

# CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI

## Le strategie di fermentazione: descrizione

AA: 2020/2021

Dott.ssa Stefania Costa

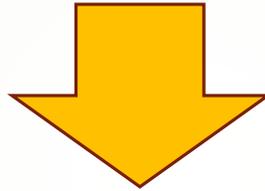
# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE BATCH

- Processo discontinuo che avviene in un sistema chiuso.
- Tra inoculo e scarico non ci sono più scambi di materiale con l'esterno.
- Tutta la fonte carboniosa è impiegata per la biosintesi di nuove cellule o prodotti (assimilazione) o per il mantenimento cellulare (dissimilazione).
- L'andamento di X, P, S segue l'andamento fisiologico del metabolismo cellulare.
- Non si può evitare la fase di latenza.
- Se il metabolita target è primario, si può interrompere la fermentazione non appena la crescita entra in fase stazionaria.

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

La tipologia di fermentazione che segue la fisiologia del microrganismo (l'andamento della fermentazione è regolato dalla curva di crescita microbica) è la FERMENTAZIONE BATCH



Elevati ed inevitabili tempi non produttivi!!!!



Tutte le **strategie** di fermentazione sono un tentativo di superare i limiti della fisiologia microbica per aumentare il TEMPO PRODUTTIVO riducendo i TEMPI MORTI

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

Le strategie di fermentazione consentono di ovviare a molti di questi svantaggi:

- annullamento o riduzione consistente dei tempi morti,
- uso di reattori di dimensioni minori e pertanto più facilmente controllabili.

## **SISTEMI APERTI**

(consentono lo scambio di materiali con l'esterno durante il processo)



Sono in grado, attraverso alcune strategie fluidodinamiche (giocando su parametri come volume e portata), di aumentare il tempo produttivo totale del processo

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

**I. REPEATED BATCH**

**II. CONTINUA**

**III. CONTINUA CON RICICLO (FEED-BACK)**

**IV. FED-BATCH**

**V. REPEATED FED-BATCH**

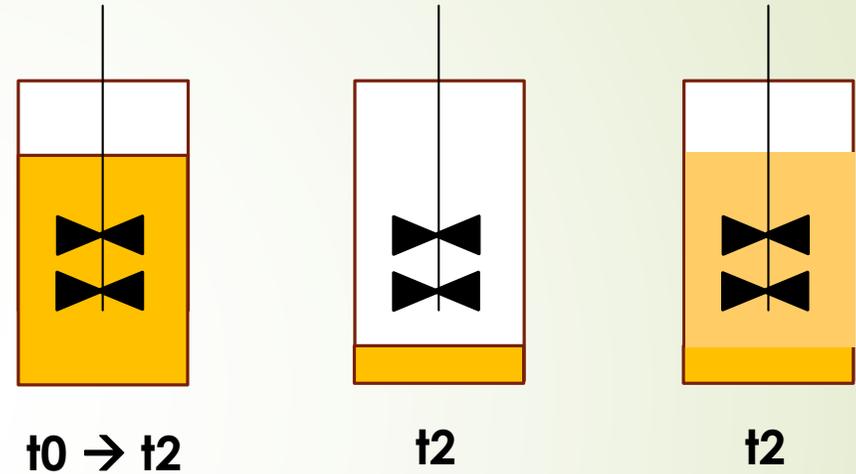
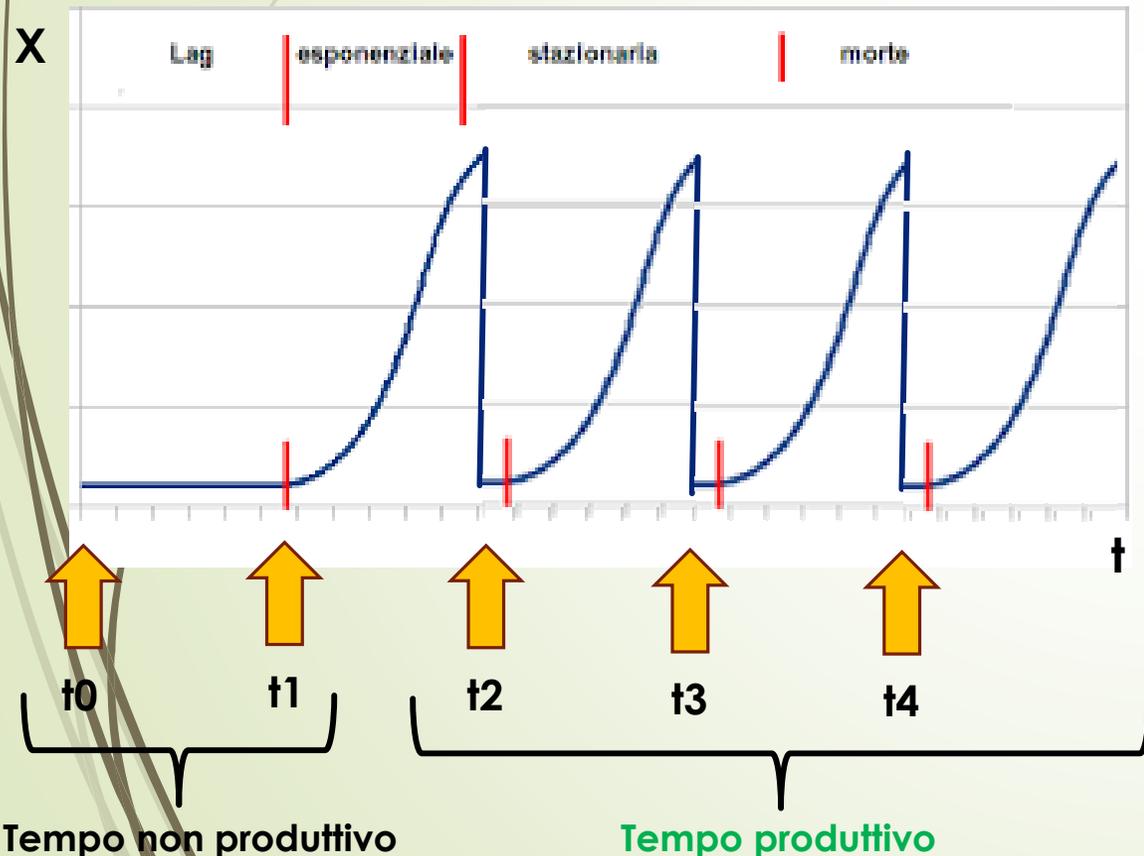
## **IPOSTESI:**

- la velocità specifica di crescita è influenzata solo dalla concentrazione del substrato limitante – fonte carboniosa - (equazione di Monod),
- tutte le altre condizioni ambientali (pH, temperatura, ossigeno disciolto, osmolarità) siano nell'intervallo ottimale per la crescita.

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE REPEATED-BATCH

Es. produzione metabolita primario



### OPERAZIONI AL $t_2$ :

$t_2$  = svuotamento del brodo+cellule tranne il 10%

$t_2$  = inserimento di terreno fresco fino al ripristino del volume

$X$  diminuisce per effetto della diluzione con terreno fresco

### OPERAZIONI AL $t_3$ :

$t_3$  = svuotamento del brodo+cellule tranne il 10%

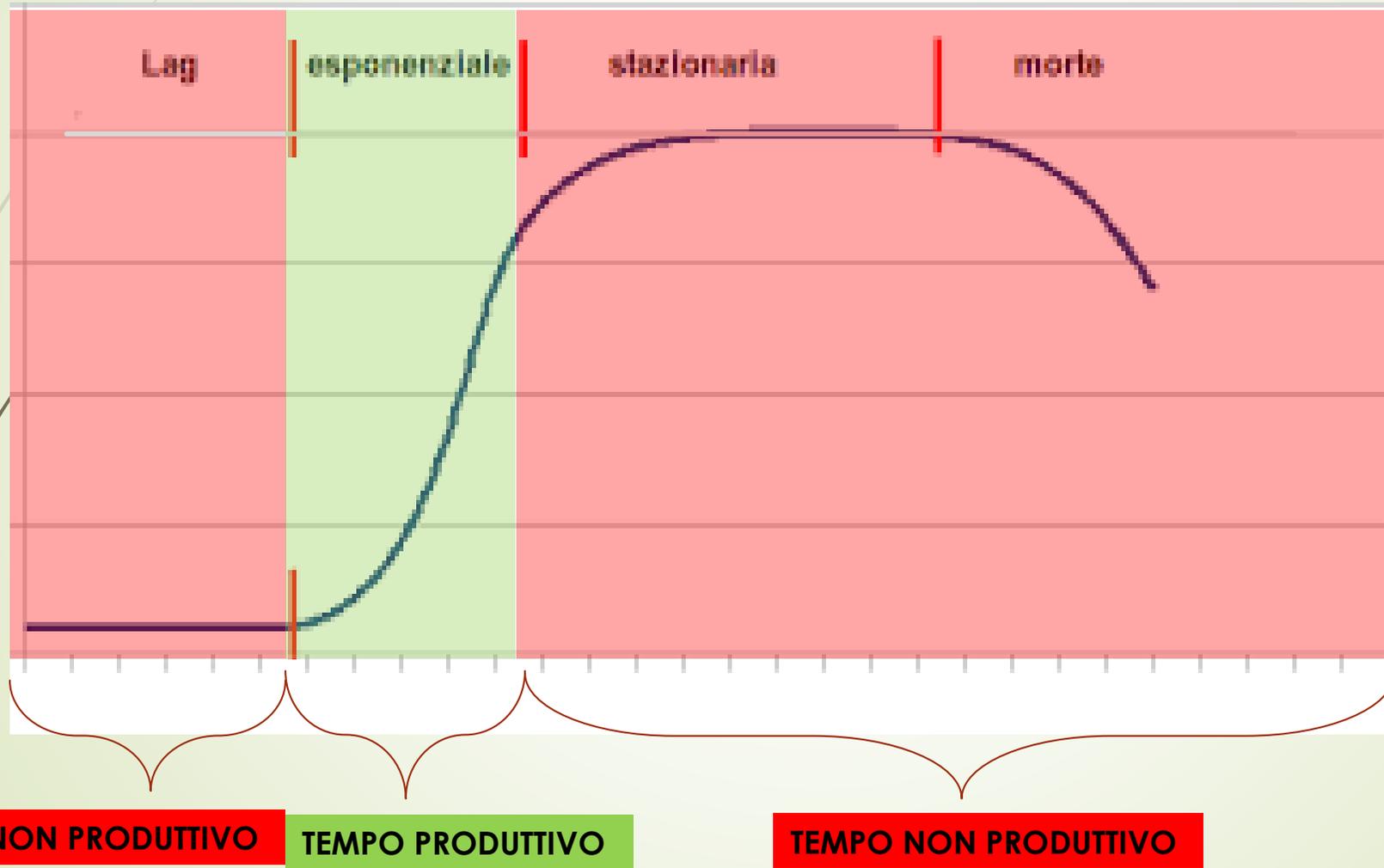
$t_3$  = inserimento di terreno fresco fino al ripristino del volume

$X$  diminuisce per effetto della diluzione con terreno fresco

### OPERAZIONI AL $t_4$ : ...

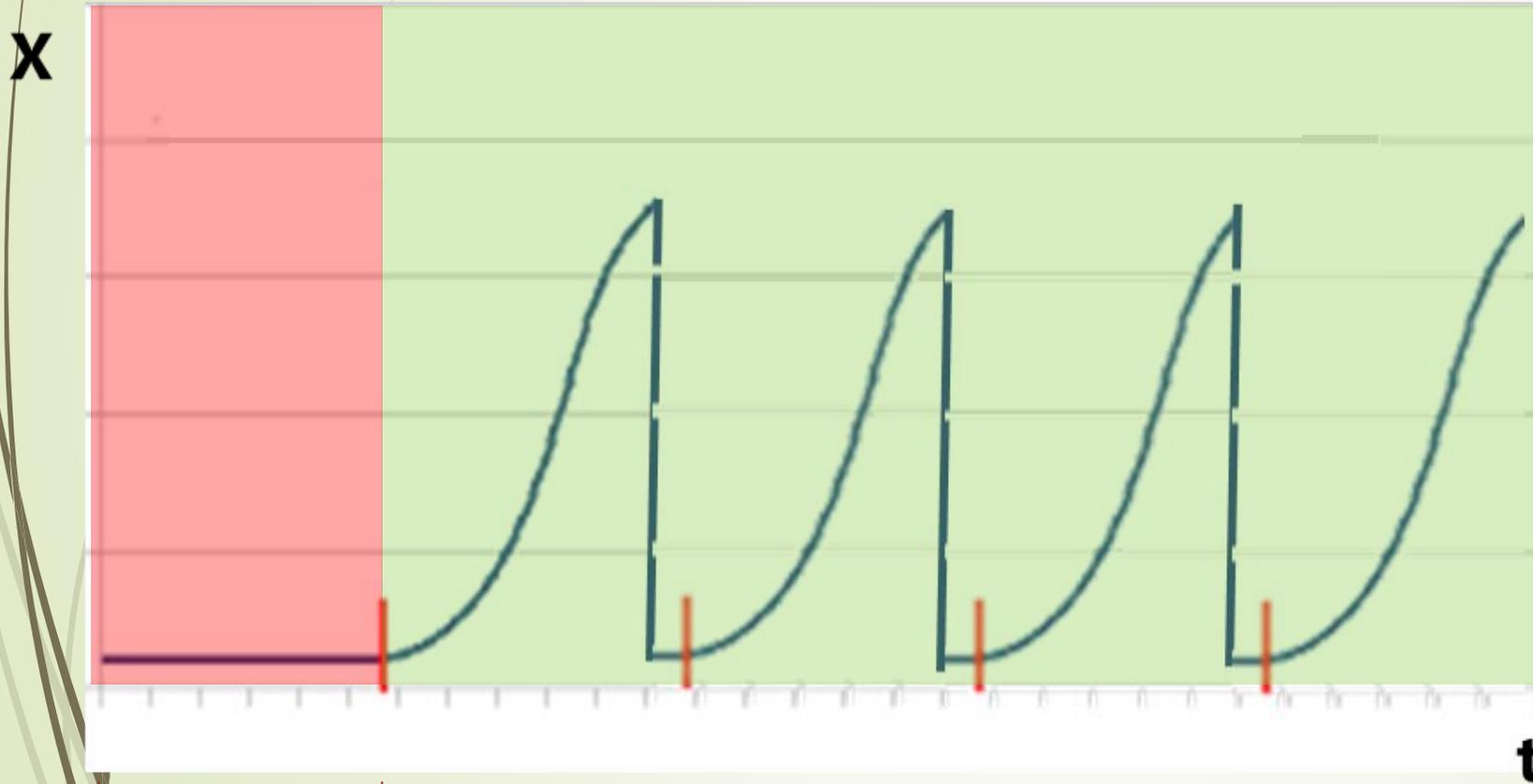
# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## BATCH



# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## REPEATED-BATCH



TEMPO NON PRODUTTIVO

TEMPO PRODUTTIVO



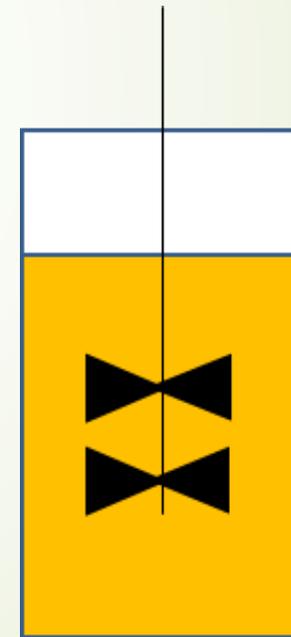
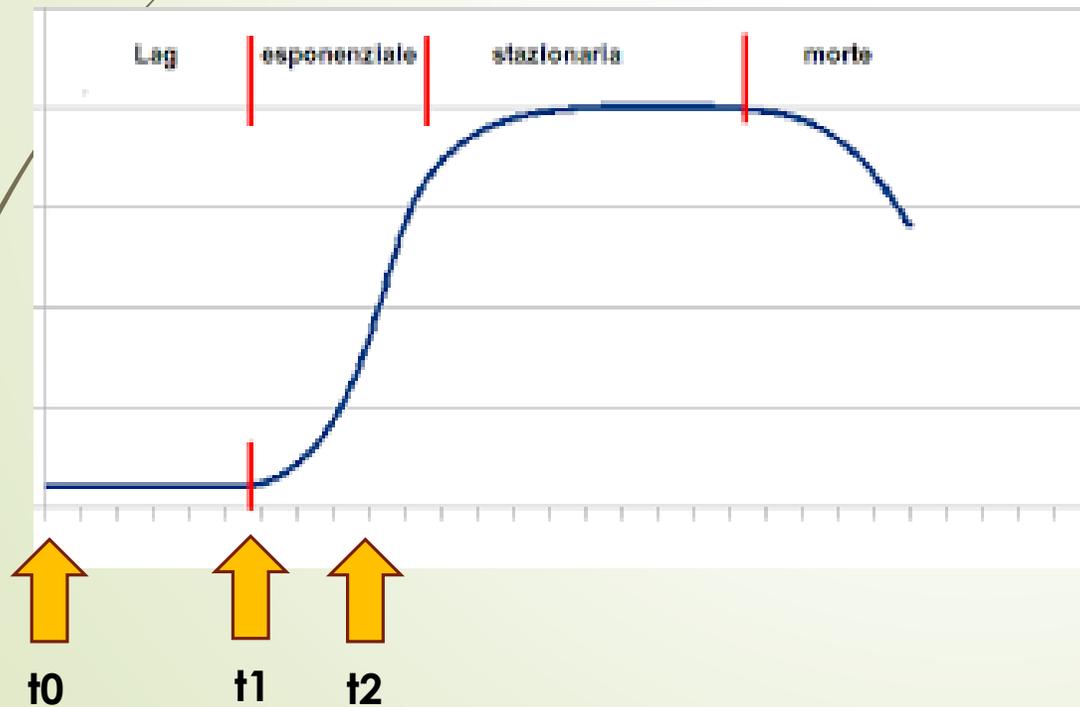
### Svantaggio repeated batch:

Aumento del rischio di contaminazione a causa delle numerose operazioni di riempimento e svuotamento del fermentatore attraverso l'inserimento di tubi e aghi, che possono veicolare microrganismi non voluti all'interno.

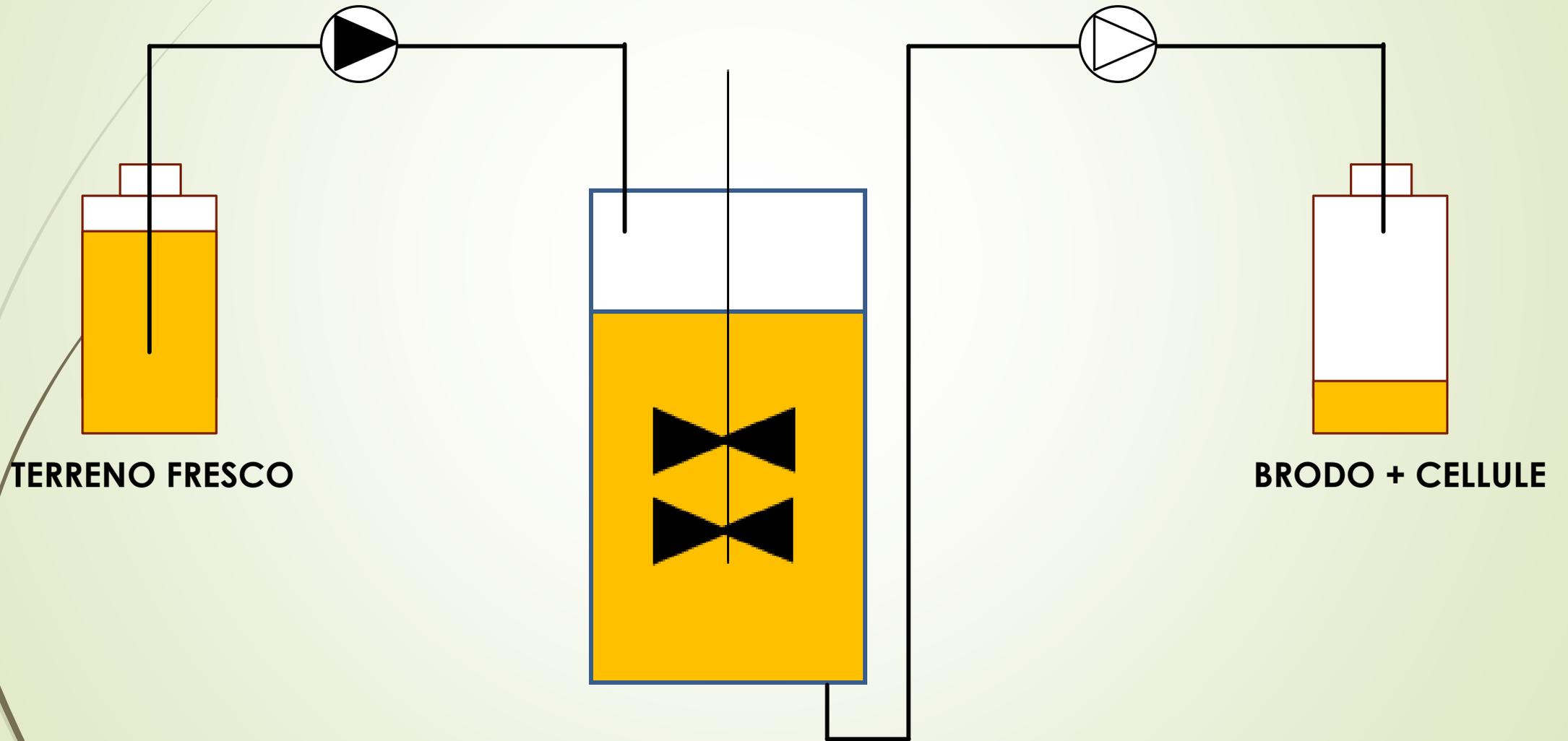
# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE CONTINUA

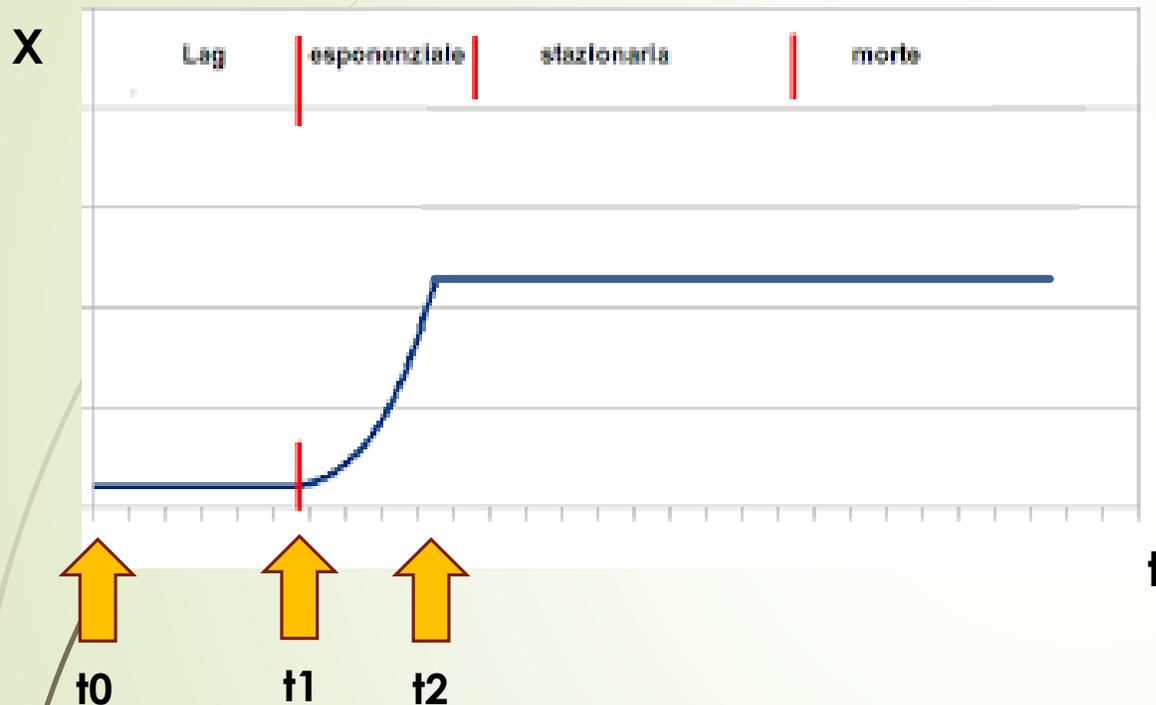
sistema **aperto** dove viene fornito continuamente terreno fresco sterile alla coltura ben agitata ad una **velocità di flusso di ingresso uguale a quella con cui si toglie brodo esausto**, contenente cellule, prodotti metabolici ed eventuali nutrienti non consumati, in modo da **mantenere costante il volume** all'interno del fermentatore



# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



## OPERAZIONI AL t2:

t2= attivazione ingresso terreno fresco  
t2= attivazione uscita brodo + cellule



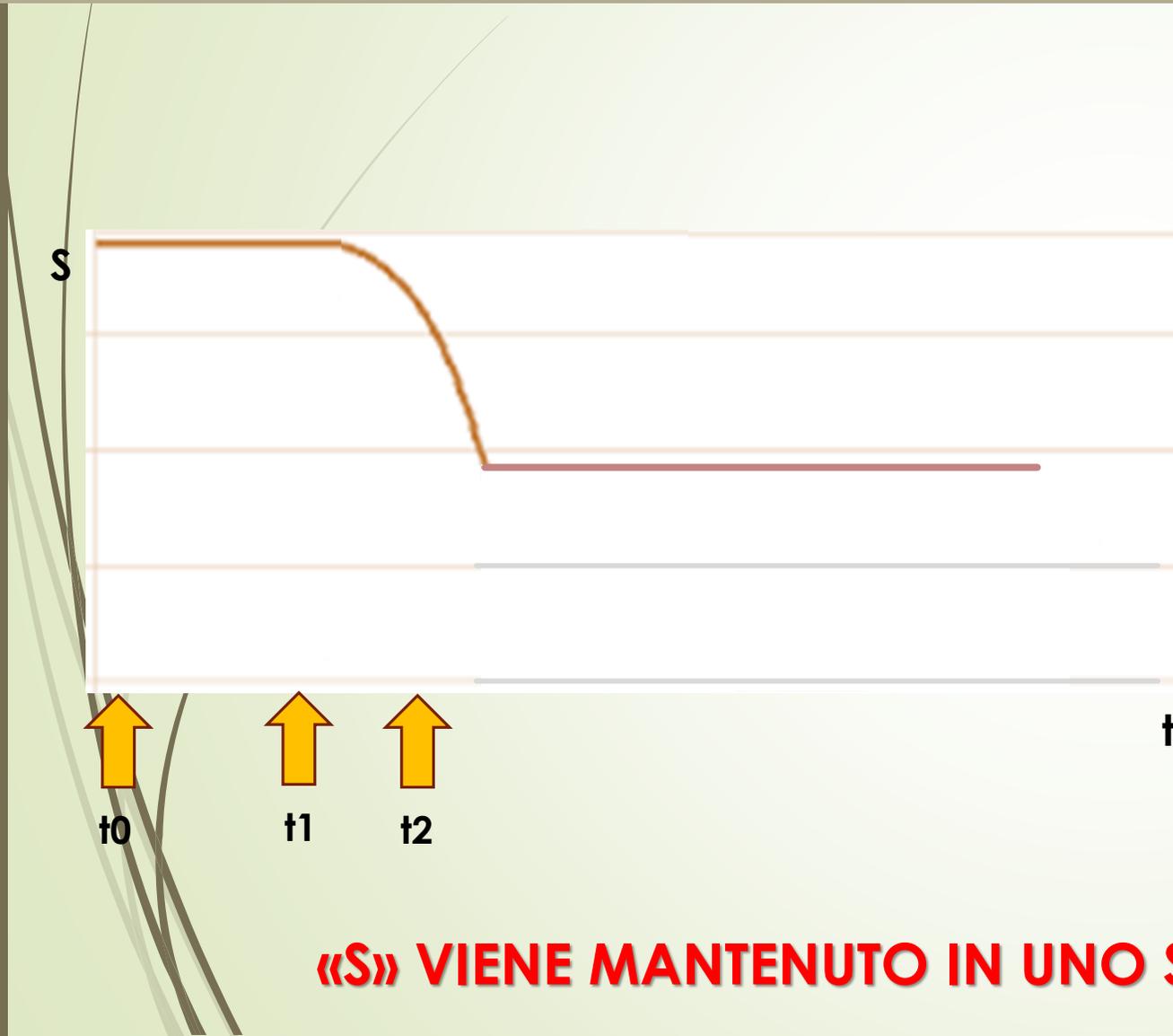
**Il volume rimane costante.**

**L'aumento della massa cellulare dovuto alla crescita exp viene compensato dall'immissione di una esatta quantità di terreno fresco (effetto di diluizione).**

## «X» VIENE MANTENUTO IN UNO STATO STAZIONARIO

Lo scopo di una fermentazione continua è di prolungare la fase log di una coltura discontinua, grazie all'apporto di nutrienti freschi e dall'eliminazione delle sostanze tossiche e delle cellule morte prodotte durante l'incubazione

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



## OPERAZIONI AL $t_2$ :

$t_2$ = attivazione ingresso terreno fresco  
 $t_2$ = attivazione uscita brodo + cellule



**Il volume rimane costante.**

**La diminuzione della concentrazione di substrato dovuto al consumo da parte delle cellule in fase exp viene compensato dall'immissione di una esatta quantità di terreno fresco (effetto di concentrazione).**

**«S» VIENE MANTENUTO IN UNO STATO STAZIONARIO**

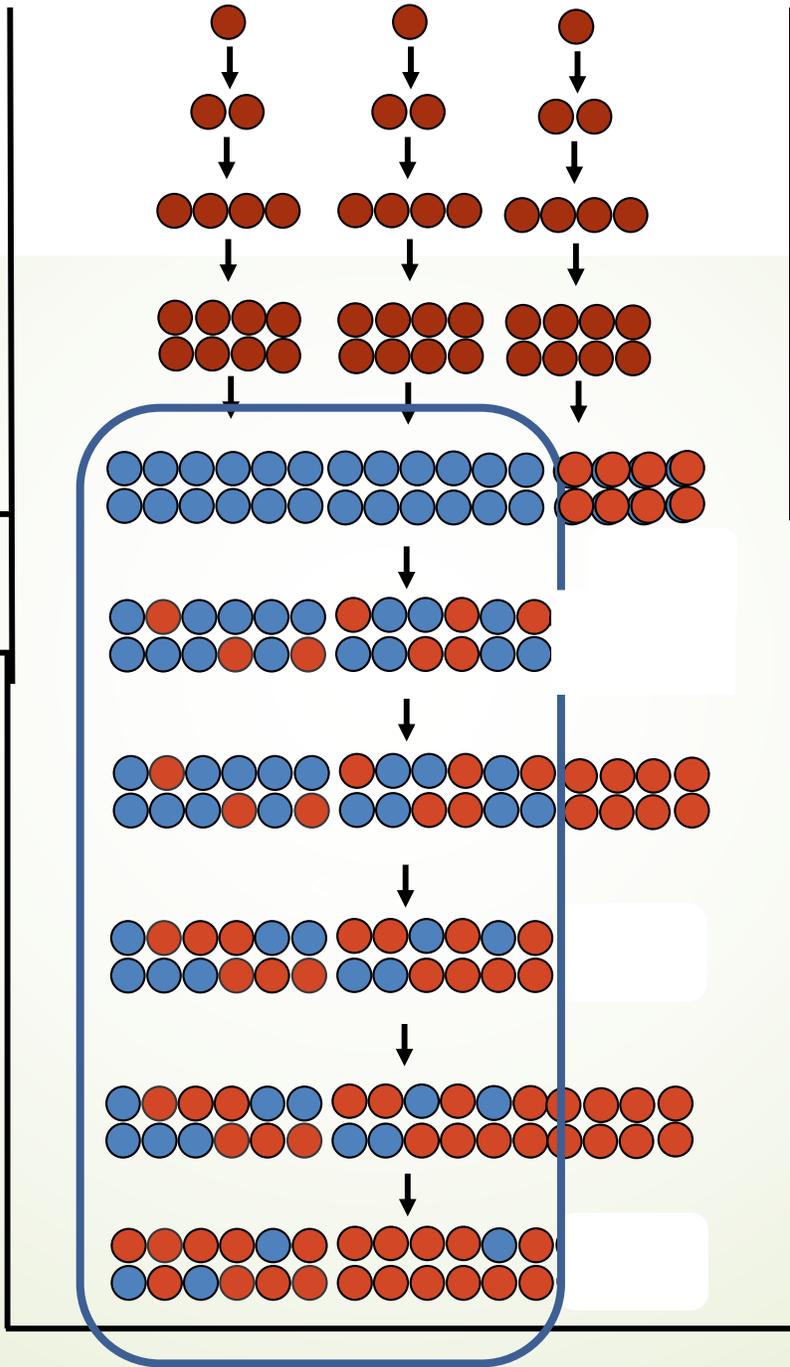
# FERMENTAZIONE CONTINUA

inizio processo continuo

processo batch

$S_0, F$

steady-state



inizio processo continuo

$S, F, X$

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

In dipendenza di quale parametro viene controllato per mantenere il sistema in stato stazionario



**CHEMOSTATO**



**TURBIDOSTATO**

**Chemostato e turbidostato sono impianti a coltura continua che si differenziano per la tipologia di controllo.**

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

**CHEMOSTATO** → **Steady-state costante** → **Misura della [ ] del substrato limitante**

Nel chemostato, lo stato stazionario è mantenuto costante monitorando la **concentrazione del substrato limitante** e, conseguentemente, regolando i flussi di ingresso e uscita.

Il terreno alimentato contiene tutti i nutrienti essenziali per la crescita **in eccesso tranne uno**, e proprio la concentrazione di questo substrato limitante (di norma la fonte carboniosa) controlla la crescita della popolazione microbica nello stato stazionario

**TURBIDOSTATO** → **Steady-state costante** → **Misura della torbidità**

Nel turbidostato, lo stato stazionario è mantenuto costante monitorando la **torbidità del sistema** che è direttamente proporzionale alla concentrazione delle cellule.

La velocità di flusso del terreno fresco è indirettamente controllata da un fotodetector che mantiene la densità cellulare costante attraverso la misura della densità ottica. Raggiunto un certo valore, il sistema di controllo attiva la pompa che manda terreno fresco al fermentatore.

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE CONTINUA

### Vantaggi:

- Il sistema può operare per lunghi periodi.
- Produzione di biomassa e di altri prodotti in condizioni ottimali e costanti.
- A livello industriale la produttività è nettamente superiore a quella delle fermentazioni batch.
- La velocità di sviluppo può essere controllata e mantenuta
- Si possono studiare, cambiando substrato limitante, le modificazioni della composizione cellulare e l'attività metabolica



### Svantaggi :

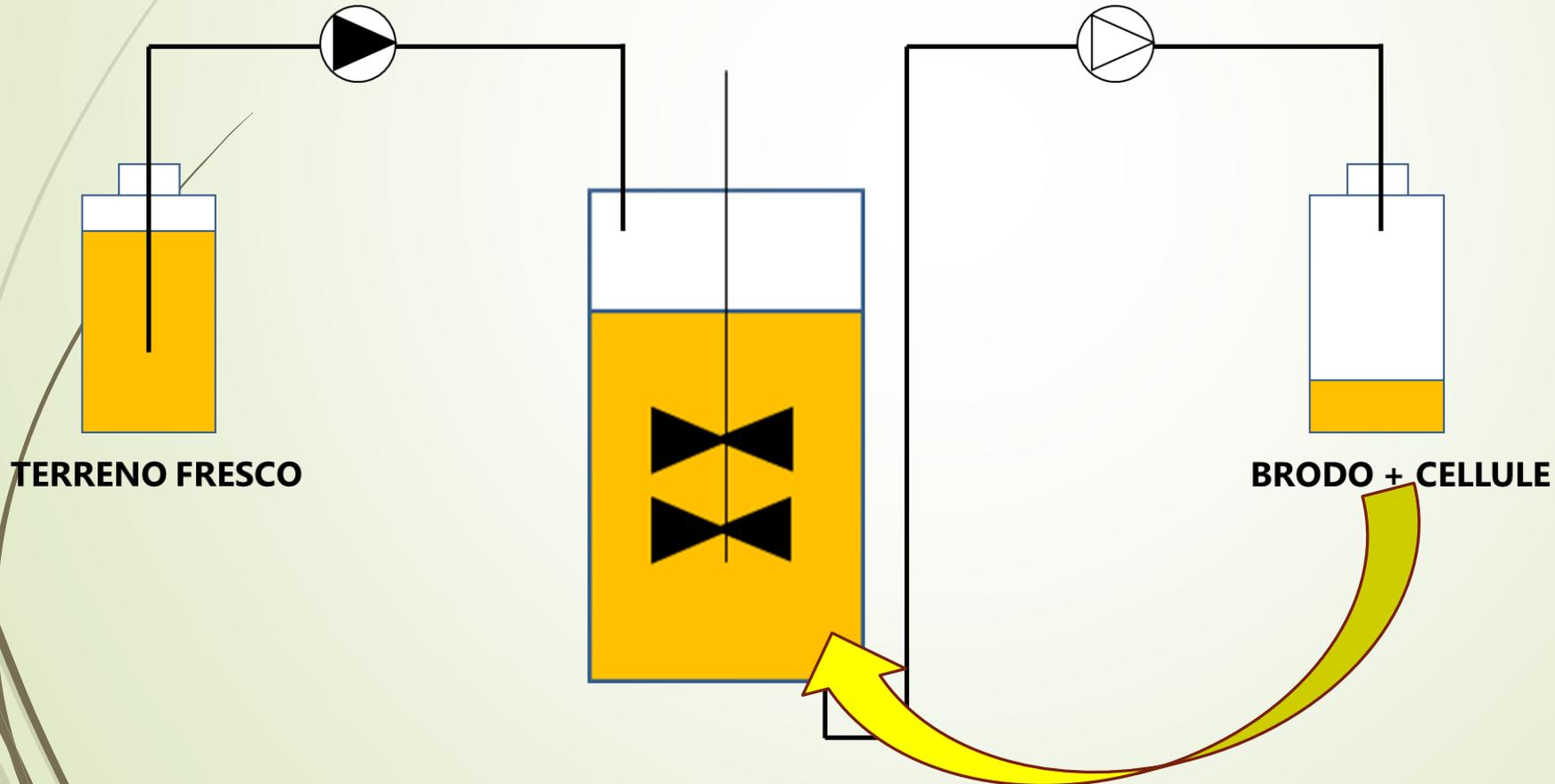
- Elevate probabilità di inquinamento: è necessario mantenere condizioni di sterilità per lunghi periodi, continuando a somministrare aria e terreno.
- Degenerazione del ceppo, che può avvenire essenzialmente per mutazione spontanea o per instabilità dei vettori.
- In microrganismi geneticamente modificati può inoltre verificarsi, specie in lunghi processi fermentativi, la perdita o il riarrangiamento del plasmide ricombinante con conseguente variazione della capacità produttiva.



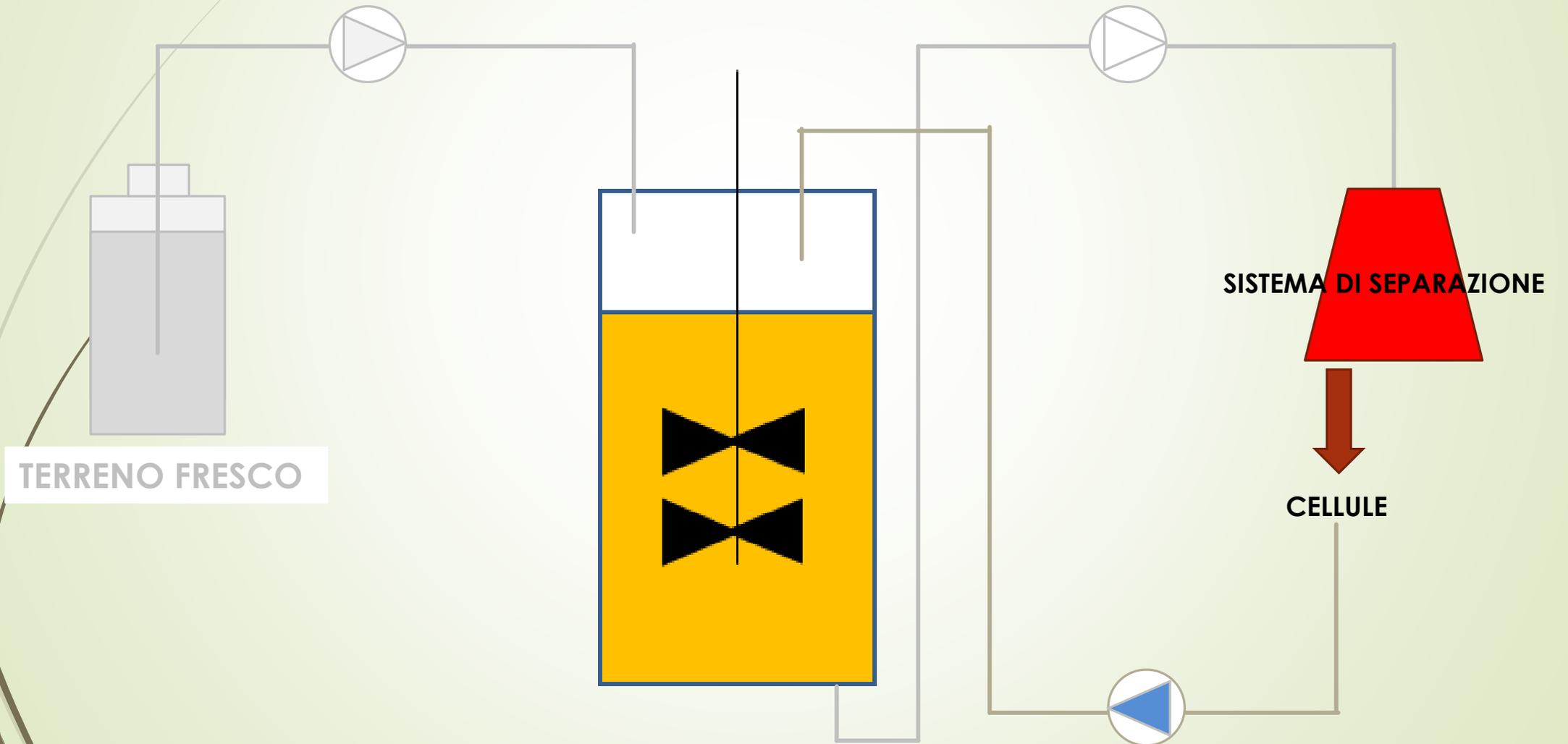
## LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

### **FERMENTAZIONE CONTINUA CON RICICLO (FEED BACK)**

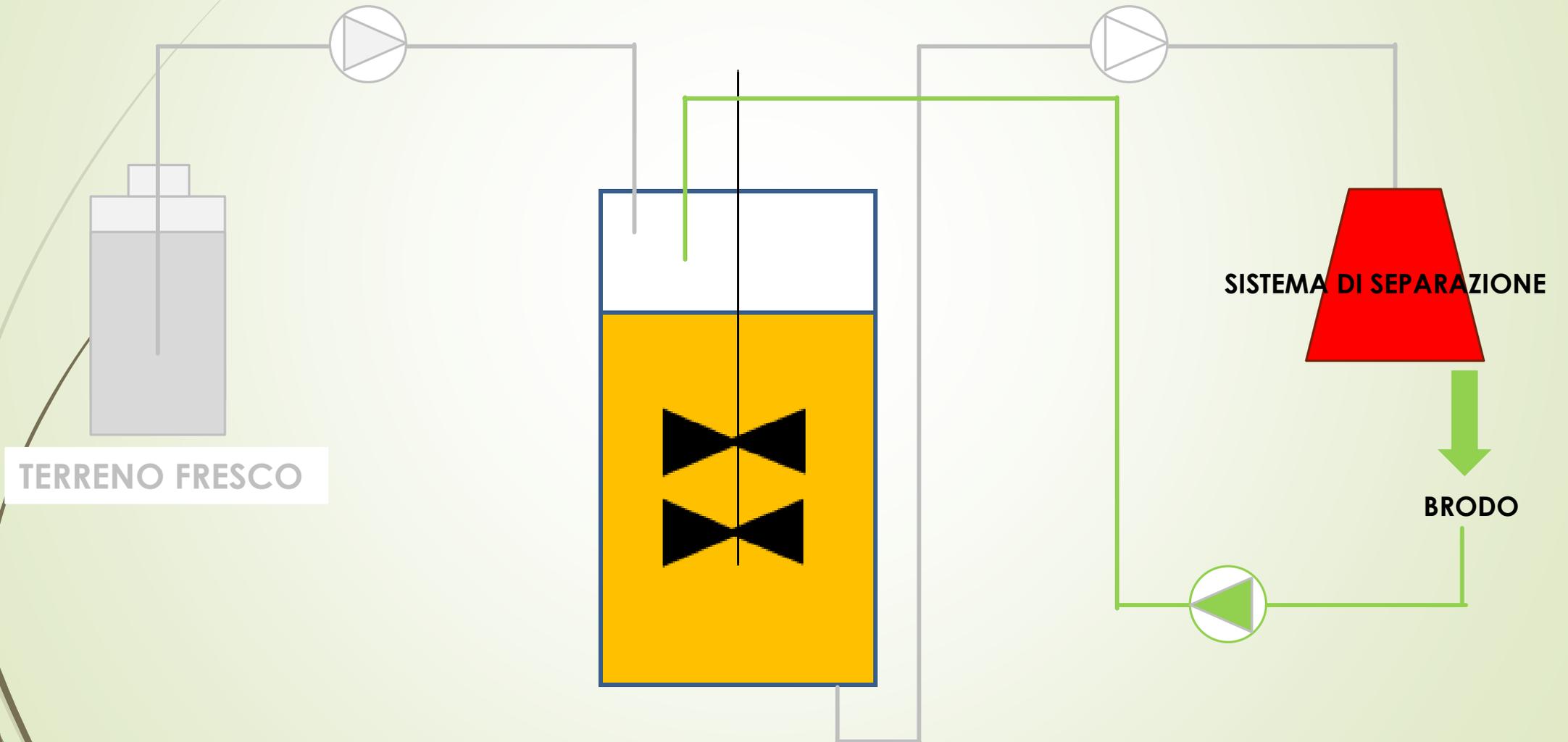
Derivazione della continua in quanto si effettua in un sistema continuo in cui si fa ricircolare rispettivamente la biomassa o il brodo dopo essere stato separato dalla biomassa



# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



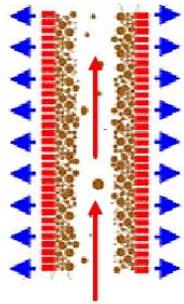
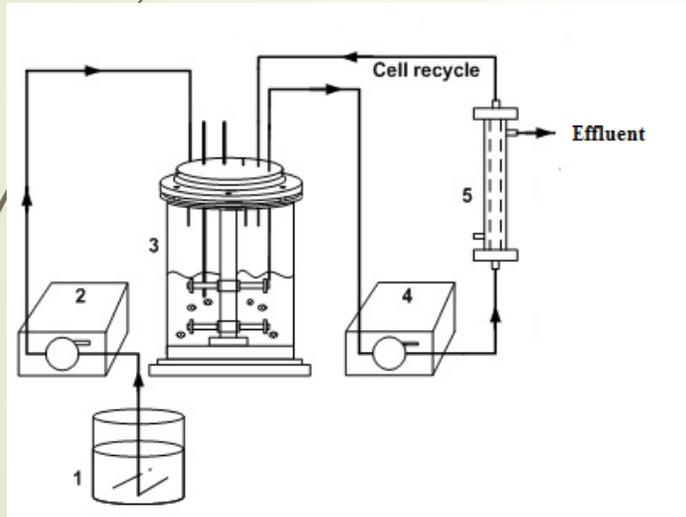
# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

**Vantaggio:** aumentare la concentrazione di biomassa all'interno del fermentatore e quindi la produttività media. Inoltre, aumentando il numero di cellule aumenta l'efficienza di utilizzo del substrato.

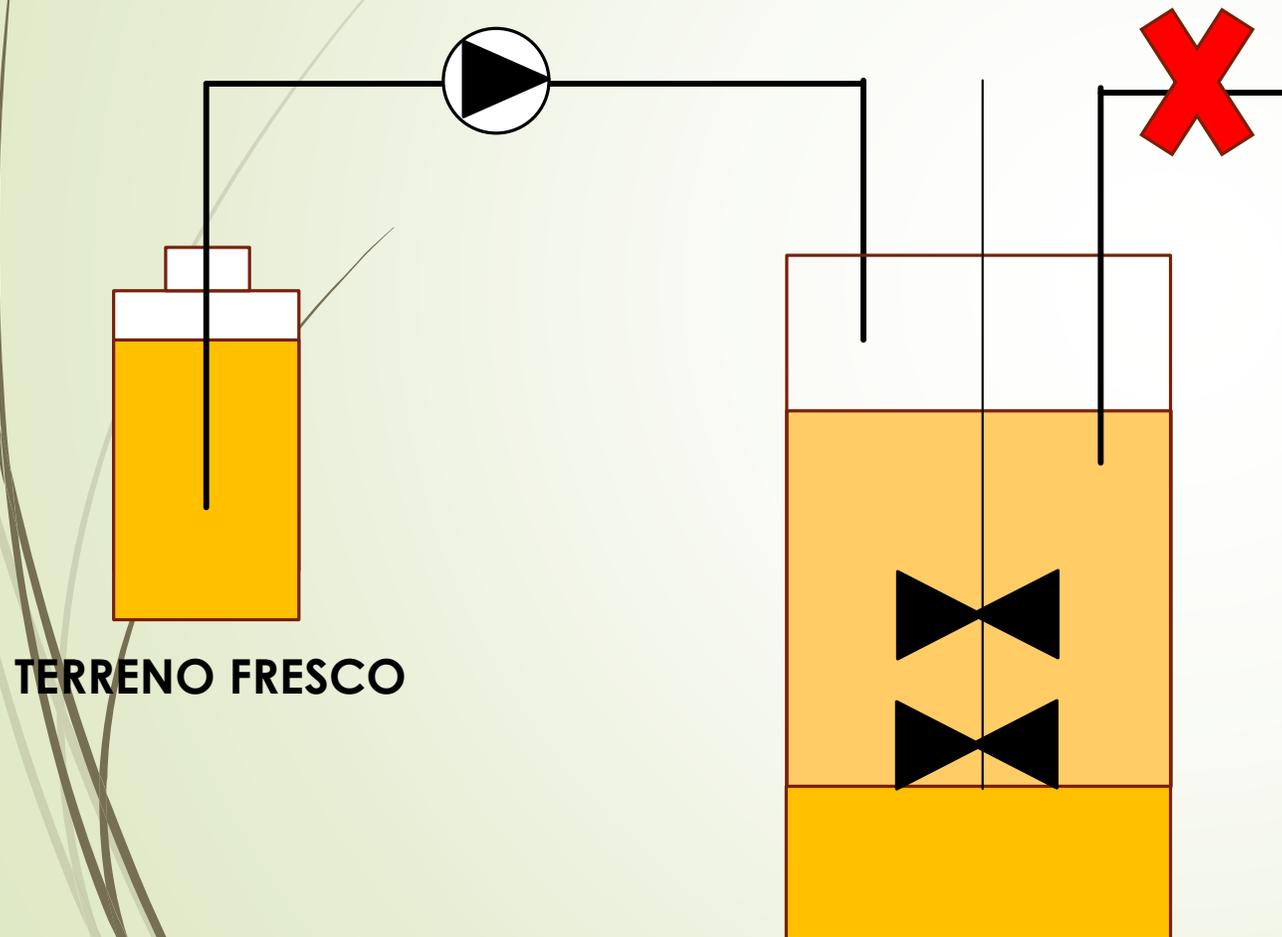
I sistemi con riciclo sono particolarmente utili nel caso di cellule che raggiungono basse densità cellulari o hanno basse velocità specifiche di crescita



Il brodo viene pompato fuori dal fermentatore e passa in una colonna di microfiltrazione, dove viene separato in due flussi, uno interno alla colonna che contiene le cellule concentrate e poco brodo per consentire di scorrere nei tubi ed essere ripompato nel fermentatore, e un flusso di uscita (effluente) che contiene solo acqua e altre sostanze chimiche disciolte (brodo esausto limpido).

## LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

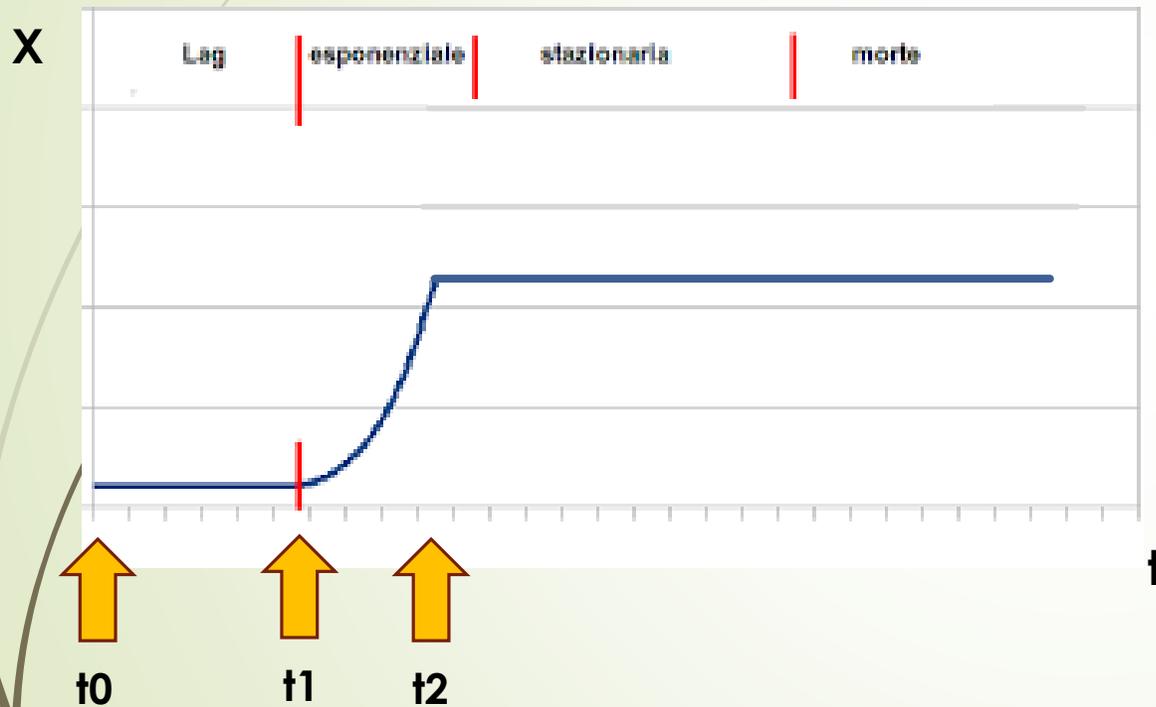
### FERMENTAZIONE FED-BATCH



All'inizio del processo il fermentatore viene caricato parzialmente con un volume di terreno ( $V_0$ ) ed inoculato. Durante la fase esponenziale o stazionaria si aggiunge in continuo del terreno fresco sterile ad una velocità controllata finchè il volume della coltura non raggiunge il valore finale.

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE FED-BATCH



### OPERAZIONI AL $t_2$ :

$t_2$  = aggiunta a velocità controllata di terreno fresco fino al ripristino del *working volume* ( $V_f$ )

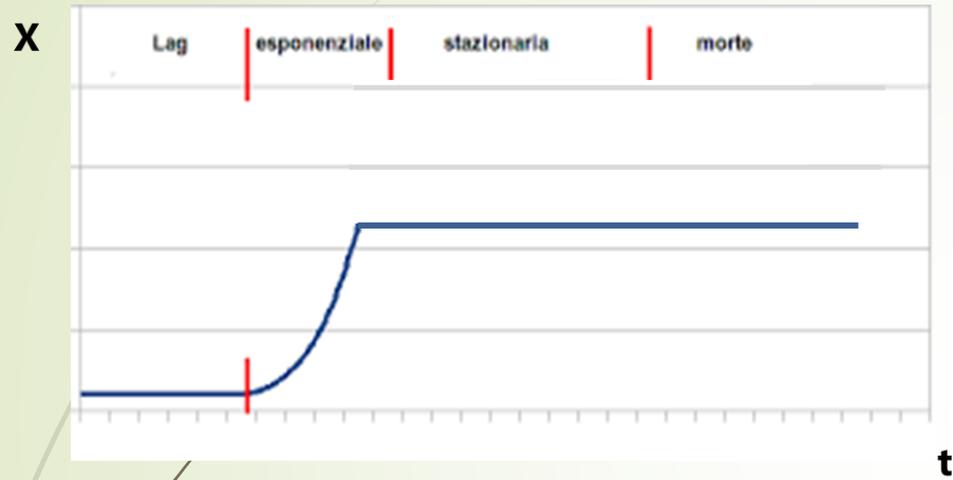
~~$t_2$  =  $\text{divazione uscita brodo} + \text{cellule}$~~

**Il volume NON rimane costante.**

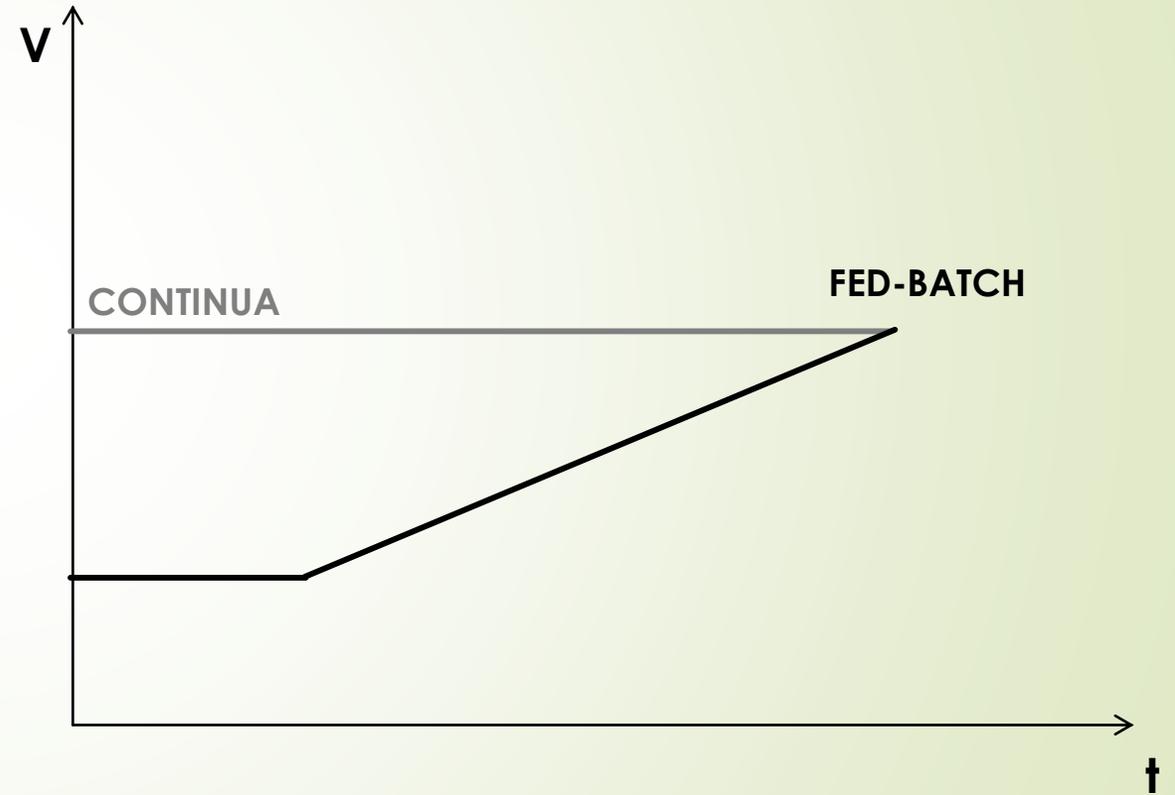
L'aumento della massa cellulare dovuto alla crescita exp viene compensato dall'immissione di una quantità di terreno fresco. In assenza di un'uscita, l'effetto di diluizione si ottiene per l'aumento di volume.

**«X» VIENE MANTENUTO IN UNO STATO QUASI STAZIONARIO**

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE



$t_0$   $t_1$   $t_2$



$t_0$   $t_1$   $t_2$

# LE STRATEGIE DI FERMENTAZIONE

## FERMENTAZIONE REPEATED FED-BATCH

