

Coltivazione dei microrganismi

Nella messa a punto di un processo di fermentazione, in laboratorio o su scala industriale, occorre definire il microrganismo di interesse e trovare i canali commerciali per procurarlo in condizioni vitali.

Collezioni di colture

In tutto il mondo esistono parecchie organizzazioni la cui funzione principale è mantenere colture pure autentiche sia di batteri sia di altri microrganismi (lieviti, muffe, alghe protozoi, virus) e di cellule animali. La prima collezione nota di colture tipo, la collezione Kral, fu istituita a Praga intorno al 1900. L'American Type Culture Collection (ATTC) è a Rockville, nel Maryland. In Francia una collezione di colture batteriche è mantenuta nell'istituto Pasteur a Parigi; La British National Collection of Type Cultures è a Londra; la Japanese Type Culture Collection è nell'istituto Nagao di Tokyo, la Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH tedesca, che raccoglie circa 40.000 ceppi tra batteri, funghi, cellule umane e animali, virus.

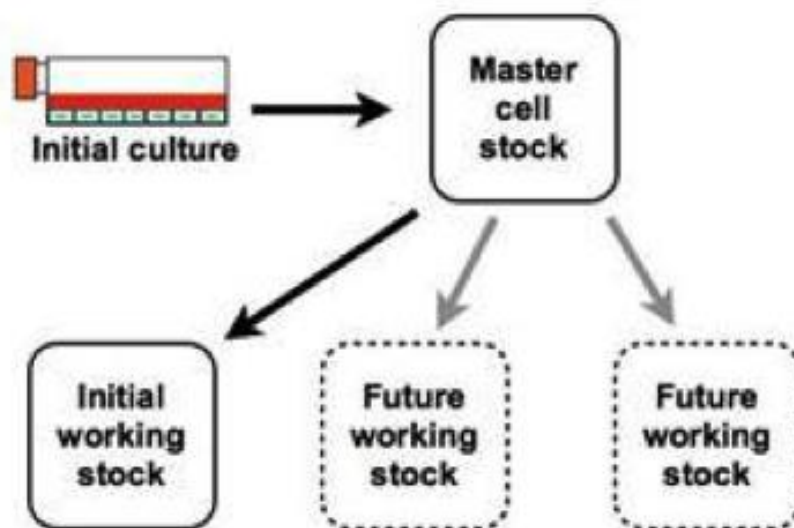
Esse sono soltanto alcune delle grandi collezioni nazionali che sono mantenute in vari paesi. L'ATTC comprende più di 17000 ceppi di batteri, funghi, alghe, protozoi, linee di cellule animali e virus. Più di mezzo milione di ampole di campioni liofilizzati o congelati sono immagazzinate in refrigeratori meccanici a - 60°C in camere fredde a 5°C o in refrigeratori a azoto liquido a -196°C. Molte altre collezioni sono mantenute in varie parti del mondo per soddisfare varie necessità. Per esempio, negli Stati Uniti la Northern Utilization Research and Development Division (USDA), a Peoria (Illinois), mantiene una collezione di lieviti, muffe e batteri che sono impiegati soprattutto nelle fermentazioni; il Quartermaster Research and Development Center dell'U.S. Army a Natick (Massachusetts), mantiene una collezione di colture soprattutto dei tipi associati ai processi di deterioramento. Inoltre a Losanna esiste il centro internazionale per l'informazione e la distribuzione delle colture tipo finanziato dall'UNESCO, che fornisce un servizio d'informazioni e servendosi del suo catalogo delle collezioni mantenute in tutto il mondo, tenta di localizzare qualunque coltura venga richiesta. Le collezioni di colture svolgono un ruolo indispensabile per i microbiologi mettendo a loro disposizione una grande varietà di specie e di ceppi per il lavoro sperimentale.

I microrganismi quando crescono su un terreno di laboratorio sono chiamati cultura.

Una coltura pura è costituita da una popolazione di cellule derivate da un'unica cellula madre. La coltura pura rappresenta una condizione artificiale per l'accrescimento di batteri ed altri

microrganismi ed è una condizione imposta ai microrganismi da manipolare in laboratorio. Allo studio delle colture pure è associato il problema di mantenerle per vari intervalli di tempo in una condizione vitale. Rispetto alla coltura pura acquistata presso una banca di microrganismi, in laboratorio è sempre necessario creare una riserva con cui poi realizzare le prove sperimentali.

La maggior parte dei laboratori mantiene una collezione propria di queste colture, chiamata **master stock (master cell bank)**. Questi organismi sono necessari per come riserva di prima generazione e correttamente identificate. Ogni laboratorio naturalmente, manterrà una collezione di colture secondo le sue necessità e i suoi principali interessi, sia d'insegnamento sia di ricerca.



Dalla master stock vengono prodotte le cosiddette **working stock (working cell bank)**, una riserva per uso corrente. Le working stock sono colture su agar (slant o piastre), mantenute in frigo a 0-4°C e rinnovate di frequente.

Vaste ricerche sono state eseguite per sviluppare migliori condizioni per la conservazione dei batteri. Poiché non tutte le specie reagiscono in maniera analoga a una particolare condizione o ad un particolare processo, ciò che è stato appreso per una coltura non può essere applicabile ad un'altra. È essenziale che il metodo di conservazione e mantenimento preservi tutte le caratteristiche della specie quali erano nel momento della conservazione.

Alcune delle tecniche utilizzate per la conservazione prevedono la liofilizzazione o la conservazione a bassa o bassissima temperatura su terreno solido o liquido.

Conservazione delle colture mediante essiccazione rapida dello stato di congelamento (liofilizzazione)

La liofilizzazione è il procedimento più efficace per la conservazione delle colture.

Infatti, molte specie di batteri conservate con questa tecnica sono rimaste vitali e invariate per più di venti anni. In questo processo, le cellule vengono essiccate rapidamente, dopo congelamento, mediante le seguenti operazioni. La sospensione di cellule è collocata in piccole fiale, che vengono poi immerse in una miscela di ghiaccio secco e alcol (-78°C) oppure azoto liquido (-196°C). Le fiale vengono subito collegate in un impianto per alto vuoto e, quando l'essiccazione è completa, vengono sigillate singolarmente sotto vuoto. I notevoli vantaggi di questa tecnica sono la sopravvivenza a lungo termine, una minore possibilità di variazione dei caratteri della coltura e la piccolezza dei recipienti di immagazzinamento (fiale).

La liofilizzazione o crioesiccamento o freeze drying consiste nella disidratazione per sublimazione di prodotti previamente congelati, in particolari condizioni di temperatura (< 0 °C) e pressione (sottovuoto).

Nella liofilizzazione si ottengono polveri con un peso ridotto del 92%, che si conservano a lungo, che tendono a reidratarsi rapidamente riacquistando caratteristiche del tutto simili a quelle del prodotto fresco: il termine liofilizzazione deriva da liofilo, ossia "affine al solvente", per la forte tendenza dei prodotti liofilizzati a reidratarsi.

Conservazione a bassissime temperature (criovials)

La facile reperibilità dell'azoto liquido (-196°C) ha offerto al microbiologo un altro mezzo per mantenere le colture. In questo procedimento le cellule sono congelate insieme ad un agente crioprotettivo. I campioni congelati sono conservati in refrigeratori ad azoto liquido. Il mantenimento delle colture con azoto liquido si è rivelato molto soddisfacente: tutte le colture che possono essere mantenute in maniera soddisfacente mediante liofilizzazione possono essere mantenute altrettanto bene con l'azoto liquido. Inoltre, il processo di congelamento in azoto liquido si è dimostrato efficace con molti campioni che non possono essere mantenuti mediante liofilizzazione.

I crioprotettivi sono sostanze organiche che vengono aggiunte alla sospensione cellulare prima del congelamento per minimizzare la mortalità delle cellule a seguito dell'abbassamento della temperatura.

Tali sostanze si dividono in due gruppi, a seconda della modalità di azione:

CRIOPROTETTIVI PENETRANTI (i.e., etilenglicole, DMSO)

CRIOPROTETTIVI NON PENETRANTI (i.e., glicerolo, macromolecole, zuccheri)

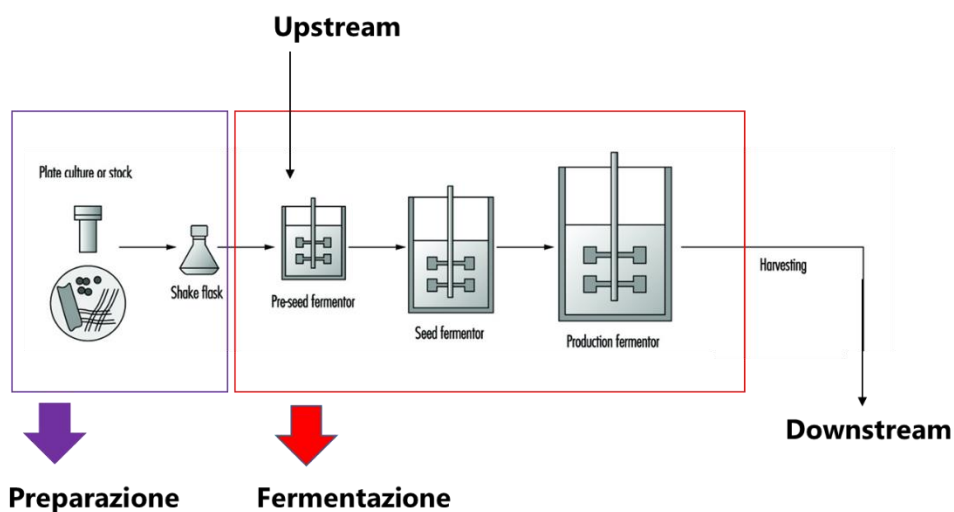
I primi agiscono penetrando la membrana cellulare e abbassando la temperatura di congelamento dell'acqua intracellulare (proprietà colligativa dei soluti). I secondi agiscono mantenendosi all'esterno della membrana ma favorendo la fuoriuscita dell'acqua intracellulare a causa dell'aumento della pressione osmotica verso l'esterno della cellula.

Il danno che le cellule subiscono a seguito del raffreddamento è dovuto alla formazione di piccoli cristalli di ghiaccio che compromettono le strutture cellulari.

Durante il raffreddamento una gran parte delle cellule comunque non sopravvive, ma la presenza di un crioprotettivo permette di mantenere il livello di sopravvivenza intorno al 20-40%. Una volta ripristinate le condizioni ambientali, le cellule sono in grado di moltiplicarsi e crescere.

COLTIVAZIONE DEI MICRORGANISMI E ALLESTIMENTO DI UN PROCESSO FERMENTATIVO

Lo schema generale di un processo fermentativo è riportato in figura:



Esso prevede:

- ↪ una fase di preparazione dell'inoculo con passaggi scalari di volume
- ↪ una fase di fermentazione produttiva
- ↪ una fase di UPSTREAM_preparazione del bioreattore (i.e., sterilizzazione, riempimento del terreno, verifica dei sistemi di controllo)
- ↪ una fase di DOWNSTREAM_recupero dei prodotti di fermentazione e disallestimento del reattore

Preparazione dell'inoculo

Si parte dal microorganismo allo stato di conservazione, liofilizzato o congelato, e lo si fa sviluppare in varie fasi seguendo una procedura scalare. Da una riserva di *working stock* si portano le cellule in terreno liquido (100 ml) utilizzando una beuta incubata su piano agitato per 12-24 ore (beuta vegetativa).

Si ottiene così l'inoculo primario che viene utilizzato per inoculare un piccolo fermentatore da un litro al fine di ottenere l'inoculo secondario (10 litri) e così via.... Normalmente in laboratorio la procedura non supera queste due fasi e con l'inoculo secondario si procede all'inseminazione del fermentatore di produzione (fase produttiva). A livello industriale, invece lo scale-up dell'inoculo può essere ulteriore tenendo comunque presente che il volume dell'inoculo da una cultura liquida ad un'altra corrisponde di solito al 10% del volume effettivo del fermentatore successivo e in ogni caso non deve essere in genere minore al 5%. In ogni fase occorre controllare la coltura per assicurarsi che non vi siano inquinanti.

Si parla di SCALE UP come dell'insieme di operazioni necessarie per preparare un inoculo per fermentatori industriali partendo da colture *working stock* (piccoli volumi). Si intende per livello di inoculo quel volume di sospensione di microrganismi che si deve prelevare da un fermentatore più piccolo per inoculare in un recipiente più grande. Può variare mediamente dal 5 al 10 % del volume utile del fermentatore di arrivo. E' fondamentale che il terreno su cui si fa lo scale up sia lo stesso del fermentatore per ridurre il più possibile la fase di latenza.

Fermentazione produttiva

Il fermentatore, o bioreattore, è un recipiente a elevata capacità all'interno del quale avvengono le trasformazioni biochimiche sulla materia prima ad opera delle cellule o degli estratti cellulari (enzimi). La forma deve essere tale da non permettere l'accumulo di nutriente in certe zone piuttosto che in altre, dove potrebbero proliferare microrganismi contaminanti sopravvissuti alla sterilizzazione. Infatti è generalmente cilindrica senza anfratti e con la massima limitazione di giunzioni e connessioni; abitualmente il fermentatore è progettato con sviluppo verticale per avere minore superficie libera. Attualmente si costruiscono anche fermentatori di forma sferoidale perché si riducono i danni alle cellule, si riduce la possibilità di formazione di focolai, si aumenta la capacità. I materiali usati per la costruzione dei bioreattori devono essere inerti rispetto alla massa fermentante e inossidabili.

UP STREAM

Prima che l'azione dei microrganismi (fermentazione) abbia inizio, è necessario che la materia prima (scarti agro-industriali, biomasse di varia origine, sostanze amidacee, ecc ecc) sia opportunamente "preparata", cioè portata nelle migliori condizioni che garantiscono lo sviluppo degli agenti biologici responsabili del processo.

L'upstream può comprendere diverse fasi, a seconda del tipo di processo, del tipo di materia prima, del tipo di microorganismo e dal prodotto che si vuole ottenere. In generale, i principali processi di upstream riguardano:

- la sterilizzazione del fermentatore
- la preparazione e/o eventuali pretrattamenti del terreno (i.e., delignificazione delle biomasse, filtrazioni, concentrazioni, diluizioni)

DOWNSTREAM

Al termine del processo fermentativo, a seconda che lo scopo sia recuperare biomassa cellulare (es. produzione di lievito) o una specifica molecola organica, il processo di purificazione prevede che tali sostanze siano separate dagli altri componenti, in modo controllato e ottimale, per ottenere il prodotto desiderato in forma pura, secondo le specifiche definite dal mercato o dalla normativa.

Esistono diverse metodiche di tipo chimico-fisico e diverse tecnologie disponibili. La fase di downstream è estremamente versatile e adattabile a diverse esigenze. La scelta delle operazioni più adatte viene fatta in base alle specifiche del prodotto che volete ottenere. Può comprendere operazioni di filtrazione, evaporazione del solvente, cristallizzazione, purificazione su colonna, ecc. ecc. Lo scopo è quello di ottenere il prodotto (o le cellule) al grado di purezza richiesto.

In un processo fermentativo di tipo BATCH (chiuso/discontinuo) le cellule si sviluppano all'interno del reattore secondo il modello cinetico della crescita microbica seguendo la curva di crescita e le sue diverse fasi.

Ciò comporta che inevitabilmente durante il processo le fasi produttive siano limitate da fasi non produttive. Al fine di ottimizzare la resa e la produttività del processo sono state messe a punto alcune strategie di fermentazione che superano il semplice processo discontinuo:

- FERMENTAZIONE REPEATED-BATCH (batch ripetuta)
- CONTINUA
- CONTINUA CON RICICLO (FEED-BACK)

- FED-BATCH (batch alimentata)
- REPEATED FED-BATCH (batch alimentata ripetuta)

Condizioni che influenzano l'accrescimento

I microrganismi possono crescere in condizioni molto differenziate. I fattori che influenzano la crescita sono fisici e chimici.

Fattori fisici

➤ La temperatura

Abbiamo le seguenti categorie di microrganismi a seconda della temperatura di crescita.

Tabella 9.1 Classificazione dei microorganismi in base alla dipendenza dalla temperatura della velocità di crescita			
Gruppo	Temperatura in °C		
	Minima	Ottimale	Massima
Termofili	da 40 a 45	da 55 a 75	da 60 a 80
Mesofili	da 10 a 15	da 30 a 45	da 35 a 47
Psicrofili:			
Obbligati	da -5 a +5	da 15 a 18	da 19 a 22
Facoltativi	da -5 a +5	da 25 a 30	da 30 a 35

Le variazioni di temperatura incidono in diverse fasi dei processi metabolici: aumentando la temperatura si ha un'accelerazione di tutte le reazioni chimiche e del trasporto di massa. D'altra parte temperature molte elevate portano a denaturazione delle proteine e quindi morte cellulare.

Per questo motivo si rende quasi sempre necessario fornire o sottrarre calore in modo da mantenere le condizioni ottimali e questo avviene con **scambiatori di calore**.

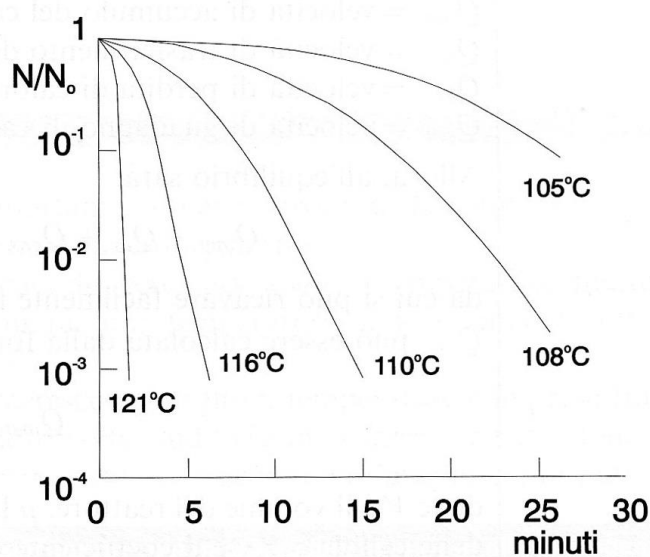
Il costo della rimozione del calore costituisce una parte rilevante dei costi di fermentazione.

Tabella 9.2 Incidenza percentuale di alcune operazioni sul costo totale

Substrato	Costo percentuale		
	Substrato	Aereazione	Rimozione del calore
Maleato (da scarichi)	0	38	62
Zuccheri (da melasse)	83	5	12
Paraffine	63	15	22
Metanolo	62	15	23
Metano	19	38	43
Etanolo	80	7	13
Isopropanolo	67	16	17
Acetato	91	3	6

La capacità del calore di uccidere i microrganismi viene sfruttata nella fase di sterilizzazione che precede qualsiasi fermentazione.

Nel grafico seguente sono riportate le velocità di morte di *E. coli* a diverse temperature.



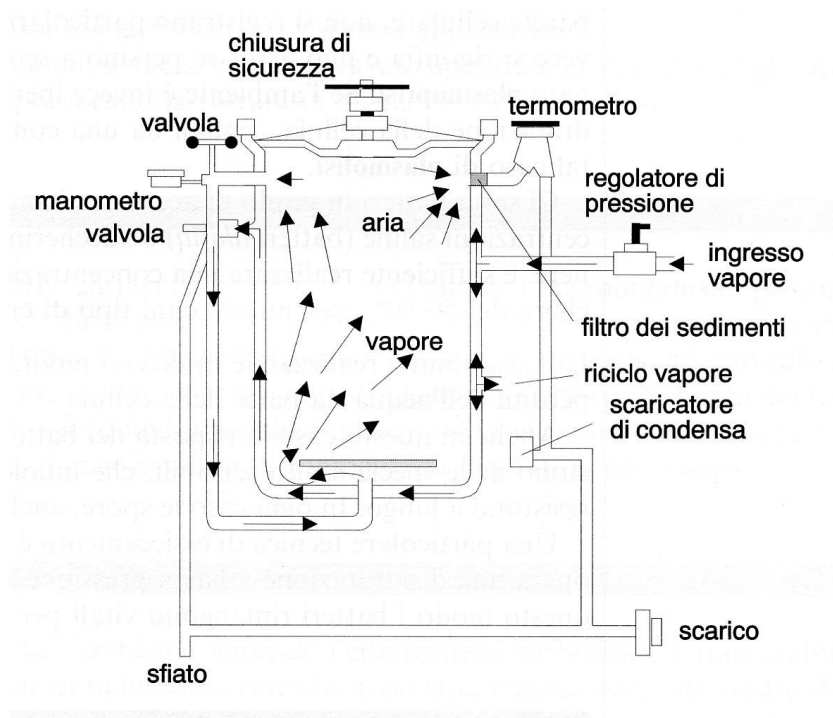
Sterilizzazione a secco

Si usa una stufa a circolazione di aria forzata scaldando a 160-170°C per due o più ore.

La procedura più usata è però la

Sterilizzazione a umido

Questa operazione è condotta in autoclave alla temperatura di 115-121°C e alla pressione di 2 atm. Il calore umido è molto più efficiente del calore secco perchè provoca la coagulazione e la denaturazione delle proteine e quindi degli acidi nucleici nel giro di 12-45 min (di solito 20 min).



➤ Pressione osmotica

L'acqua indispensabile per la vita di qualsiasi microrganismo contiene sostanze disciolte tali che difficilmente un batterio si trova in condizioni isotoniche.

Se l'ambiente è ipotonico per la cellula procariote, in possesso di membrana, non ci sono particolari problemi, mentre la cellula eucariote si rigonfia fino a scoppiare (**plasmoptisi**).

Se l'ambiente è ipertonico si ha una disidratazione della cellula, seguita da una contrazione (**plasmolisi**).

Ci sono batteri in grado di accrescersi in condizioni di elevata concentrazione salina (alofili) o zuccherina (saccarofili) ma in genere è sufficiente una concentrazione di sale del 10-15% o di zucchero del 50-60% per inibire ogni tipo di crescita.

➤ Radiazioni

Gli organismi fototrofi hanno bisogno di luce per crescere. Radiazioni a lunghezza d'onda superiore (meno energetiche) non mostrano effetto sui microrganismi, mentre radiazioni UV ed X provocano mutazioni e morte.

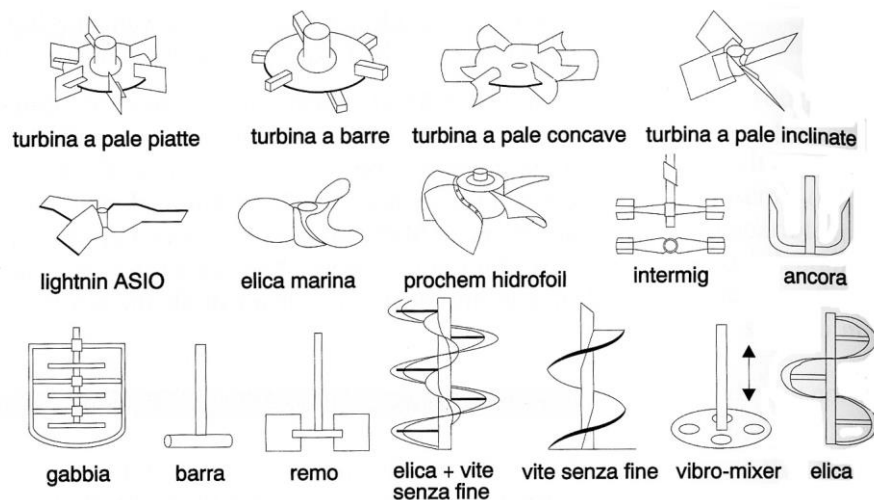
➤ Viscosità

La viscosità influenza la velocità con cui i microrganismi entrano in contatto con i nutrienti. In un mezzo particolarmente viscoso diventa difficile lo scambio gassoso. E' necessario prevedere quale sia la viscosità del mezzo per avere una fermentazione efficiente.

➤ Turbolenza

La turbolenza, provocata dall'agitazione necessaria in un fermentatore, influenza poco i batteri provvisti di membrana ma può provocare danni agli eucarioti. Quindi flussi gassosi ed agitazione vanno opportunamente regolati.

Per ottenere una buona aerazione è sempre necessario applicare una buona agitazione meccanica. Gli strumenti sono molti.



Effetti positivi dell'agitazione:

- l'alta pressione dinamica vicino all'agitatore provoca la dispersione dell'aria in piccole bolle aumentando l'interfaccia gas-liquido
- le colture possono contenere solidi in sospensione e questi vengono uniformemente dispersi
- viene ridotta la dimensione massima delle particelle (miceli) aumentando l'omogeneità del sistema

- ottimo mescolamento della sospensione cellulare

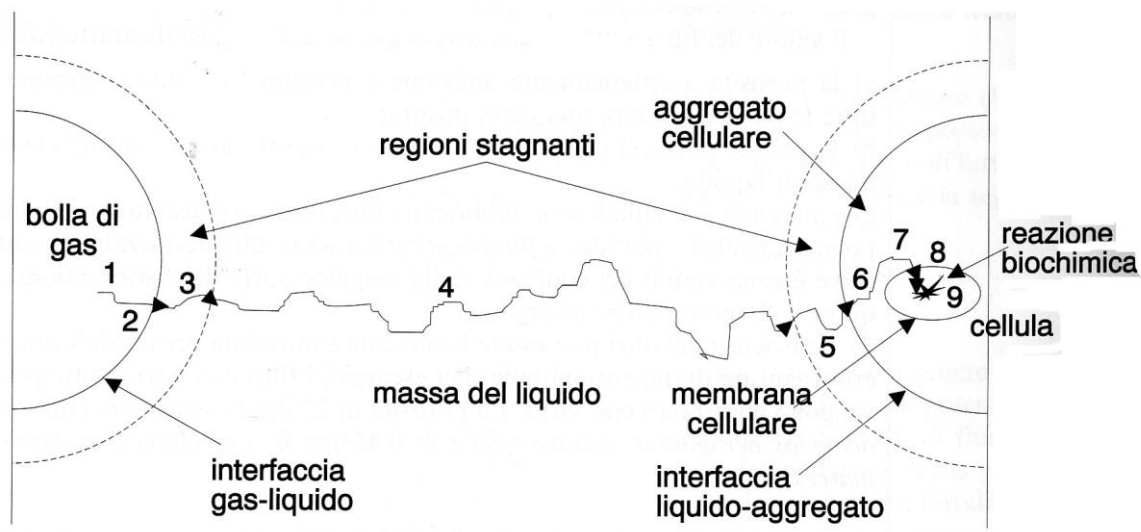
Fattori chimici

- **Esigenze gassose**

I gas che influenzano la crescita microbica sono l'ossigeno e l'anidride carbonica. Esistono organismi

- **aerobi** che richiedono ossigeno,
- **anaerobi** che richiedono l'assenza di ossigeno,
- **anaerobi facoltativi** che si accrescono comunque, e
- **microaerofili** che richiedono la presenza di piccole quantità di ossigeno.

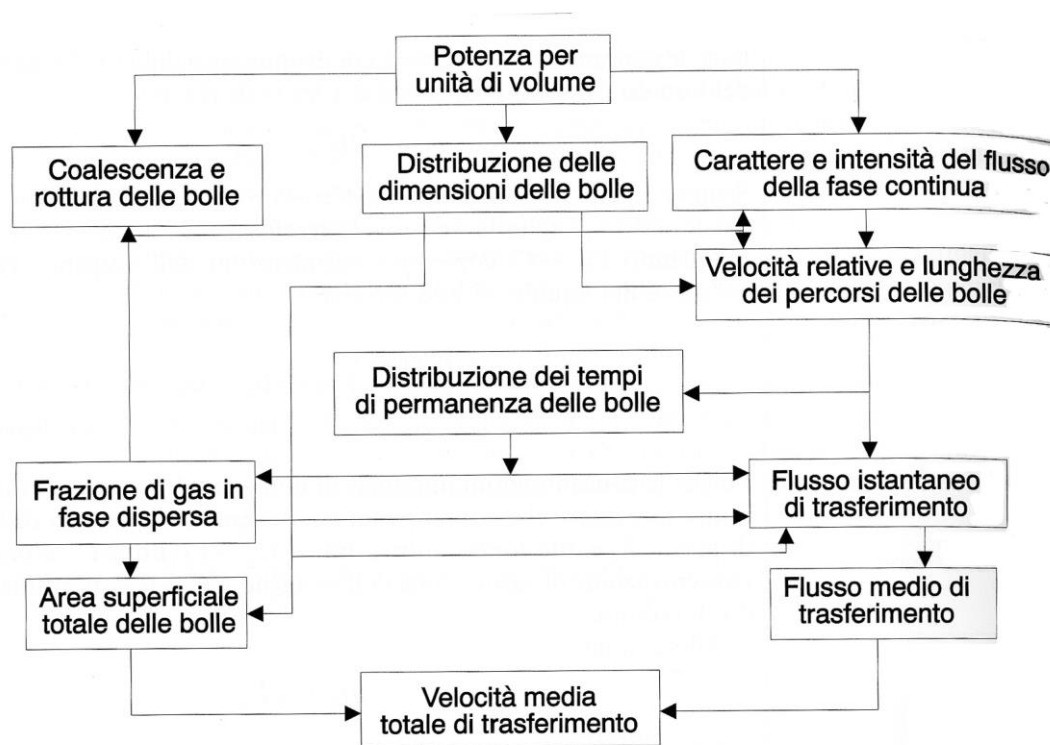
Il trasferimento di ossigeno ad una cellula è ostacolato da diversi fattori:



1. diffusione dall'interno della bolla all'interfaccia
2. Passaggio attraverso l'interfaccia
3. diffusione dalla zona stagnante immediatamente vicino alla bolla
4. diffusione nella massa del liquido ben agitato
5. diffusione dalla zona stagnante immediatamente vicino alla cellula
6. superamento dell'interfaccia liquido-aggregato di cellule
7. diffusione all'interno della cellula
8. superamento della membrana cellulare
9. diffusione nella cellula per raggiungere il sito di reazione

Il consumo di ossigeno è espresso in g/L·h ed è di solito centinaia di volte superiore al valore di saturazione e quindi è necessario aggiungerlo continuamente.

Ci sono tutta una serie di relazioni fra la potenza dell'agitazione e le risultanti velocità di trasferimento del gas.



➤ pH

In genere il pH ottimale è tra 6.5-7.5, ma ci sono specie acido-resistenti che vivono addirittura a pH 2-3. Spesso quando si coltivano microrganismi vengono prodotte sostanze che variano il pH del terreno di coltura e quindi insieme ai nutrienti è necessario usare tamponi.

➤ sostanze chimiche

Molte sostanze chimiche influenzano la crescita dei microrganismi interferendo con meccanismi diversi. Ad esempio fenoli ed alcoli causano denaturazione delle proteine, gli alogeni sono battericidi per il loro potere ossidante e infine la formaldeide agisce grazie alle sue proprietà alchilanti.