

## BIOTECNOLOGIA E FERMENTATORI

**Introduzione:** Le fermentazioni, così chiamate perché avvengono con sviluppo di gas, sono processi in cui vengono utilizzati microrganismi: lievitazione del pane, fermentazione dei mosti, produzione della birra e del vino, dei formaggi, di molte bevande alcoliche e, importante, per la produzione industriale di etanolo, acetone, glicerina, butanolo, acido citrico, della penicillina, degli amminoacidi e vitamine. Il mercato dei prodotti dell'industria biotecnologica può essere suddiviso in 4 categorie: prodotti per la salute dell'uomo, per l'agricoltura, per l'alimentazione (e bevande) prodotti chimici. Come catalizzatori vengono utilizzati gli enzimi.

### **Caratteristiche generali.**

Nei processi biotecnologici la trasformazione della materia è realizzata da microrganismi viventi o dagli enzimi da essi estratti. I sistemi sono sensibili alla temperatura (si opera a  $t^\circ$  blande) e al pH, per cui sono impiegati adeguati sistemi di controllo. Si opera in condizioni di assoluta sterilità.

I processi biotecnologici sono successione di stadi in cui la materia subisce operazioni e processi unitari.

Nella fermentazione si distinguono tre stadi:

- 1) preparazione del substrato, dell'inoculo e dell'aria per i processi aerobici;
- 2) la fermentazione;
- 3) stadi che seguono: separazione dei prodotti finali.

Schema generale di un processo biotecnologico

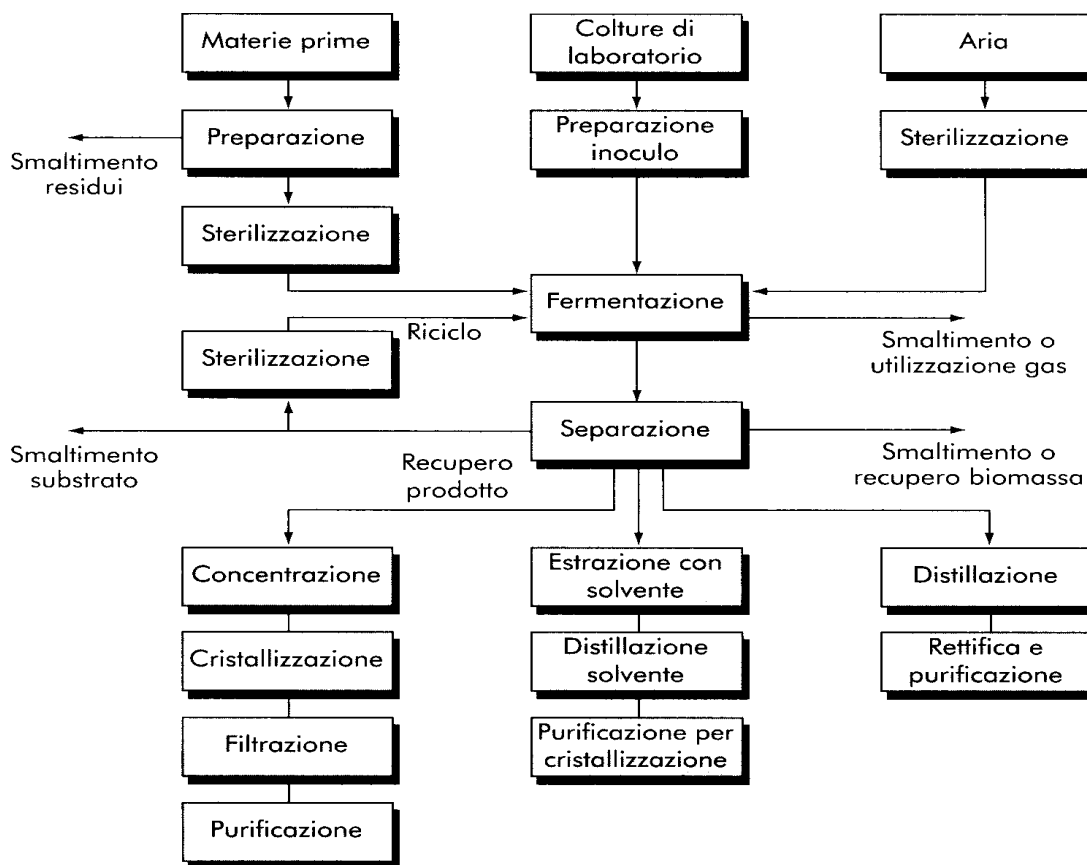


Fig. 7.3 Schema generale di un processo biotecnologico

**Materie prime.**

Sono in genere materiali di scarto e sottoprodotti vegetali.

CEREALI, FRUTTA, TUBERI, LATTICINI, ECC.	SOTTOPRODOTTI VARI	
Granoturco	Patate	Melasse
Grano	Bietole (da zucchero)	Liquori al solfito
Orzo	Foglie di piante	Crusca
Sorgo	Farina di soia	Acque di macerazione del mais
Uva	Semi di arachidi	Acque di vegetazione
Mele	Latte	Residui agrumari
Prugne	Panna	Lattosio
Ciliege	Siero di latte	Trebbie e vinacce

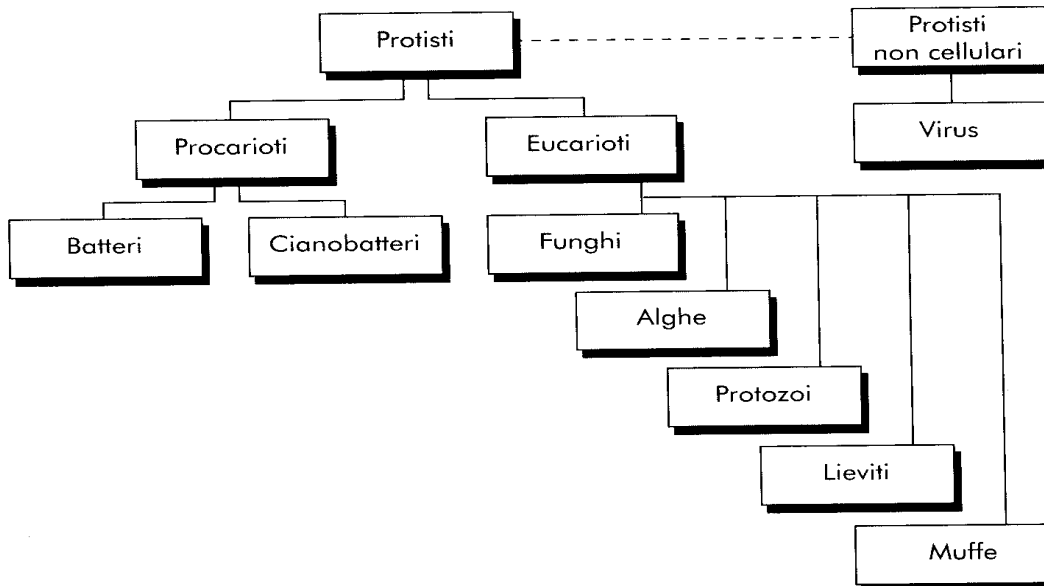
*Tab. 7.3 Materie prime impiegate nei processi biotecnologici*

**Sterilizzazione.**

La presenza di microrganismi indesiderati produce alterazioni nei prodotti alimentari ( aroma, aspetto, sapore) e inquinamento. Pertanto vanno sterilizzati: fermentatori, tubazioni, raccorderi, valvole ecc. ( la sterilizzazione ha lo scopo di diminuire i microrganismi indesiderati, non si fa assoluta per motivi di costo). La sterilizzazione dell'aria viene fatta per filtrazione con filtri aventi pori via via più piccoli, fino a 0,2 µm., mentre quella del brodo di fermentazione così come delle apparecchiature viene fatta termicamente con vapore 120°C diretto o in scambiatori.

**Microrganismi impiegati nelle biotecnologie.**

Si distinguono tre principali classi: batteri, lieviti e muffe. Sono tutti protisti eucarioti e procarioti ( con o senza nucleo).



*Classificazione dei protisti*

CRITERIO	DESCRIZIONE
Origine o provenienza	Fecale (estromessi da feci umane)
	Ambientale (provenienti dal terreno o dalle acque naturali)
Igienistico	Patogeni (capaci di far insorgere malattie in altri organismi)
	Banali (innocui)
Campo di temperatura ottimale	Criofili (2 ÷ 20 °C)
	Mesofili (20 ÷ 45 °C)
	Termofili (45 ÷ 75 °C)
Colturale	Colture pure (masse di molti organismi dello stesso tipo)
	Colture miste (masse di molti organismi di diverso tipo)
Trofico	Parassiti (si nutrono di sostanze viventi dell'organismo di cui sono ospiti)
	Saprofiti (si nutrono di sostanze non viventi che trovano nell'ambiente)
Fonte di carbonio	Autotrofi (litotrofi), utilizzano CO <sub>2</sub> come fonte di carbonio
	Organotrofi (eterotrofi), utilizzano sostanze organiche come fonte di carbonio
Energetico	Fotosintetici (ricavano energia dalla luce solare)
	Chemiosintetici (ricavano energia dalle reazioni redox)
Reazioni redox	Aerobi (l'ossidante è O <sub>2</sub> )
	Anaerobi (l'ossidante è diverso da O <sub>2</sub> )

### *Criteria di classificazione dei microrganismi*

#### **Cinetica di accrescimento batterico**

Nelle reazioni biotecnologiche il catalizzatore non si consuma ma addirittura viene prodotto:  
 cellule

Substrato  $\longrightarrow$  prodotti + nuove cellule

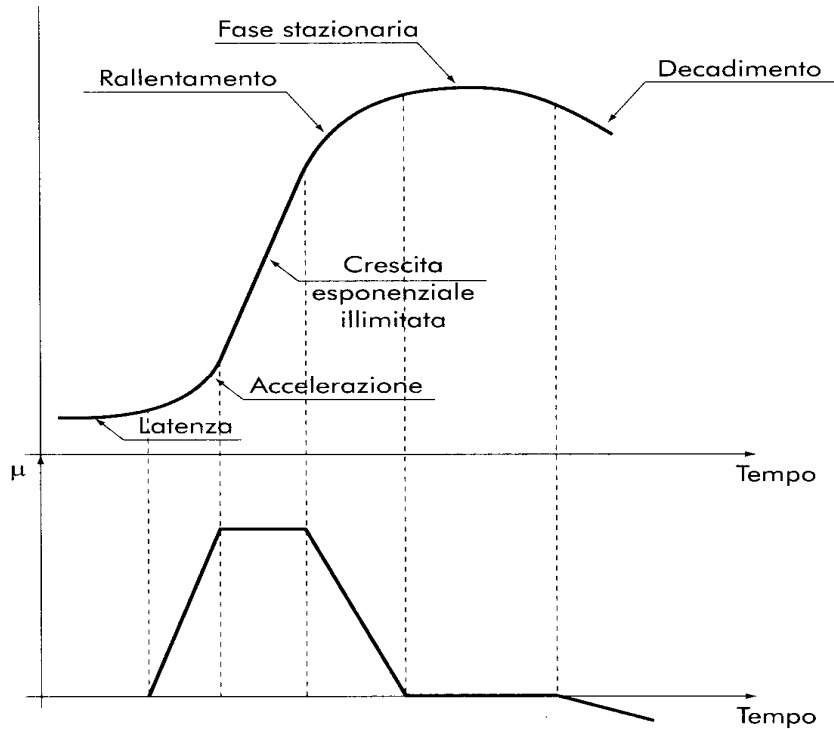
La velocità di reazione può essere espressa in termini di generazione di nuove cellule:

$$r = \frac{dC}{dt}, \text{ come generazione di nuovo prodotto o di scomparsa di substrato.}$$

Studiare la cinetica cioè individuare le condizioni in cui il processo può essere condotto con elevata velocità è necessario per il progetto dell'impianto.

La velocità specifica di sviluppo dipende dal tipo di microrganismo, dalla  $t^\circ$ , dal pH e dalla composizione del terreno colturale. La relazione tra velocità di sviluppo e concentrazione del substrato è espressa dall'equazione di Monod.

La variazione del numero di individui nel tempo ( accrescimento batterico) segue l'andamento in figura:



Curva di accrescimento batterico batch

L'equazione della velocità è:

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s}$$

$C_s$  = conc. del substrato, che varia nel tempo, in g/l.  
 $\mu_{\max}$  è la velocità di accrescimento massima, in  $h^{-1}$   
 $K_s$  in ppm è la costante di affinità substrato/microrganismi, entrambi caratteristici dei batteri e del substrato.

Nella fase iniziale di crescita ( grande disponibilità di substrato) si ha  $\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \cong 1$

Con  $C_s \gg K_s$ .  
 Per  $C_s \cong K_s$  si ha  $\frac{C_s}{K_s + C_s} < 1$  e vale l'equazione di Monod.

Nella fase stazionaria cioè si ha :  $\mu \cong 0$  , mentre il numero di cellule rimane costante.

## Bilanci di materia

Vale il bilancio:

Accumulo di batteri = batteri entranti nell'unità di tempo + batteri generati nell'u.di t. – batteri uscenti nell'u.di t.

In condizioni stazionarie si avrà accumulo nullo, per cui, indicando con:

$$a) \text{ accumulo di batteri} = \frac{dC}{dt} * Vol$$

$$b) \text{ batteri entranti} = 0$$

$$c) \text{ batteri uscenti} = F * C$$

$$d) \text{ batteri generati} = r * Vol.$$

Dove: C = concentrazione attuale di batteri

F = portata volumetrica

Kd = costante di decadimento

Cs

———— = velocità specifica lorda

Ks + Cs

Cs = conc. del substrato

Ks = costante di affinità substrato / microrganismo

Cc = conc: cellule.

$$\text{I batteri generati nell'unità di tempo sono: } \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_c * Vol$$

L'equazione di bilancio può essere scritta:

$$\frac{dC_c}{dt} * Vol = \left[ \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_c * Vol \right] - \left[ F - C_c \right] \text{ che è } = 0$$

$$\text{e riarrangiata diventa: } \frac{F}{V} = \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} \text{ o anche } \frac{V}{F} = \frac{K_s + C_s}{K_s * C_s}$$

Questa equazione si utilizza e per il dimensionamento di reattori continui che per la determinazione delle costanti cinetiche  $\mu_{\max}$  e  $K_s$ .

Il termine F/V è chiamato velocità spaziale e rappresenta il tempo medio di permanenza del substrato nel reattore ( tempo di ritenzione) indicato con la lettera  $\tau$ .

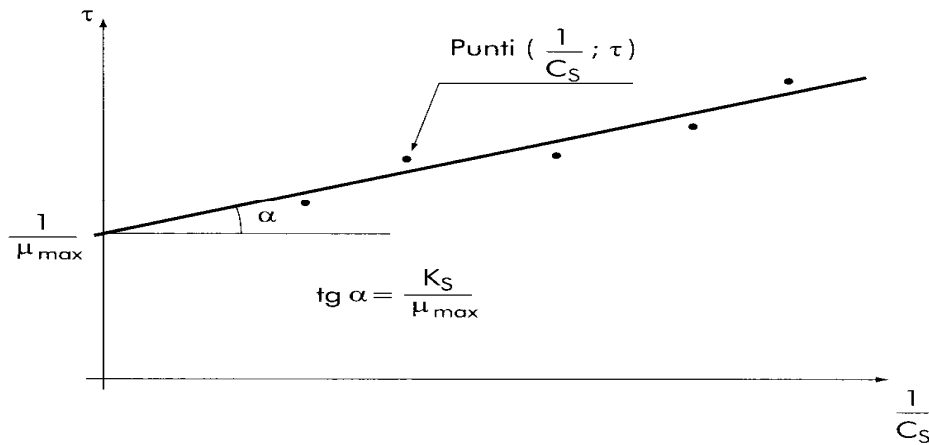
$$\text{Sviluppando ancora si ha } \tau = \frac{K_s}{\mu_{\max}} * \frac{1}{C_s} * \frac{1}{\mu_{\max}} \text{ che rappresenta una retta con } \frac{1}{C_s}$$

variabile indipendente e  $\tau$  var. dipendente.

Riportando su grafico si possono determinare le costanti cinetiche in un reattore continuo:

$$\text{Con } tg\alpha = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \text{ e intercetta } \frac{1}{\mu_{\max}}$$

Si misura la concentrazione del substrato per ogni valore di portata  $F$  e quindi il  $\tau$ , ottenendo una serie di coppie di valori  $1/C_s$  e  $\tau$ , da rappresentare su diagramma:



*Determinazione delle costanti cinetiche in un reattore continuo*

Il bilancio si può scrivere anche per il substrato:

Accumulo di sub. = substrato entrante n.di t. – sub.uscente nell'u.di t. – sub. scomparso nell'u.di t

Sub entrante nell'u. di t. =  $F * C_{s0}$

Sub. uscente nell'u. di t. =  $F * C_s$

$$\text{Da cui: } 0 = \left[ F - C_{s0} \right] - \left[ \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_c * Vol * \frac{1}{Y_{C/S}} \right] * F * C_s$$

Dove  $Y_{C/S}$  = resa in cellule rispetto al substrato scomparso è uguale a :

**$\frac{\text{Kg cellule generate}}{\text{Kg Substrato scomp.}}$**

**$\frac{\text{Kg di prod. generato}}{\text{Kg sub.scomparso}}$**

Il bilancio si può scrivere anche riferito al prodotto:

Accumulo di prodotto = Prod. Entrante nell'u. di t. – Prod. Generato nell'u. di t – prod. Uscente

$$0 = 0 + \left[ \mu_{\max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_c * V * \frac{1}{Y_{C/S}} * Y_{P/S} \right] - \text{Prod. Uscente}$$

Con  $Y_{P/S} = \frac{\text{Kg di prod. generato}}{\text{Kg sub.scomparso}}$

$Y_{P/S}$  è la resa in prodotto rispetto al substrato consumato.

Per i processi aerobici il tasso di consumo di ossigeno è

$$Y_{O_2/C} = \frac{\text{Kg di Ossig. consumato}}{\text{Kg di cellule prodotte}}$$

Riferito al consumo orario l'  $Y_{O_2/C}$  prende il nome di **OUR**.

## **Reattori e sistemi di controllo**

I reattori sono simili a quelli tradizionali, presentano in più una serie di funzioni e dispositivi tali da consentire:

- la miscelazione del sistema;
- lo smaltimento del calore prodotto dalla reazione ed il controllo della temperatura;
- la distribuzione e la diffusione dell'ossigeno, per i processi aerobici;
- aggiunta di reagenti e nutrienti durante il processo;
- il controllo del pH;
- il controllo e la rottura delle schiume, eventualmente tramite l'aggiunta di additivi;
- il monitoraggio delle concentrazioni di reagenti, prodotti e microrganismi.

La maggior parte dei processi biotecnologici è di tipo discontinuo, si usa quindi il fermentatore batch che risponde alle esigenze prima analizzate.

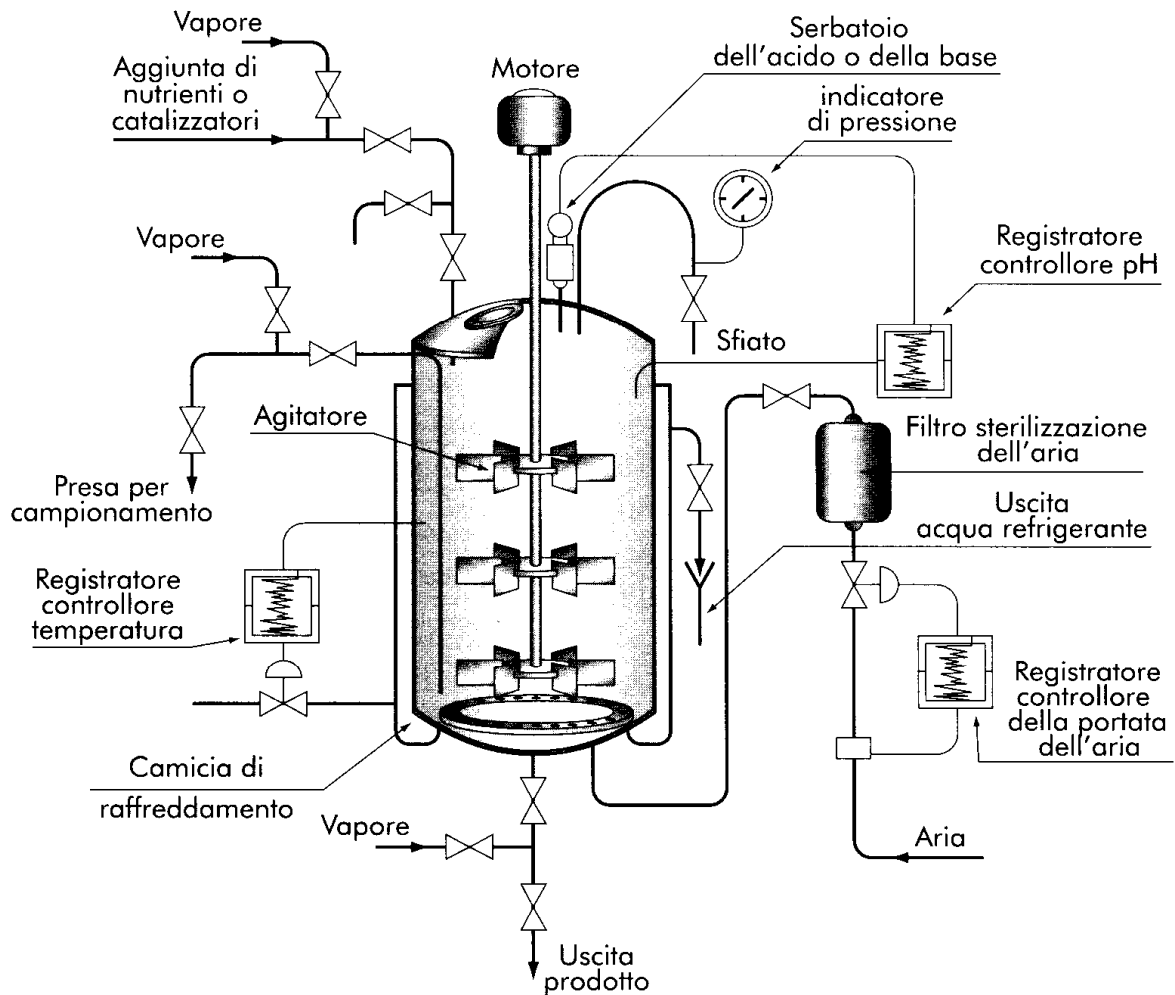
Nei fermentatori batch o STR viene realizzata una miscelazione perfetta del substrato e inoculo.

Le fasi operative sono:

- a) sterilizzazione del reattore ( con vapore );
- b) caricamento dell'inoculo opportunamente preparato e del substrato sterilizzato.

Col passare del tempo si ha diminuzione di substrato e aumento di concentrazione di cellule e di prodotti, poi il processo viene fermato.

La miscelazione è assicurata da un agitatore meccanico a pale o per mezzo dell'aria.



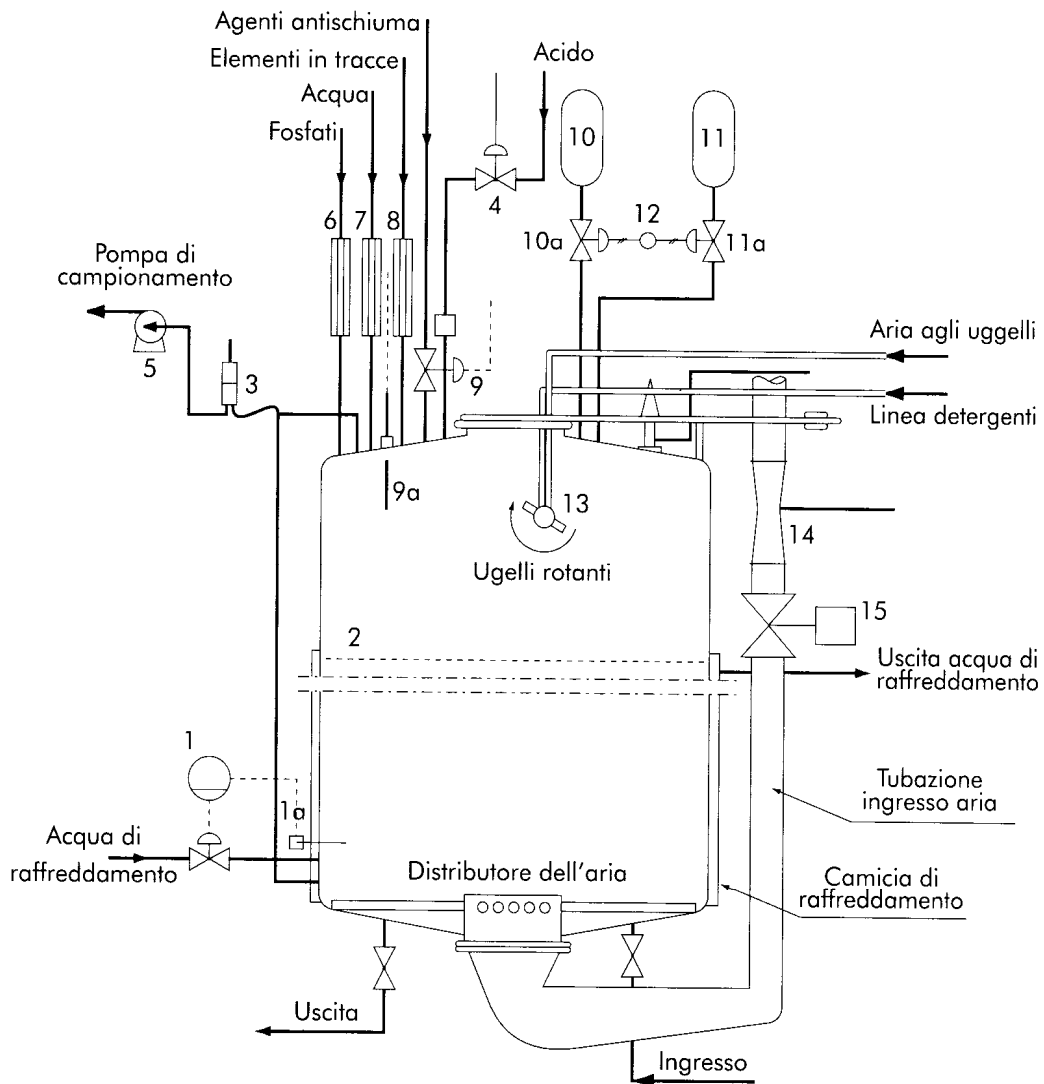
*Fermentatore con agitatore meccanico*

Per assicurare il raffreddamento i fermentatori hanno una camicia di raffreddamento in cui circola acqua refrigerante ( la portata è comandata da un controller di temperatura).  
 Il fermentatore è fornito inoltre di un controller di pH che può intervenire aggiungendo bicarbonato o CO<sub>2</sub>.  
 Il reattore continuo è alimentato in modo stazionario cioè, con una portata pari a quella in uscita.

## Recupero dei prodotti

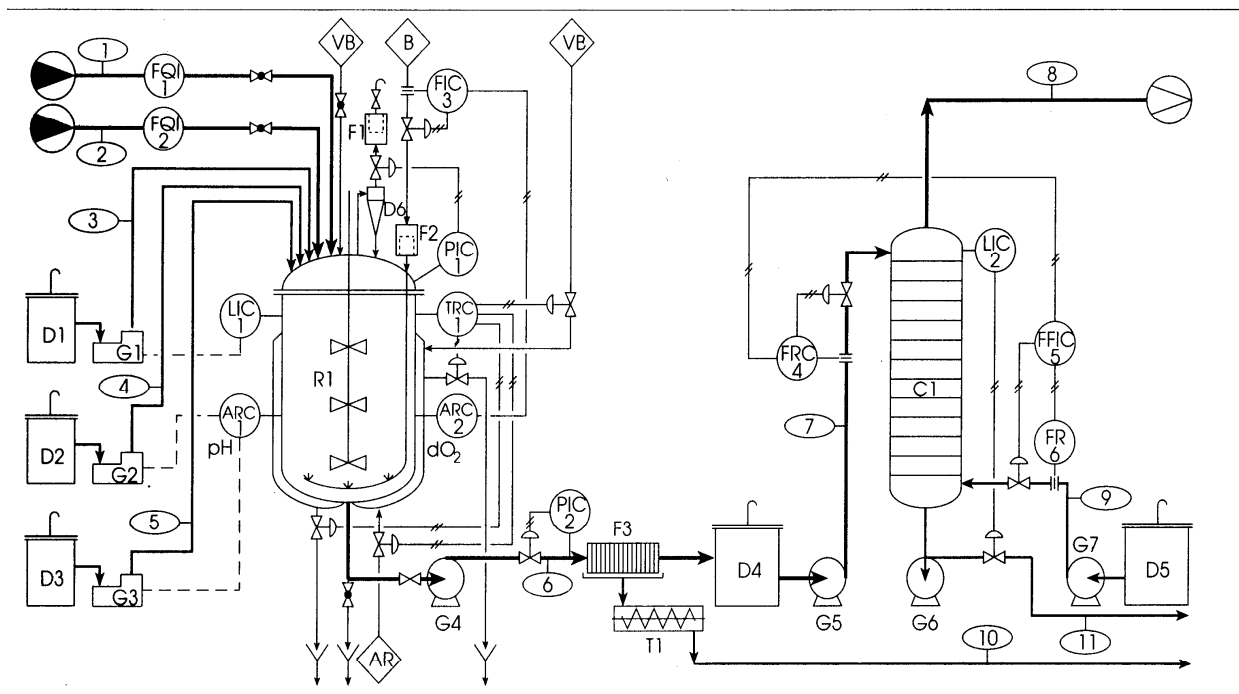
All'uscita del fermentatore il prodotto si trova nel brodo di coltura miscelato con microrganismi e sospensioni solide è quindi necessario il suo recupero e purificazione. Si fa un trattamento con agenti flocculanti per separare le particelle in sospensione, successivamente si filtra nelle filtropresse con filtri rotanti. Per la purificazione si possono utilizzare: adsorbimento, precipitazione frazionata.

OPERAZIONE UNITARIA	PRODOTTI SEPARABILI
Distillazione	Prodotti molto volatili, come etanolo, butanolo, acetone, acido acetico.
Precipitazione seguita da filtrazione	Diversi acidi organici formano sali insolubili con il calcio. Questi possono essere recuperati per filtrazione o centrifugazione.
Estrazione con solventi	È la via classica per la separazione degli antibiotici. Vengono usate apparecchiature a stadi con controllo del pH.
Concentrazione seguita da ultrafiltrazione	È indicata per la produzione di enzimi o polisaccaridi. La concentrazione viene effettuata a temperature relativamente basse (40 °C). La purificazione del prodotto può essere ottenuta per ultrafiltrazione, con separazione delle molecole ad elevato peso molecolare.
Adsorbimento	Può essere effettuata su brodi chiarificati per estrarre un gran numero di prodotti farmaceutici come streptomycina, cefalosporina ecc. Possono essere utilizzate allo scopo resine scambiatrici o carboni attivi. Può essere utilizzato anche come processo che precede la concentrazione.
Metodi cromatografici	Trovano impiego in casi alcuni casi particolari di recupero di enzimi. L'applicazione di queste tecniche è legata alla disponibilità di un materiale adsorbente sufficientemente economico ed in grado di trattare grandi portate di liquido poco concentrato e contenente colloidali ed altre particelle in sospensione.



- |   |  |
|---|--|
| 1 - controllore registratore di temperatura   | 9a - sensore delle schiume   |
| 1a - misuratore di temperatura  | 10 - serbatoio di carica substrato                                   |
| 2 - livello del fermentatore  | 10a - valvola controllo portata del substrato                        |
| 3 - elettrodo pH. Invia la misura al controllore di pH  | 11 - serbatoio di carica dei nutrienti azotati                       |
| 4 - valvola di controllo pH   | 11a - valvola controllo portata nutrienti azotati                    |
| 5 - pompa di campionamento per la misura delle concentrazioni di cellule substrato e prodotti | 12 - controllore del rapporto substrato-nutrienti azotati            |
| 6 - rotametro per la misura della portata di fosfato  | 13 - ugelli rotanti per l'immissione di detergenti                   |
| 7 - rotametro per la misura della portata di acqua sterile                                    | 14 - venturimetro per la misura della portata di aria                |
| 8 - rotametro per la misura della portata di micronutrienti                                   | 15 - valvola elettrocomandata per il controllo della portata di aria |
| 9 - valvola di controllo aggiunta antischiume   |  |

*Fermentatore con agitazione ad aria*



FERMENTAZIONE AREOBIA, FILTRAZIONE ED ESTRAZIONE

C1 Colonna d'estrazione	F3 Filtro pressa biomassa	T1 Coclea biomassa filtrata	7 Brodo filtrato
D1 Serbatoio antischiuma	G1 Pompa dosatrice antischiuma	1 Inoculo	8 Soluzione metabolita estratta
D2 Serbatoio acido	G2 Pompa dosatrice acido	2 Brodo di coltura	9 Solvente estrazione
D3 Serbatoio base	G3 Pompa dosatrice base	3 Antischiuma	10 Biomassa a smaltimento
D4 Accumulatore brodo filtrato	G4 Pompa carico filtro pressa	4 Acido	11 Brodo esausto a smaltimento
D5 Serbatoio solvente estrazione	G5 Pompa carico estrattore	5 Base	AR Acqua di raffreddamento
D6 Separatore trascinamenti	G6 Pompa scarico estrattore	6 Brodo fermentato	B Aria
F1 Filtro a cartuccia scarico aria	G7 Pompa carico solvente		VB Vapore di rete
F2 Filtro a cartuccia entrata aria	R1 Bioreattore		

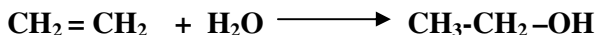
*Fermentazione aerobica e successiva estrazione liq-liq con solvente immiscibile con acqua*

### Processi biotecnologici

La produzione di sostanze per via biotecnologia rappresenta una via diversa da quella chimica.

### Produzione di etanolo

E' importante come solvente e trasformato in acetaldeide viene impiegato per la produzione di acetato di etile, acido acetico, glicole, etere etilico ecc.. Viene prodotto oltre che per via chimica :



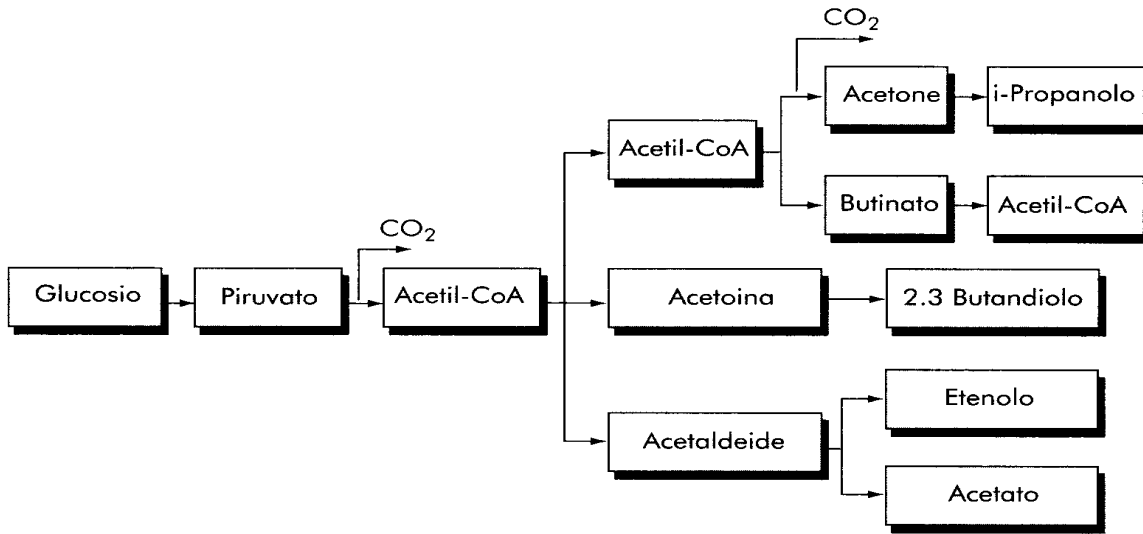
Anche per via biotecnologica partendo da melassa, residui della lavorazione del mais ecc.

I microrganismi per la produzione di bioalcol sono: (lievito) *Saccharomices cerevisiae*, (batterio) *Zymomonas mobilis*.

Si parte da glucosio, si passa per il piruvato e acetaldeide:



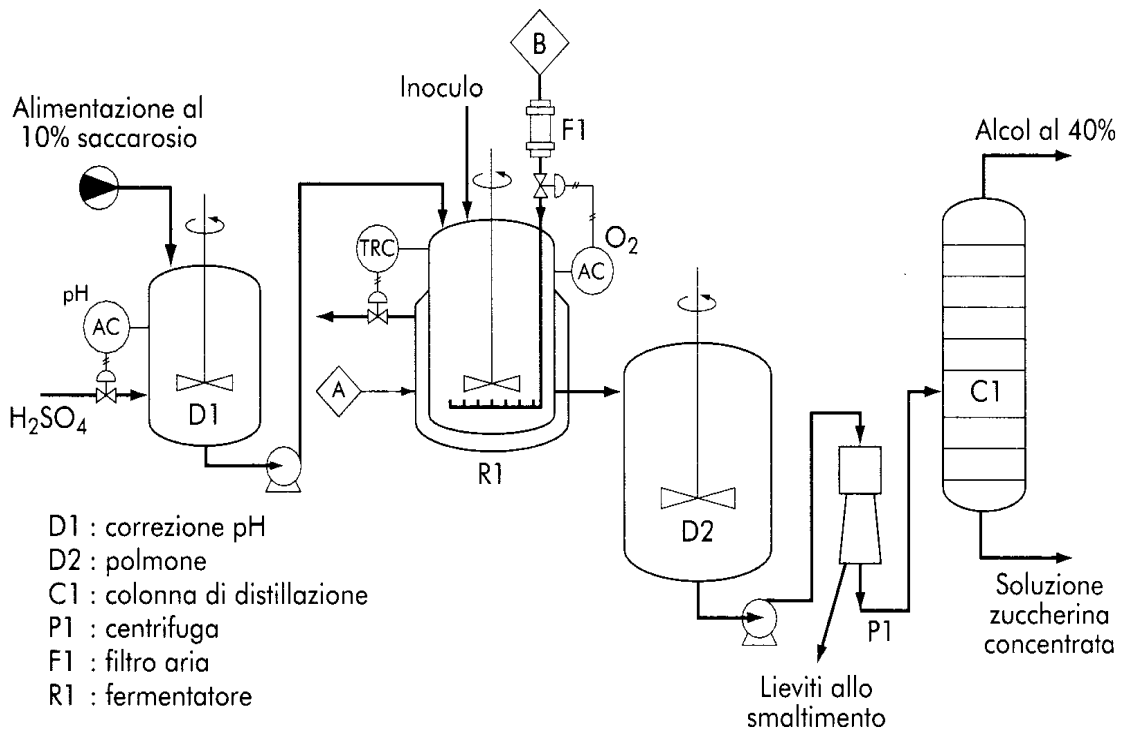
L'Alcol non è l'unico prodotto finale:



*Percorsi metabolici nel catabolismo anaerobico*

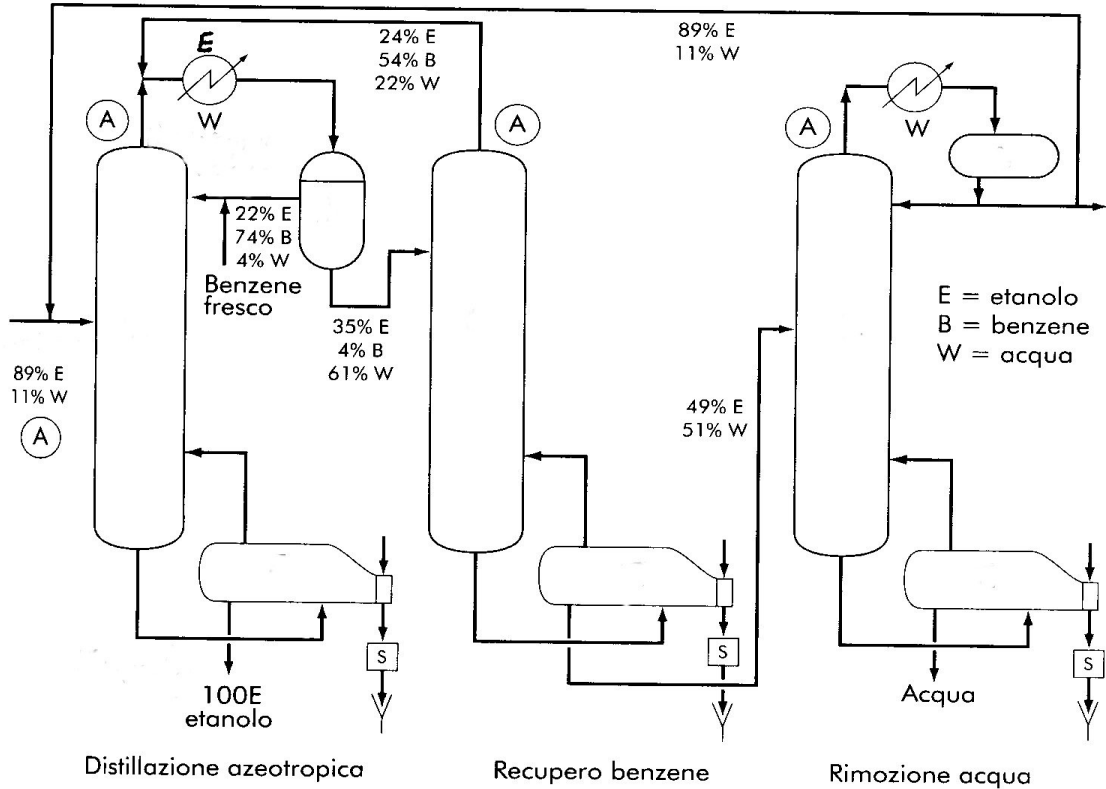
A seconda del pH si hanno diversi prodotti.

Il processo è anaerobico. Con l'aria si ha l'ossidazione a CO<sub>2</sub>. L'inoculo è costituito da lievito, il pH è 4-5 e la t° 35°C. Il processo è discontinuo con reattore batch, con tempo di fermentazione di due giorni. Il brodo fermentato va in un polmone in cui avviene la separazione dei lieviti (centrifuga).



*Produzione di bioalcol da soluzioni zuccherine*

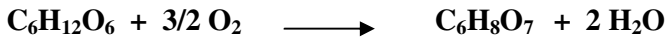
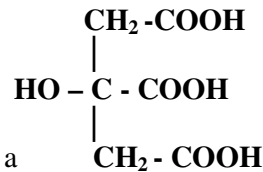
L' alcol con acqua presenta un azeotropo di minima  $t^\circ$  di ebollizione a  $78^\circ\text{C}$  e composizione 89,43% in moli. Nella distillazione in testa uscirebbe l'azeotropo senza possibilità di ottenere l'alcol al 100%. Per ottenere alcol puro si aggiunge alla miscela benzene, con esso si forma un azeotropo ternario che bolle a  $t^\circ$  inferiore:  $64,85^\circ\text{C}$ . L'azeotropo esce dalla testa della colonna di distillazione mentre in basso uscirà alcol etilico puro.



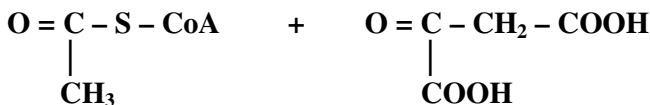
*Distillazione azeotropica in presenza di benzene e quindi dell'azeotropo triplo che permette l'ottenimento dell'alcol puro.*

**Produzione di acido citrico**

Viene impiegato come acidulante organico alimentare. Veniva estratto dagli agrumi. Si ottiene per via biotecnologia a partire dalla melassa o da sostanze amidacee o contenenti zucchero.

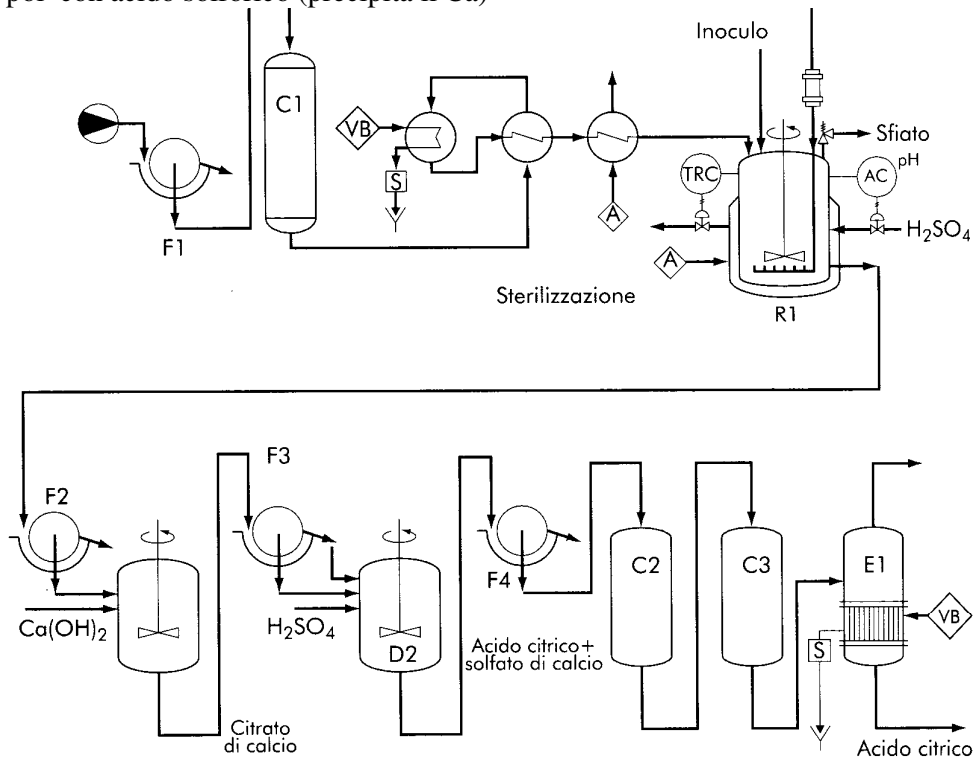


L'acido citrico è un intermedio del ciclo di Krebs. Si utilizzano muffe *Aspergillus niger*. L'acetilcoenzimaA reagisce con acido ossalacetico per dare ac.citrico (sintesi)



E' necessario bloccare con EDTA o con Cu, l'evoluzione della reazione a isocitrico. Processo: la materia prima viene prima purificata per filtrazione e trattamento con resine scambiatrici ioniche per bloccare ioni metallici ( che catalizzerebbero altre reazioni indesiderate). Si sterilizza e si immette l'inoculo preparato. Durata 6-15 giorni, pH 2,8 -1,5.  $t^\circ = 28\text{-}35^\circ\text{C}$

La resa è 80% in peso. L'ac.citrico, per recuperarlo, si precipita dalla soluzione con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e poi con acido solforico (precipita il Ca)



F1, F2, F3, F4: filtri rotativi  
 C1, C3: resine e scambio ionico  
 C2: carboni attivi  
 R1: fermentatore

### Produzione di antibiotici

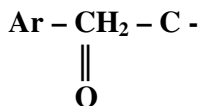
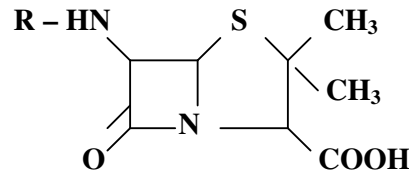
Gli antibiotici prodotti da microrganismi hanno la capacità di distruggere altri microrganismi. Si dividono in : penicilline, eritromicine, cefalosporine e tetracicline. I microrganismi che producono antibiotici appartengono a : Streptomyces, Penicillium e Cefalosporium (muffe).

La penicillina è attiva ai batteri Gram+ ( inibisce la sintesi della parete cellulare) .

Ha formula generale:

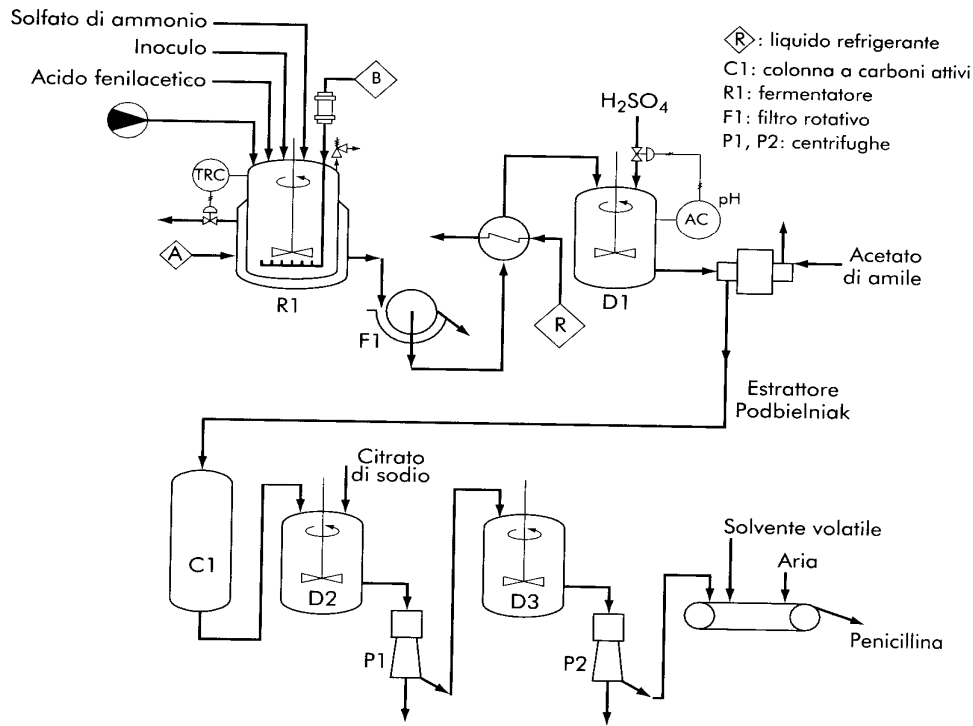
Variando R si ottengono le varie penicilline.

Per fermentazione si ottiene la penicillina G in cui a posto di R vi è :



Preparazione dell'inoculo: Industrialmente si sfrutta l'azione delle muffe Penicillium Chrysogenum capaci di sintetizzare la penicillina G. I ceppi selezionati vengono liofilizzati a -38°C. Segue la fase di vegetazione che avviene per incubazione in provetta a 24°C in apposito terreno, dura 5 giorni, e poi in pallone per 48 ore. Passa poi al fermentatore di preparazione.

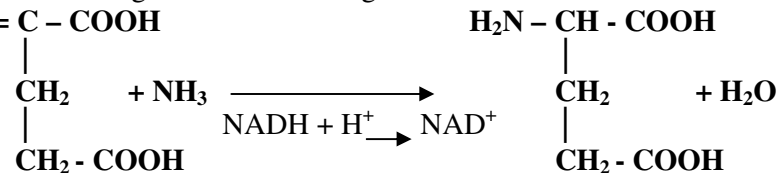
Il fermentatore è discontinuo con volume di centinaia di m<sup>3</sup> per 5-7 giorni. L'inoculo rappresenta il 4-6% del brodo di fermentazione. Avviene a 23-28°C e pH 6,5, con tasso di consumo di ossigeno (OUR) 0,4-0,8 mmol al minuto per litro. Come substrato si usano fonti di glucosio, fruttosio, amidi ecc. Alla fine il brodo viene filtrato e raffreddato a 4°C per evitare possibile degradazione. Passa poi in filtri a carbone attivi (elimina le impurezze). La penicillina viene infine precipitata con acetato di Na e i cristalli separati per centrifugazione.



*Produzione della penicillina.*

### Produzione di aminoacidi

Importante sono: l'acido glutammico (esaltante sapori) e gli aminoacidi essenziali (integratori alimentari). Il processo biotecnologico produce l'enantiomero- L (utile per gli organismi viventi). Si usano batteri del tipo *Corynebacterium glutamicum*. Essi agiscono sull'intermedio del ciclo di Krebs:  $\alpha$ -chetoglutarico:



è catalizzata dall'enzima glutammatodeidrogenasi

La reazione complessiva è:  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3/2 \text{O}_2 + \text{NH}_3 \longrightarrow \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 + 3 \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

L'azoto viene fornito come NH<sub>3</sub>, urea o Sali di ammonio. E' necessario inibire ulteriori processi. Si utilizzano fermentatori discontinui di centinaia di m<sup>3</sup>. Durata 1-2 giorni, a 30°C e pH 8.

Si insuffla aria per assicurare il processo aerobico. Si separa per centrifugazione.

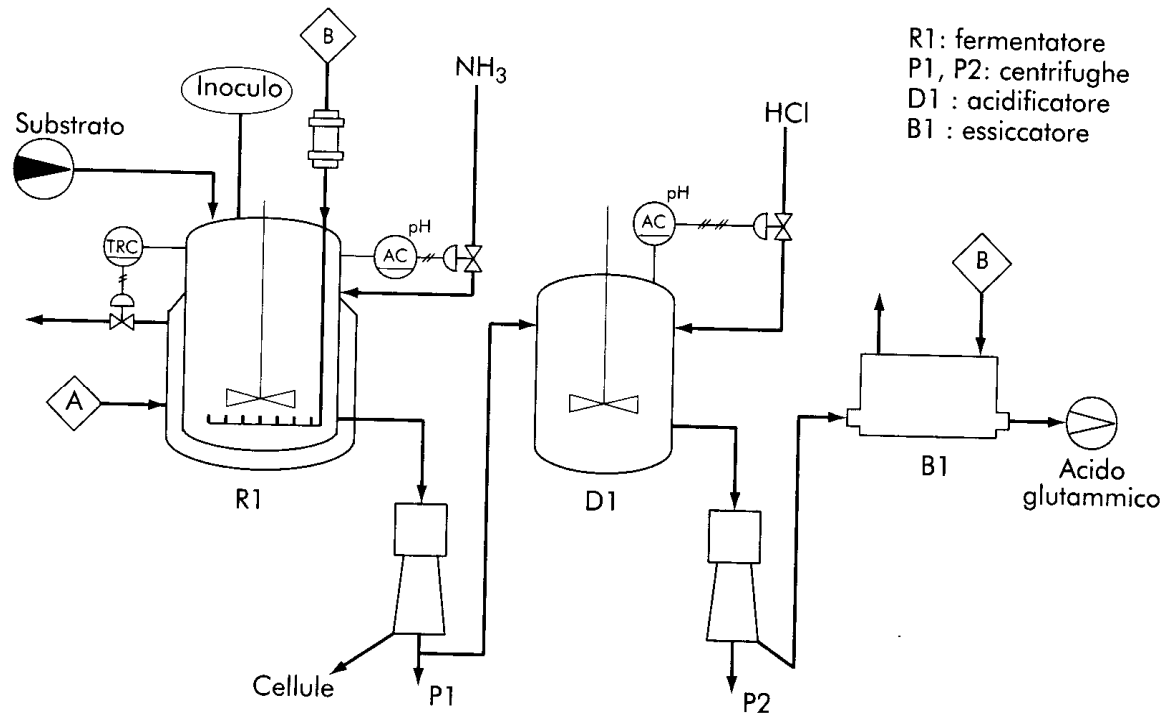


Fig. 8.10 Produzione di acido glutammico