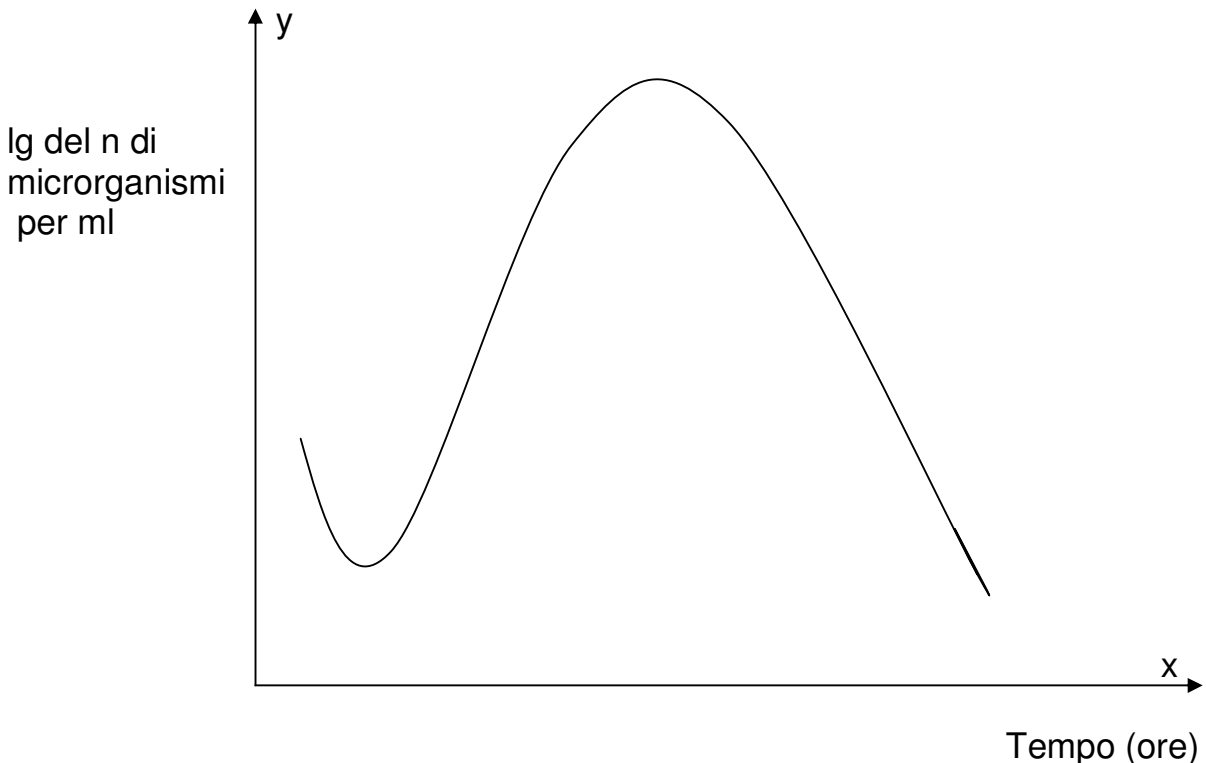


7. Moltiplicazione e genetica batterica

Definiamo TEMPO DI GENERAZIONE l'intervallo di tempo, che intercorre tra una moltiplicazione cellulare e la successiva. In un substrato liquido, il decorso della moltiplicazione è rappresentabile dalla cosiddetta CURVA DI CRESCITA.



Grazie al grafico notiamo che:

- nella prima fase detta di LATENZA, in cui non aumenta il numero di cellule, anzi diminuisce, a causa dell'adattamento delle cellule al nuovo ambiente.
- Una seconda fase, molto breve, in cui inizia lo sviluppo di un certo numero di cellule.
- Una terza fase detta ESPONENZIALE, in cui si ha la crescita molto rapida e proporzionale al numero di batteri presenti.
- Una quarta fase detta STAZIONARIA, in cui il numero di batteri vivi si mantiene costante, poiché il numero di cellule morte è bilanciato da quello di nuove cellule formate.
- Una quinta fase di MORTE, in cui il numero di cellule che muoiono è sempre più grande.

Velocità di accrescimento

Il meccanismo di riproduzione delle cellule è in genere per divisione binaria in tempi brevi.

Consideriamo un solo microorganismo. Dopo un atto generativo ne avremo due; dopo un altro ne avremo quattro; dopo n atti ne avremo 2^n . partendo da x_0 microrganismi, dopo n atti generativi, si avranno x microrganismi:

$$X = X_0 \cdot 2^n$$

e le generazioni saranno:

$$n = \frac{\ln X - \ln X_0}{\ln 2}$$

di conseguenza, differenziando:

$$\frac{dX}{dt} = K \cdot X$$

Questa relazione è valida solo per fermentazioni discontinue (processi fermentativi che vengono condotti dall'inizio alla fine e che vengono, dopo aver svuotato tutto l'impianto, averlo sterilizzato e riempito con materiale fresco, nuovamente messi in funzione) , ma anche per processi continui (processi fermentativi per cui l'impianto è sempre acceso). Per questo processo sarà meglio regolare sempre le portate, perché la quantità di prodotto da prelevare deve essere uguale alla quantità di ceppi di cellule

immesse ad inizio processo. Ciò è molto difficile poiché il processo in questione è oneroso sia per l'alimentazione, sia per tempo occorrente che in campo industriale è di rilevante importanza.

Ritornando alla K citata nell'equazione precedente si deve aggiungere che venne proposta da MONOD e deriva dalla seguente equazione:

$$K = K_{\max} \cdot \frac{S}{K_{\text{sat}} + S}$$

dove:

S = concentrazione del substrato in g / l;

X = concentrazione del microrganismo come n. di cellule / l o g / l;

K_{sat} = costante di nutrizione che è uguale alla concentrazione del substrato in cui la velocità specifica di crescita corrisponde alla metà della velocità massima di sviluppo

(cioè $K_{\text{sat}} \longrightarrow \frac{1}{2} K_{\max}$);

K_{\max} = velocità massima di crescita in s^{-1} .

A questo punto, poiché $K = D$ bisogna sostituire nell'equazione $\frac{dx}{dt} = K \cdot X$

quindi:

$$\frac{dX}{dt} = D \cdot X$$

Questa relazione vale per processi continui che si trovano nello stato stazionario, ma la coltura continua può presentare il problema della CATABOLITE REPRESSION, fenomeno per cui alte concentrazioni di prodotti di carbonio possono reprimere la produzione. Per ovviare a questi inconvenienti si sviluppò la coltura semicontinua.

In una coltura semicontinua si toglie, ad intervalli regolari dal fermentatore, una certa frazione di terreno ad alta concentrazione di prodotto reintegrandolo con terreno fresco. Questa tecnica ha lo scopo di prolungare nel tempo la massima produttività, oltre a quello di evitare il fenomeno di repressione dei cataboliti.

Questa coltura ha molti punti in comune con la coltura continua, il più importante dei quali è la velocità specifica di crescita che può essere controllata dalla velocità di diminuzione. Quindi in entrambi i casi le relazioni ricavate mantengono una sostanziale validità, poiché, in entrambi i sistemi esiste una sostanza nutritiva del substrato che regola la velocità di crescita. Tale sostanza si chiama "SOSTANZA NUTRITIVA LIMITANTE" (S_n).

Nelle equazioni precedenti riguardanti i processi continui e semicontinui occorrerebbe, quindi, aggiungere S_n .

Fase prevegetativa

Il microrganismo, dopo esser stato isolato, viene conservato su terreno solido

(slant) a temperature molto basse ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), oppure in fiale liofilizzate a temperatura di $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Così conservato viene trasferito su un terreno solido e posto in cella termostatica.

Il micelio, formatosi in superficie, viene trasferito in recipienti contenenti terreno liquido e posto a crescere su agitatori oscillanti (shaker) in camere termostatiche. Un'aliquota della coltura viene trasferita in un pallone che viene pure agitato in camera termostatica.

Fase vegetativa.

Quando la coltura ha raggiunto nel pallone la crescita ottimale, si ha il trasferimento in un reattore agitato e aerato di volume variabile tra 100 e 6000 l, dove avviene la fase vegetativa.

Fase produttiva.

All'inizio tutte le sostanze nutritive venivano poste nel terreno produttivo, mentre attualmente vengono aggiunte in continuo o a seconda delle

necessità. L'operazione avviene nel fermentatore, un serbatoio termostato a cui viene rifornita continuamente aria.

Il tempo della fermentazione varia da alcune ore a 20 giorni. Il volume dei fermentatori varia da pochi litri a centinaia di metri cubi.

Sterilizzazione

Per sterilità si intende la totale assenza di microrganismi viventi in un determinato ambiente. In pratica esso viene inteso come riduzione del numero di microrganismi da un valore di sicurezza.

La sterilizzazione può essere ottenuta mediante due vie:

- distruzione dei microrganismi
- filtrazione

Sterilizzazione in batch

Avviene per mezzo di vapore flussomministrato attraverso tutti gli ingressi di fermentazione. Una parte del lavoro di disattivazione viene compiuto nelle fasi di salita e di discesa della temperatura. Questo effetto cresce col crescere delle dimensioni del fermentatore.

Sterilizzazione continua

Questo metodo è nettamente migliore del precedente. Gli sterilizzatori continui sono di due tipi:

- a iniezione diretta di vapore
- a scambiatore di calore

Il primo consiste in un tubo, nel quale scorre il liquido da sterilizzare. All'inizio del tubo viene iniettato del vapore, che porta la temperatura al valore desiderato, il liquido percorre un tratto della tubazione e viene fatto espandere sottovuoto per il raffreddamento. Il tipo a scambiatore di calore era in origine a piastre e presentava grosse difficoltà, per i liquidi contenenti particelle in sospensione. Oggi si preferisce il tipo a fascio tubiero. Rispetto al metodo ad iniezione presenta molti vantaggi in più: consente un recupero del calore ed una migliore utilizzazione del vapore con recuperi fino al 60 %.

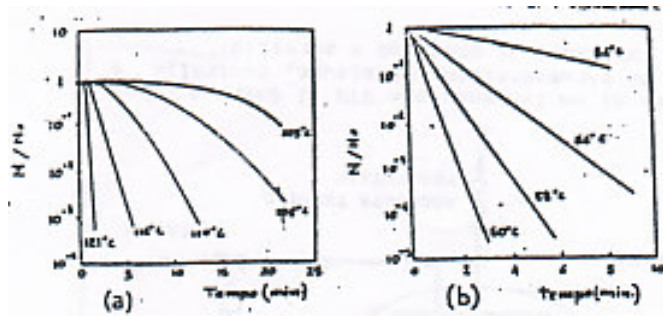
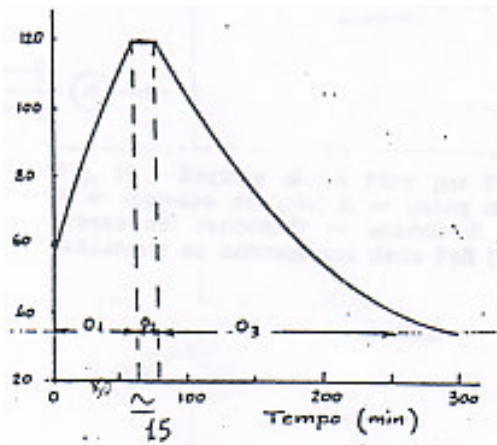


Fig. 15 - Andamento nel tempo della mortalità delle spore (a) e delle cellule (b) per effetto del calore (10).

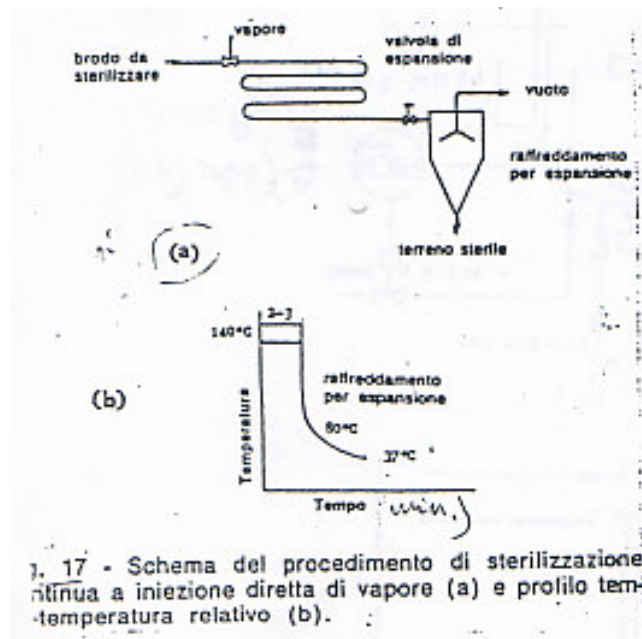


Fig. 17 - Schema del procedimento di sterilizzazione continua a iniezione diretta di vapore (a) e profilo temperatura relativo (b).

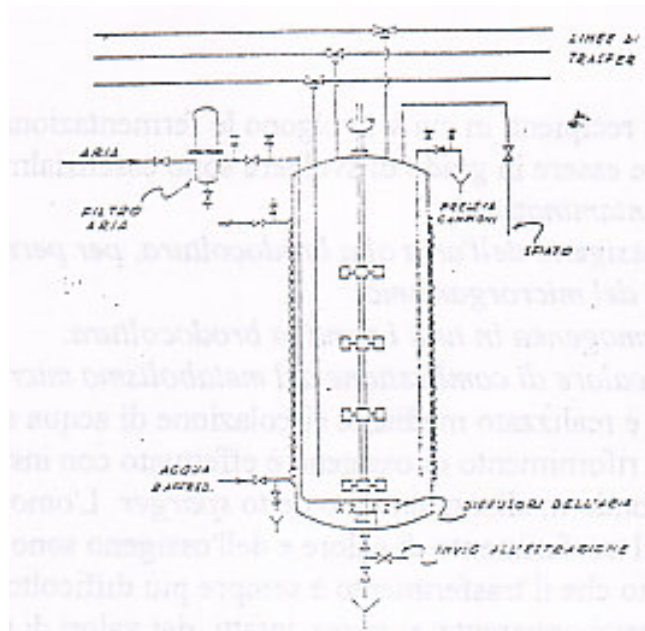
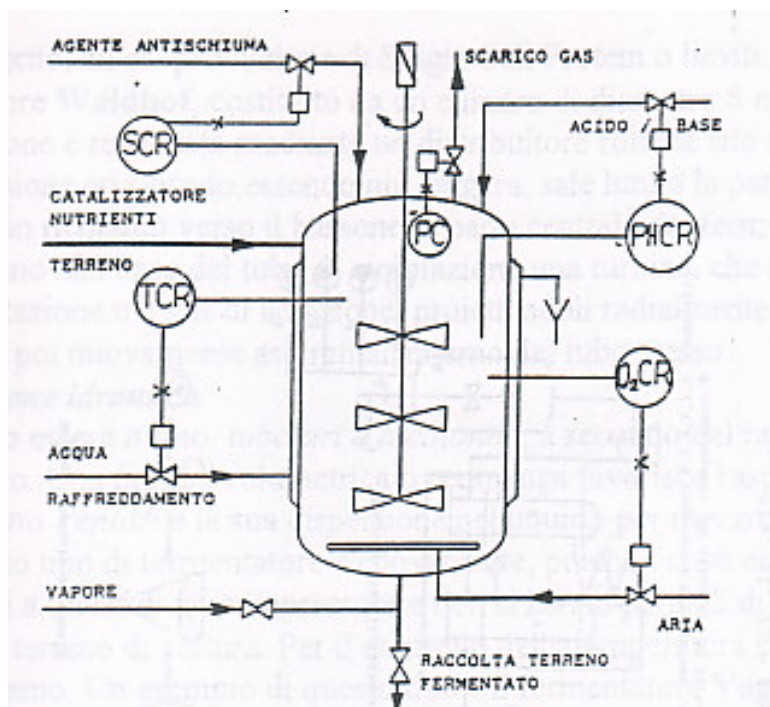


Fig. 3 - Fermentatore tradizionale STR (stirred tank reactor).



Sterilizzazione dell'aria

Tra i sistemi di separazione occorre distinguere due classi di apparecchi completamente diversi:

- filtri per esclusione
- filtri per captazione

La filtrazione per esclusione è la più nota e diffusa per i liquidi , ma si è diffusa anche per gli aeriformi. Per gli aeriformi si usano membrane microporose pieghettate per aumentare la superficie.

La filtrazione per captazione opera in base al principio dell' arresto delle particelle disperse in un gas per opera di letti filtranti, costituiti da materiali porosi aventi meati tra le singole fibre. Il meccanismo di ritenzione è basato sulla somma di almeno quattro tipi di azione :

- fissazione per urto dovuto ad inerzia
- intercettazione diretta
- diffusione
- forze elettrostatiche

Questi filtri devono funzionare a secco. L'aria che arriva ai filtri deve avere un'umidità molto bassa e ciò si può ottenere riscaldandola a 70 °C .

Fermentatore STR

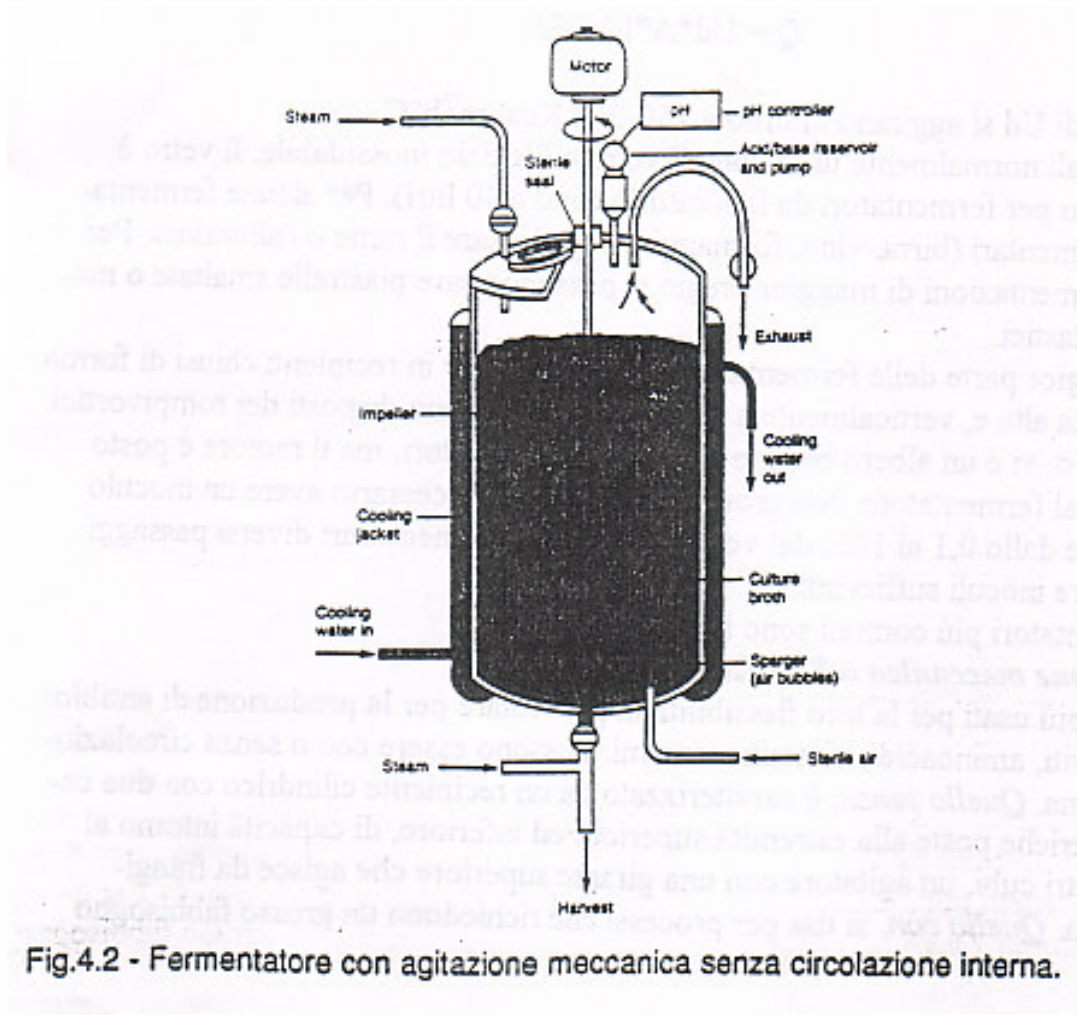
Il fermentatore STR è fra i più usati per la produzione di antibiotici, lieviti, amminoacidi, vitamine ed enzimi. Le sue dimensioni sono variabili da qualche centinaio a diverse decine di migliaia di litri, con un' altezza pari a 3-4 volte il diametro. È fornito di agitatore a turbina a palette, frangiflutti, camicia o serpentina di raffreddamento o riscaldamento, ecc.

Fermentatore ad agitazione idraulica

I fermentatori Ad agitazione idraulica possono essere a tino, tubolari o a colonna a secondo del rapporto altezza / diametro. Una pompa centrifuga favorisce l' aspirazione dell' aria per effetto Venturi e la sua dispersione nel liquido per mezzo di eiettori. Poiché i costi di una pompa sono minori rispetto quelli di un compressore è consigliato l' uso di questo tipo di fermentatore. Per il controllo della temperatura si usa uno scambiatore esterno.

Fermentatori ad agitazione meccanica.

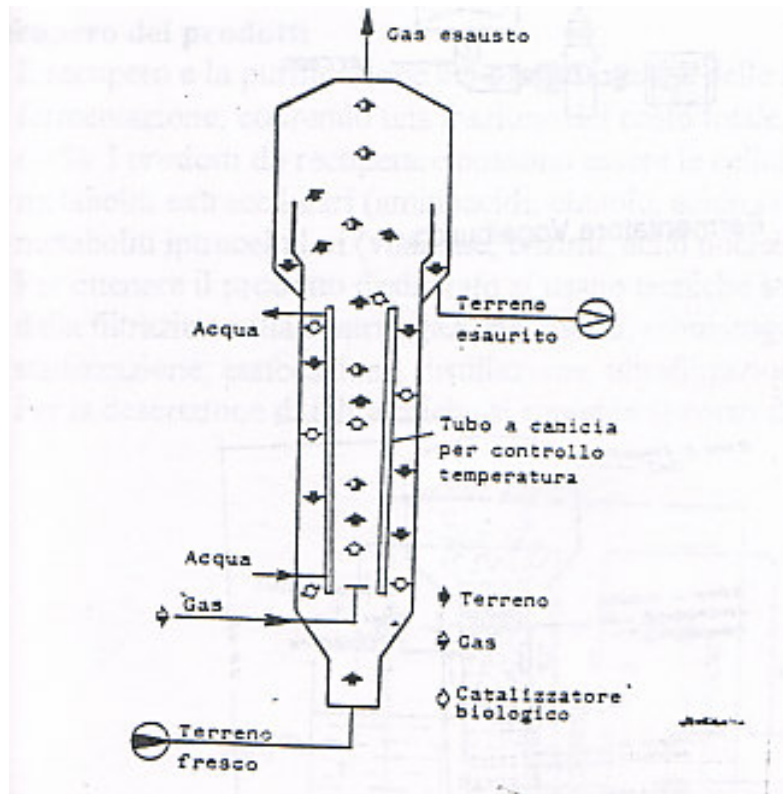
In questi fermentatori viene insufflata aria compressa nel brodo di coltura, che subiscono un riciclo interno con l'introduzione di un diaframma circolare interno di diametro minore di quello esterno. In basso sono rappresentati un reattore Air- lift e un reattore sferico.



Fermentatori a letto fisso e fluido.

Quello a letto fisso consiste in una colonna di riempimento, formato da catalizzatore biologico immobilizzato come descritto in precedenza su un supporto opportuno e con il terreno di coltura che viene fatto percolare dall'alto. Ma esistono anche reattori tubolari, in cui il catalizzatore biologico viene fatto crescere sulle pareti dello stesso reattore. Questo tipo di

fermentatore è usato nei filtri percolatori per il trattamento biologico di liquami o per la produzione di aceto da vino o altri prodotti alcolici.



Il bioreattore

Il bioreattore a letto fluido è costituito da un tubo verticale, che si allarga nella parte superiore e da un tubo interno a camicia per il controllo della temperatura. Il brodo di coltura subisce un riciclo interno, il terreno di coltura è inviato dal basso e quello esaurito esce dall'alto. Il catalizzatore è immobilizzato in microsferi e mantenuto in sospensione nella zona superiore, dove perde velocità.

I materiali usati vanno dagli acciai inossidabili a quelli al carbonio a rivestimento anticorrosivo. La vita di un fermentatore, più che dalla resistenza del materiale, dipende dalla tecnologia in rapida evoluzione.

In linea generale i processi continui hanno il grosso vantaggio delle difficoltà di mantenere condizioni sterili.