattore in continuo:

Figura 10: Rappresentazione schematica di un fermentatore in continuo.

Un reattore che lavora in continuo (definito chemostato o CSTR da Continuous Stirred Tank Reactor) è caratterizzato da una corrente di alimentazione in ingresso e una corrente in uscita con la stessa portata volumetrica (L) in modo tale che il volume all'interno del reattore rimane costante. In condizioni di mescolamento perfetto la corrente in uscita presenta le stesse caratteristiche di composizione e temperatura presenti in ogni punto all'interno del reattore. Dopo un transiente caratteristico della fase di avviamento del chemostato, il sistema si porta allo stato stazionario in cui tutte le concentrazioni all'interno del reattore sono indipendenti dal tempo.

1.6.1 Crescita in assenza di substrato limitante

La velocità netta di crescita della massa cellulare r_x , viene spesso espressa come μx dove x è la massa cellulare e μ è la velocità specifica di crescita delle cellule con unità pare al reciproco di un tempo.

Considerando un reattore CSTR il bilancio di materia per la biomassa può essere scritto come segue:

$$F x_f - F x + \mu x V_R = 0$$

da cui dividendo per V_R

$$D x_f = (D - \mu) x$$

Spesso la corrente liquida in ingresso è sterile ($x_f = 0$). In questo caso l'unico stato stazionario in cui la popolazione cellulare nel reattore è diversa da zero si ottiene quando

$$D = \mu$$

cioè quando la velocità specifica di crescita delle cellule è pari alla velocità di diluizione del reattore. La condizione di stato stazionario se $x_f = 0$ lascia indeterminata la concentrazione x . Questo è stato confermato sperimentalmente con una coltura in continuo di *Bacillus linens* (figura 11) in cui la concentrazione cellulare all'interno del CSTR viene monitorata nel tempo attraverso misure di assorbanza. Dopo 6 ore il sistema si porta ad uno stato stazionario (andamento orizzontale). A questo punto il sistema viene perturbato prelevando una porzione del volume del reattore contenente anche cellule e sostituendola con del mezzo di crescita senza cellule. Dopo un breve transitorio il sistema si porta di nuovo allo stato stazionario caratterizzato però da una minore concentrazione della biomassa in sospensione come denotato dalla diminuzione dell'assorbanza sul secondo tratto orizzontale. La ripetizione della perturbazione fornisce risultati analoghi a conferma che, se la velocità di crescita specifica è una costante e l'alimentazione è sterile, la concentrazione cellulare nel sistema allo stato stazionario è indeterminata.

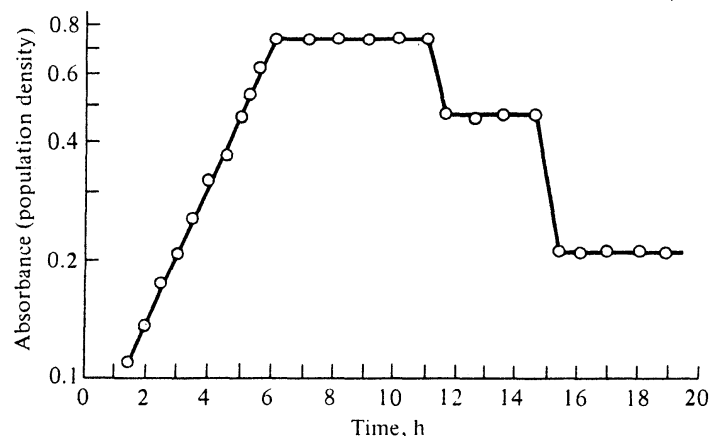


Figura 11: Perturbazioni dello stato stazionario per una popolazione con μ costante.

1.6.2 Crescita in presenza di substrato limitante: il chemostato di Monod

La natura indeterminata della concentrazione cellulare allo stato stazionario scompare se esiste un substrato cineticamente limitante la crescita.

I mezzi di crescita possono essere sintetici (ottenuto da una base minerale a cui si aggiungono tamponi del pH e fonti di carbonio e azoto ben definite) o complessi (estratto di lievito, brodi di carne, miscele di carboidrati ottenuti dalla degradazione enzimatica di materiali cellulosici, scarti di lavorazioni agro-industriali o di altre fermentazioni).

Lo scopo generale nella formulazione del mezzo di coltura è di sostenere una buona crescita cellulare e/o alte velocità di sintesi del prodotto. Contrariamente a quanto ci si aspetta, questo non significa necessariamente che tutti i nutrienti debbano essere forniti in largo eccesso, in quanto l'eccessiva concentrazione di un nutriente può inibire e compromettere la crescita cellulare (inibizione da substrato). Inoltre se le cellule crescono troppo velocemente, l'accumulo dei loro prodotti metabolici può distruggere i normali processi biochimici delle cellule stesse. Conseguentemente è una pratica comune limitare la velocità di crescita limitando la quantità di un nutriente nel mezzo di coltura (substrato limitante).

Se la concentrazione di uno dei nutrienti essenziali è variata mentre la concentrazione di tutti gli altri componenti del mezzo è mantenuta costante, la velocità di crescita delle cellule varia in modo iperbolico (figura 12).

Una relazione funzionale tra la velocità specifica di crescita, μ , e il substrato limitante è stata proposta da Monod nel 1942, e presenta la stessa forma del modello di Michaelis-Menten per le cinetiche enzimatiche e del modello di Langmuir per l'adsorbimento:

$$\mu(s) = \frac{\mu_{\max} s}{K_m + s}$$

dove $\mu_{\max}$ è la massima velocità di crescita quando $s \gg K_m$ e le concentrazioni di tutti gli altri nutrienti sono mantenute costanti, e K_m è il valore della concentrazione del substrato s a cui la velocità specifica di crescita è la metà del valore massimo.

Figura 12: Velocità di crescita iperbolica in condizioni di substrato limitante.

Tale relazione prevede che per basse concentrazioni del substrato μ è linearmente dipendente da s , mentre per valori alti di s la velocità diventa indipendente dalla concentrazione del substrato (reazione di shifting order).

Considerando la complessità di un sistema biochimico, è evidente che l'equazione di Monod è una sovrasemplificazione della realtà. Comunque, come in altri campi dell'ingegneria, il modello di Monod è uno di quei modelli relativamente semplici che rappresentano spesso in maniera adeguata il comportamento sperimentale, anche se i parametri in esso contenuti non hanno un significato fisico identificabile.

Quando la crescita di una popolazione è determinata da un substrato limitante tramite un modello cinetico tipo quello di Monod, emergono delle connessioni ben definite tra le condizioni operative del reattore e i parametri cinetici e stechiometrici relativi alle reazioni biologiche.

Per mostrare queste relazioni il bilancio di massa della biomassa viene accoppiato con quello del substrato limitante introducendo un coefficiente stechiometrico o rendimento (Y) che definisce quanta massa cellulare (ΔX) si forma rispetto a quanto substrato (ΔS) si consuma:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

La crescita specifica della biomassa ed il consumo specifico di substrato in un reattore in cui la biomassa cresce secondo una cinetica tipo Monod sono i seguenti:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\sigma = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$$

Per quanto riguarda invece la produzione di un prodotto (P) di interesse definiamo una resa

$$Y_{X/P} = \frac{\Delta X}{\Delta P}$$

che rappresenta la produzione di metaboliti per biomassa prodotta. Parlando in termini di produzione specifica avremo

$$\pi = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

Graficando $-\sigma$ e π in funzione di μ , e considerando tre diverse condizioni di crescita (chiamate A, B e C), otterremo:

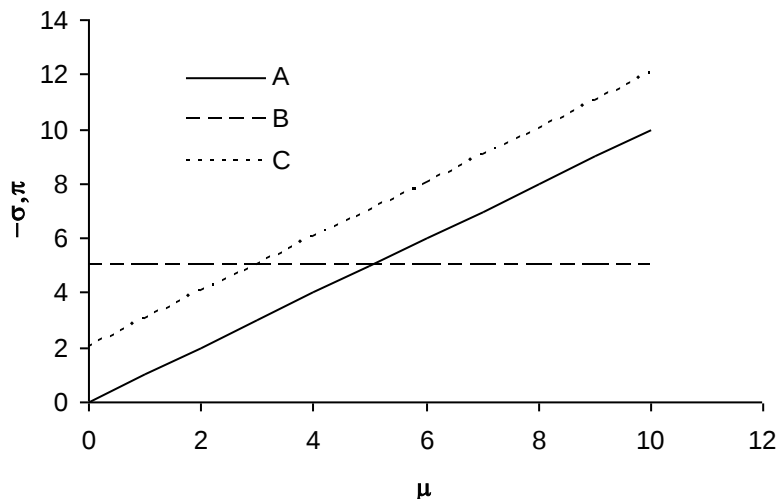


Figura 13: Consumo specifico di substrato- produzione specifica di prodotto vs. crescita specifica biomassa.

- A) Tale condizione mostra un andamento proporzionale tra la crescita specifica e il consumo/produzione di substrato/cataboliti, perché tale crescita è legata al metabolismo ordinario delle popolazioni giovani. La pendenza di tale curva è la resa, tanto substrato consumo tanta biomassa è prodotta
- B) Qualunque sia lo stato di crescita il consumo del substrato è costante. Per $\mu=0$ si ha ugualmente il consumo di substrati anche se la crescita si è interrotta. Questo vuol dire che siamo in presenza di una popolazione adulta. Il substrato consumato viene utilizzato per il mantenimento. Il mantenimento può essere espresso come

$$\sigma = m$$

quindi possiamo scrivere

$$m = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$$

- C) Tale curva potrebbe non essere facilmente distinguibile da A; in ogni caso, rappresenta una popolazione media che cresce ma che utilizza parte del substrato per il mantenimento.

La stechiometria di un generico substrato può essere quindi scritta come:

$$\sigma_j = m_j + \frac{\mu}{Y_j}$$

Tramite questa relazione abbiamo riassunto i diversi casi sopra descritti.

I bilanci di materia per biomassa e substrato in un CSTR in cui la biomassa cresce secondo una cinetica tipo Monod (chemostato di Monod) sono i seguenti:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= -DX + \mu(S)X \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) - \frac{\mu(S)}{Y} X\end{aligned}$$

che in condizioni di stato stazionario diventano

$$\begin{aligned}(\mu(S) - D)X &= 0 \\ D(S_0 - S) - \frac{\mu(S)}{Y} X &= 0\end{aligned}$$

dove D è la velocità di diluizione del sistema (numero di volumi di reattore che passano nel reattore per unità di tempo), inversamente proporzionale al tempo di permanenza medio nel reattore.

Questo sistema di equazioni ammette due punti di zero o stati stazionari

$$X = 0$$

$$S = S_0$$

$$D = \mu(S)$$

$$X = Y(S_0 - S)$$

Il primo stato stazionario corrisponde ad una situazione in cui non c'è biomassa all'interno del reattore e il substrato rimane quindi alla concentrazione di ingresso. Questo stato stazionario viene definito wash-out in quanto la biomassa viene dilavata dal reattore.

E' utile determinare l'effetto del parametro operativo manipolabile D sul valore di X e S allo stato stazionario.

Inserendo l'espressione della cinetica di Monod in f_1

$$\frac{\mu_{\max} S}{K_m + S} - D = 0$$

si esplicita rispetto a S per ottenere la relazione tra la concentrazione di substrato allo stato stazionario e D cioè $S = S(D)$:

$$S = \frac{DK_m}{\mu_{\max} - D}$$

Sostituendo $\mu = D$ nella f_2

$$D(S_0 - S) - \frac{D}{Y} X = 0$$

si esplicita rispetto a X e si ottiene un'espressione di $X = X(D)$

$$X = Y \left(S_0 - \frac{DK_m}{\mu_{\max} - D} \right)$$

In figura 14 viene riportato l'andamento delle variabili di stato allo stato stazionario in funzione di D (cioè $S = S(D)$ e $X = X(D)$).

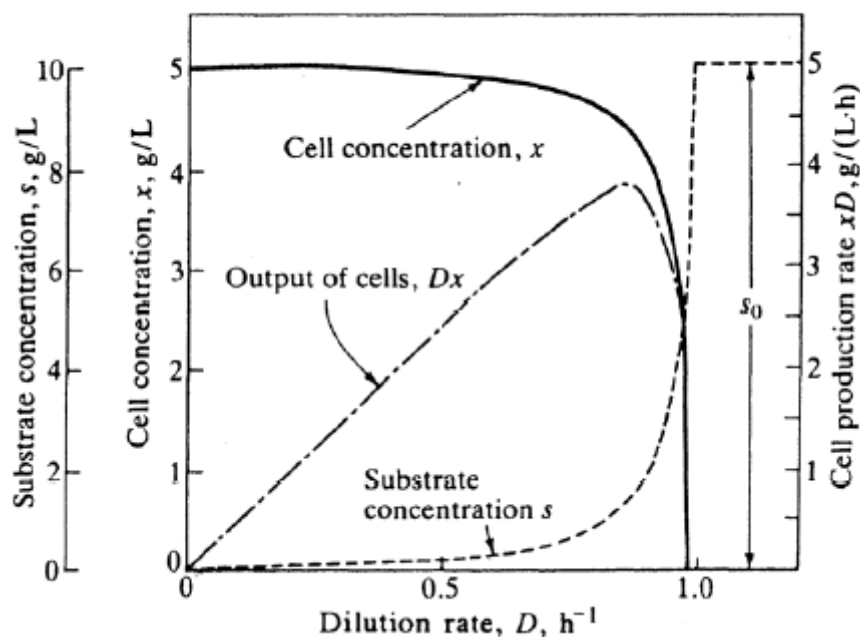


Figura 14: Dipendenza della concentrazione del substrato S, della concentrazione cellulare X, e della velocità di produzione cellulare xD in funzione della velocità di diluizione D per un chemostato di Monod.

Per valori molto bassi della portata a parità di volume del reattore (valori tendenti a zero di D) S tende a zero perché quasi tutto il nutriente contenuto nell'alimentazione è consumato dalle cellule. Man mano che D aumenta, S aumenta prima linearmente con D e poi più rapidamente fino a che la concentrazione di substrato dentro il reattore tende a quella alimentata e X tende a zero (wash-out).

Il valore critico di D per cui avviene il dilavamento delle cellule ($D_{\max}$) corrisponde al massimo valore per cui $X = X(D) = 0$ e cioè

$$S_0 - \mu \frac{D_{\max} K_m}{v_{\max} - D_{\max}} = 0$$

da cui

$$D_{\max} = \frac{\mu_{\max} S_0}{k_m + S_0}$$

Se come molto comunemente avviene $S_0 \gg K_m$, $D_{\max}$ è approssimabile con $\mu_{\max}$. Per valori di D prossimi a $D_{\max}$ il reattore diventa molto sensibile alle variazioni di D . Questa sensibilità deve essere considerata anche quando la produzione di massa cellulare è l'obiettivo principale della fermentazione. Infatti la velocità di produzione delle cellule per unità di reattore (DX) presenta un massimo con una forte pendenza negativa per D che tende a $D_{\max}$. Quindi la scelta di una produttività inferiore rispetto a quella massima potrebbe essere cautelativa rispetto alla possibilità che per effetto di perturbazioni esterne il sistema tenda verso il wash-out.

1.7 Passaggi di scala

La progettazione e realizzazione di un impianto di produzione biologica richiede una conoscenza profonda dei diversi meccanismi coinvolti nel processo che si vuole realizzare, come ad esempio le caratteristiche delle materie prime, le condizioni operative, i sistemi di sicurezza, le caratteristiche del prodotto desiderato, etc. Per raggiungere tale obiettivo è necessario effettuare uno scale-up del processo di interesse, ovvero incrementare la scala del processo desiderato dalla piastra fino al raggiungimento delle dimensioni necessarie per l'impianto pilota e successivamente per l'impianto vero e proprio. Si deve passare quindi dalla sperimentazione in laboratorio alla produzione su scala industriale.

Il passaggio da una scala all'altra è fondamentale per lo sviluppo di un processo industriale. Infatti per un qualsiasi processo non è detto che il fenomeno studiato in laboratorio produca gli stessi risultati o che sia funzione degli stessi parametri anche quando viene studiato su scala maggiore. I passaggi di scala a cui ci riferiamo sono i seguenti:

- Piastra
- Beuta
- Chemostato
- Fermentatori
- Impianto industriale

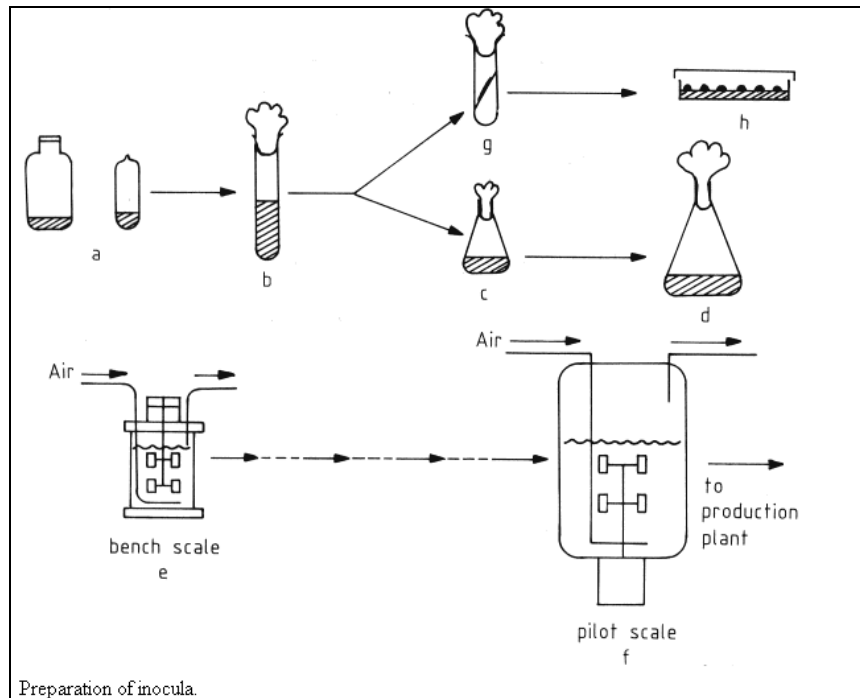


Figura 15: Passaggi di scala per fermentazioni.

1.7.1 Piastra

Questo tipo di sperimentazione permette di ottenere informazioni relative alla:

- selezione del microrganismo da utilizzare per la produzione di un dato metabolita
- tipi di nutrienti da utilizzare
- condizioni nel microambiente

E' possibile quindi ottimizzare la condizione di:

- Crescita (tipo di terreno; parametri che la influenzano)
- Produzione di metaboliti (rese; ottimizzazione condizioni)

In questa fase si ottengono solo informazioni qualitative.

1.7.2 Beuta

Il micelio viene portato a questo punto in beuta. In beuta possiamo ottenere invece delle informazioni quantitative. Si ottiene una buona conoscenza anche della stechiometria delle reazioni biologiche. La stechiometria batterica permette di conoscere la relazione tra:

- consumo di substrato in base al tipo di biomassa
- prodotti di reazione (metaboliti)
- biomassa

1.7.3 Batch

Si fa crescere il micelio in un sistema batch, dal quale si ottengono le prime informazioni relative alla cinetica di crescita. Conoscendo la concentrazione iniziale di substrato e la concentrazione iniziale di biomassa, e facendo variare $\bar{\mu}$, K, m e Y, è possibile ottenere informazioni circa le condizioni ottimali per la crescita. Questi risultati sono però approssimativi perché la popolazione è di tipo colonizzante.