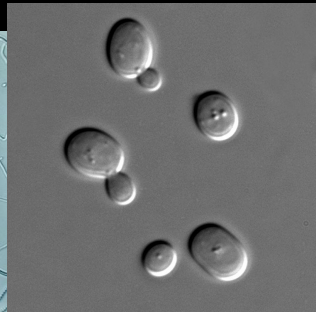
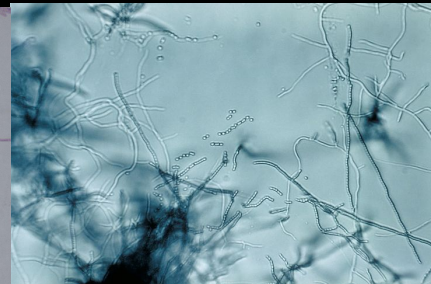


# Microbiologia industriale

Microbi, bioreattori e tutto quanto  
è necessario per ottenere un  
prodotto garantito a basso costo  
ed alta resa



# MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE

## INDICE

Introduzione

I microbi

Una nuova produzione

I terreni

I prodotti

I bioreattori

I processi

Preparazione inoculo

Downstream

Photo credits

BioTecnologieSanitarie.it

# INTRODUZIONE



BioTecnologieSanitarie.it

# Introduzione

Gli studi, condotti nella seconda metà del XX secolo, sul DNA, sul genoma dei microbi (in particolare batteri e lieviti) e delle cellule eucariote e sulle loro vie metaboliche, e la possibilità offerte dalla ingegnerizzazione del DNA stesso hanno accelerato sempre di più, come ovvia conseguenza, le applicazioni in campo industriale.

Ma il processo era cominciato fin dal XIX secolo.

Il racconto di come è nata la microbiologia industriale vede due nomi in quell'epoca storica:

- Emil Christian Hansen
- Louis Pasteur

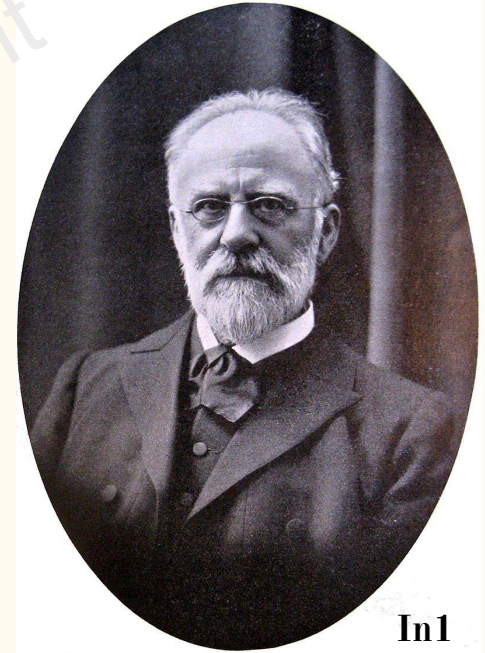
# Introduzione

**Emil Christian Hansen** (1842 - 1909)

Micologo danese che indagò sul mondo dei lieviti anche grazie al suo lavoro. Infatti era impiegato alla Carlsberg, attualmente una delle più importanti multinazionali nel campo della birra con sedi in 50 paesi del mondo. Fondata nel 1847, la Carlsberg attrezzò nel 1875 un laboratorio per studiare scientificamente il processo di produzione.

Il contributo di Hansen, a partire dal 1876, fu fondamentale. Isolò una cellula di lievito e la mise a contatto con una soluzione zuccherina. Ne ottenne un gran numero di cellule. Aveva scoperto il Saccharomyces carlsbergensis, l'agente fermentante della birra lager, ottenuta con un procedimento di bassa fermentazione. Il nome fu attribuito in onore del birrificio ma attualmente il lievito è stato rinominato S. pastorianus ed è più corretto perché se ne conoscono le caratteristiche in modo più dettagliato. Infatti è un ibrido tra *S. bayanus* e *S. cerevisiae*.

Ad Hansen quindi si devono studi importanti sul processo chimico e microbiologico alla base della produzione industriale della birra.



In1

# Introduzione

**Louis Pasteur** (1822 - 1895)

Fu un chimico, biologo e microbiologo francese il cui nome è legato a tappe fondamentali nella storia delle scoperte scientifiche. A parte il famoso esperimento che decretò la fine della teoria della generazione spontanea, fu proprio Pasteur a capire che i tradizionali processi fermentativi alla base della produzione del vino e della birra non erano una conseguenza solo della chimica. Un paio di decenni prima di Hansen isolò i funghi microscopici responsabili delle alterazioni di birra e vino e pensò che solo un opportuno uso del calore avrebbe potuto migliorare la conservazione e quindi preservare da alterazioni birra e vino. Era nata la pastorizzazione. Tra il 1854 e il 1864 furono molti i suoi studi, le sue scoperte e le sue applicazioni in questo campo.



# Introduzione

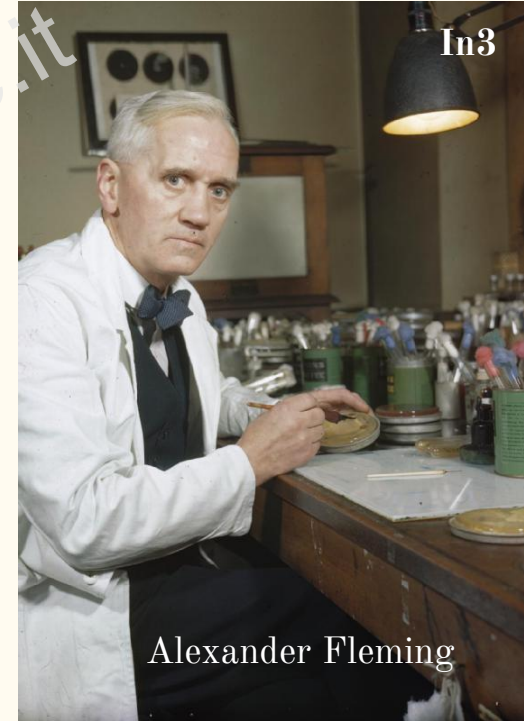
Il passo successivo nei processi di microbiologia industriale, all'inizio del XX secolo, fu la sterilizzazione.

Altra tappa fondamentale la scoperta di penicillina e di altri antibiotici. Negli anni della Seconda Guerra Mondiale si iniziò la sua produzione su scala industriale.

Alla penicillina è legato il nome di **Alexander Fleming** (1881 -1955).

In realtà lo scienziato l'aveva scoperta già nel 1928 ma la sua produzione era stata considerata troppo onerosa dalle case farmaceutiche. Al suo posto vennero preferiti i sulfamidici, poi lanciati dalla Bayer nel 1935.

Gli studi di Fleming furono ripresi da altri ricercatori nel 1939 che riuscirono ad isolare il principio attivo in modo più efficace. Con l'aiuto dello stesso Fleming, del governo e dell'Esercito americano fu messo a punto un processo industriale efficace e a basso costo. Ma per convincere le case farmaceutiche europee si dovette aspettare il 1942 quando Fleming salvò un suo amico morente per meningite somministrandogli la penicillina.



# Introduzione

La scoperta, negli anni Cinquanta, della struttura del DNA da parte di Watson e Crick e di conseguenza gli studi microbiologici e di biologia molecolare che ne seguirono diedero poi una spinta ulteriore alla veloce evoluzione della microbiologia industriale.

Dagli ultimi decenni del XX secolo sono sempre di più, quindi, i metaboliti primari e secondari di microbi opportunamente scelti e modificati che vengono prodotti in grandi quantità. E non solo. I microbi ingegnerizzati sono oggi al servizio dell'umanità per produrre anche molecole a loro completamente estranee. Basti pensare all'insulina umana indotta ad essere sintetizzata all'interno di cellule batteriche che è stato uno dei primi successi in questo campo.

A volte per talune produzioni si deve ricorrere a cellule animali o vegetali. Inoltre molte sostanze chimiche prima prodotte con tecnologie tradizionali oggi vengono ottenute anch'esse con processi innovativi su base biotecnologica.



# Introduzione

In altre parole, in molti settori, la chimica tradizionale sta cedendo il passo alle biotecnologie.

Ma quando si passa dalla sperimentazione in laboratorio e in piccoli volumi alla produzione in quantità decisamente molto maggiori i problemi da affrontare sono molteplici.

L'industria deve tenere sempre conto del **rapporto tra costi e resa del processo**.

Un conto è coltivare microbi in pochi ml di terreno costoso per fare test preliminari o avviare un test pilota fino a 10 litri di terreno e un conto è scegliere un terreno ottimale da usare per la produzione industriale che prevede bioreattori anche della capacità di 300.000 litri.

Inoltre i microbi per essere produttivi al massimo devono vivere e svilupparsi in condizioni ottimali.

# Introduzione

A quanto fin qui esposto si aggiungono altri punti strategici che richiedono tempo e pazienza. Infatti oltre agli studi iniziali sperimentali sul prodotto stesso, per poter avviare una produzione industriale biotecnologica ottimale si devono prendere anche in considerazione questi altri aspetti:

- terreno di coltura, scelto tra materie prime naturali o più spesso, in maniera ottimale, da residui di altre lavorazioni per abbassare i costi
- costi energetici, da studiare con attenzione nell'ottica sempre del contenimento delle spese
- prodotti, devono essere ecologicamente compatibili e con scarti di produzione possibilmente da avviare al riciclo

# Introduzione

- fermentatori o bioreattori, devono essere studiati secondo il tipo di produzione che coinvolge microbi o cellule animali o vegetali e le loro caratteristiche colturali
- sterilizzazione, è un altro grosso problema perché bisogna garantirla in ogni fase produttiva, compresa l'aria che viene immessa nel fermentatore
- tipo di processo produttivo, deve essere scelto tra tre metodologie - a lotti, continuo o semicontinuo -
- immobilizzazione dei biocatalizzatori, sistemi di controllo e recupero dei prodotti sono altri punti chiave importanti.

# I MICROBI



# I MICROBI

Il punto principale di una produzione industriale microbiologica è la **scelta della popolazione microbica**. Se ne deve conoscere bene non solo la struttura del DNA ma tutte le sue vie biochimiche e le esigenze colturali per poterlo far sviluppare in condizioni ottimali.

Se ne deduce che l'industria utilizza per lo più colture microbiche pure a volte prodotte da altre industrie. Basti pensare alle produzioni biotecnologiche alimentari che ricorrono a starter specifici piuttosto che fare affidamento a microbi presenti spontaneamente in natura come succedeva nella produzione di birra, vino e yogurt e nella panificazione prima dello sviluppo della industria alimentare. Lo sviluppo spontaneo è lento, non rientra nei tempi industriali e soprattutto non garantisce i requisiti standard del prodotto.

# I MICROBI

I microbi per lo più utilizzati sono batteri, lieviti e funghi filamentosi. Ne ricordo alcuni già ampiamente noti.

- Escherichia coli
- Bacillus subtilis
- Bacillus thuringiensis
- Lactobacillus e Streptococcus
- Il genere Streptomyces
- Saccharomyces cerevisiae

# I MICROBI: E. coli

## Escherichia coli

Batterio Gram-negativo. È un enterobatterio, il principale indicatore di contaminazione fecale delle acque ma viene considerato l'organismo modello dei batteri perché il più studiato. Se ne conoscono 171 sierotipi diversi ognuno con una combinazione specifica dei suoi antigeni K, H ed O.

La molecola di DNA circolare è ben nota nella sua intera sequenza genomica fin dal 1997; ha 4,6 milioni di basi azotate appaiate, con 4288 geni per le proteine, 7 operoni per l'RNA ribosomiale, 86 geni per il tRNA.



# I MICROBI: *B. thuringiensis*

## **Bacillus thuringiensis.**

È un batterio Gram-positivo noto anche come Bt utilizzato nella lotta biologica contro molti insetti.

Opera producendo una neurotossina (delta-endotossina) che è innocua per l'uomo ma paralizzante per i bruchi dei lepidotteri e letale per le larve dei ditteri. La scoperta della sua azione insetticida, non dannosa per l'ambiente è stata considerata un grande traguardo.



*B. thuringiensis* al microscopio.  
Ingrandimento 1000x

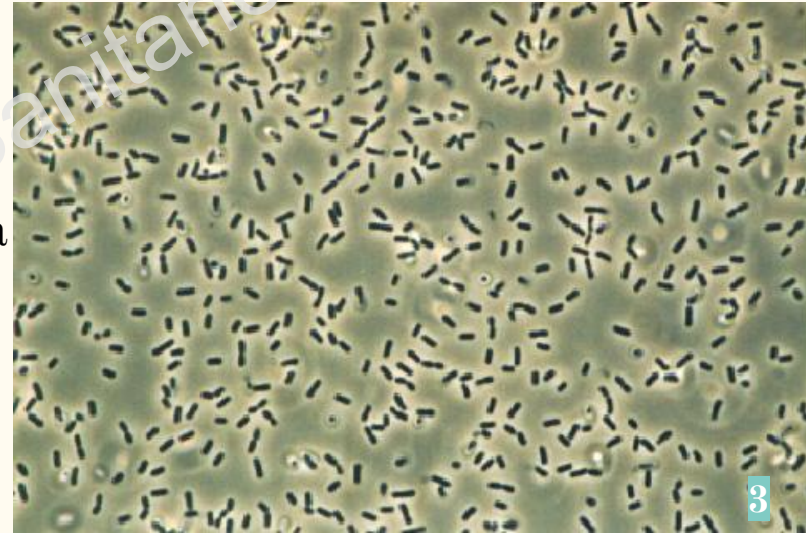


# I MICROBI: *B. subtilis*

## **Bacillus subtilis.**

Batterio Gram positivo, usato nell'industria biotecnologica per produrre amilasi e acido ialuronico. Una volta era noto come vaccino subtilico al posto degli antibiotici. È stato ampiamente studiato, vista anche la sua assenza di patogenicità e la facilità con cui trasferisce o riceve frazioni di DNA o interi cromosomi con la trasformazione.

Nel suo cromosoma sono state individuate 4.146.839 paia di basi azotate per un totale di 4292 geni.



# I MICROBI: Lactobacillus e Streptococcus

## Lactobacillus e Streptococcus

I due generi di batteri sono molto utilizzati nell'industria casearia per la produzione di acido lattico nei processi fermentativi.

Maggiori dettagli li trovate nel [“le produzioni biotecnologiche alimentari: yogurt e verdure fermentate”](#)



# I MICROBI: Streptomyces

## Streptomyces.

È un attinomicete, cioè un batterio Gram-positivo aerobio che forma un micelio molto ramificato, come si può vedere nella foto, e spesso pigmentato.

Tra i suoi metaboliti la streptomicina che è un antibiotico attivo verso molti batteri Gram-negativi.



# I MICROBI: *Saccharomyces cerevisiae*

## *Saccharomyces cerevisiae*.

Si tratta di un lievito quindi un microrganismo a cellula eucariote il cui sequenziamento totale risale al 1996 (13 milioni di coppie di basi). Si stima che condivida il 23% del suo genoma con l'uomo. Essendo il microrganismo più comune nelle fermentazioni è molto utilizzato nelle produzioni biotecnologiche alimentari (pane, birra e vino) e non solo.



# I MICROBI

Ovviamente la carrellata di microbi non è affatto esaustiva. Ne incontreremo molti altri trattando i vari settori della microbiologia industriale.

Ma la ricerca non si ferma mai. Gli screening per individuare altre forme microbiche che potrebbero essere utili per vari tipi di biotecnologie sono sempre in atto.

Considerate semplicemente i numerosi rischi che l'umanità potrebbe vivere con la sempre più accentuata resistenza opposta dai batteri agli antibiotici. L'OMS stima a 10 milioni di morti nei prossimi anni il probabile impatto (stime del 2015) di questo problema nascente.

Quindi, oltre ai tanti centri di ricerca universitari e farmaceutici già impegnati, stanno nascendo molte start up di giovani e meno giovani con esperienza in questo settore che setacciano le matrici ambientali, soprattutto il suolo, nella speranza di trovare nuovi microbi utili.

# UNA NUOVA | PRODUZIONE



BioTechnologieSanitarie.it

# UNA NUOVA PRODUZIONE

Quando si tratta il campo industriale **il fattore tempo e il fattore economico hanno un'importanza prioritaria.**

Come si procede allora per ottimizzare entrambi quando si vuole avviare una nuova produzione biotecnologica?

- **Screening:** per individuare ceppi microbici utili si setacciano le matrici ambientali e si isolano colonie pure. Poi le si sottopongono a test di varia natura (saggi di attività e analisi cromatografiche) per valutare i loro prodotti metabolici primari o secondari di interesse
- **Tecniche di mutagenesi** si inducono mutazioni per ottenere ceppi alto-produttori, perché non sempre quelli trovati lo sono. Si procede, in genere, attraverso irradiazione con raggi X e gamma, l'uso di analoghi di basi o di acridine (agenti intercalanti).

# UNA NUOVA PRODUZIONE

Una volta superati questi punti problematici si prosegue con altri importanti step.

- **Impianto pilota.** Chiaramente una volta isolato un ceppo microbico di interesse si deve passare ad una simulazione di produzione industriale e questo avviene per stadi. Non si può pensare di passare da pochi millilitri ad un bioreattore vero e proprio che può arrivare alla capacità di 300.000 litri. Si procede quindi con reattori da banco della capacità di non più di 20 litri.



Bioreattori da banco



# UNA NUOVA PRODUZIONE

- **Progettazione impianto.** Questa è l'ultima fase che deve però tenere conto dell'ottimizzazione di tante procedure. A parte il discorso dei costi che deve essere sempre tenuto presente bisogna fare in modo che il prodotto si possa ottenere sempre, che ci sia stabilità nelle temperature di sterilizzazione, che non ci siano formazione di schiume o altri effetti indesiderati, che non ci sia presenza di prodotti secondari con difficoltà di separazione ...  
E poi bisogna garantire sempre l'aspetto igienico-sanitario, già evidenziato perché estremamente importante.  
Anche gli aspetti della logistica devono essere considerati.

# UNA NUOVA PRODUZIONE

Quindi è vero che il fattore tempo per l'industria è vitale ma non sempre questi tempi appena descritti possono essere rapidi.

Non è detto che si riesca ad individuare facilmente un ceppo microbico di interesse, e anche se lo fosse non è detto che possa essere utilizzato. A volte indurre mutazioni non è così semplice.

I problemi possono davvero essere molteplici.

Passiamo ora all'esame dei terreni da utilizzare.

# I TERRENI



# I TERRENI

In microbiologia industriale non si può certo ragionare come quando si coltivano batteri, funghi e lieviti in laboratorio.

Come è già stato chiarito bisogna prima di tutto tenere in considerazione i costi. I bioreattori hanno capacità che possono arrivare a 300.000 litri e quindi i produttori tendono a **scegliere terreni ottenuti da residui di altre lavorazioni**, molto più economici, purché rispettino determinate composizioni dal punto di vista qualitativo e quantitativo.

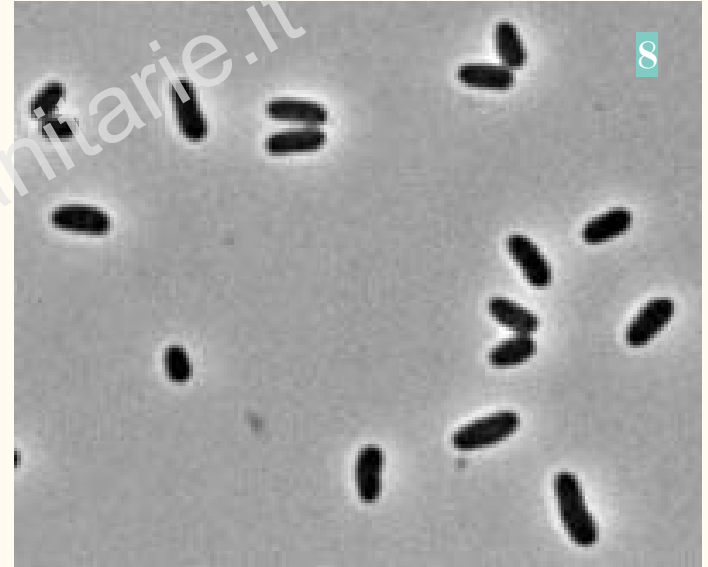
Inoltre la produzione industriale deve fare i conti con il metabolita primario o secondario richiesto. Quindi a volte è necessario preparare **terreni con eccesso di sostanze nutritive**. Per esempio se bisogna produrre una molecola polisaccaridica si può caricare il terreno di carbonio e diminuire la presenza di azoto.

# I TERRENI

Viceversa, in qualche caso si può pensare, conoscendo bene la via metabolica del microbo coinvolto, ad una **carenza nutrizionale**. L'esempio più noto è la produzione del glutammato da parte di *Corynebacterium glutamicum*.

Il batterio, in assenza di biotina, ne produce una maggiore quantità.

Il *C. glutamicum*, Gram-positivo, produce oltre al glutammato anche un altro aminoacido, la lisina.



*Corynebacterium glutamicum*

# I TERRENI

In certe produzioni sono indispensabili ceppi microbici mutanti, non tanto perché indotti alla mutazione per isolare ceppi alto-produttivi quanto perché **mutanti auxotrofi** vale a dire incapaci di sintetizzare alcuni nutrienti indispensabili per la loro crescita. Bisognerà allora sapere quale molecola è necessario aggiungere ai componenti del terreno di coltura e in quale quantità.

Continuo a ricordare quanto sia importante una conoscenza accurata delle vie biochimiche utilizzate dal microrganismo che si dovrà moltiplicare dentro al bioreattore. Può capitare che per isolare più facilmente un prodotto sia prioritario bloccare l'attività di un enzima a valle della sua produzione. Di conseguenza privare il terreno del cofattore specifico può risolvere il problema in modo semplice.

# I TERRENI

Se alcuni problemi della composizione dei terreni sono legati al processo produttivo in grandi quantitativi, altri aspetti sono comuni anche quando si opera in piccole quantità.

In altre parole i terreni usati devono essere fonte di carbonio, azoto, vitamine e minerali e di energia.

Vediamo quali sono i terreni più usati in microbiologia industriale.



# I TERRENI: melassa

La **melassa** è il residuo della lavorazione della barbabietola e della canna da zucchero. Si separa dallo zucchero per centrifugazione ed è un liquido denso, viscoso, piuttosto scuro come si vede nella foto.

La melassa da canna da zucchero è usata per produrre il rum (fermentazione) mentre quella da barbabietola viene utilizzata per la produzione del lievito di birra industriale e nell'alimentazione animale.

Ottima fonte di carbonio, inositolo, biotina e acido pantotenico.





# I TERRENI: liscivio solfitico

Il **liscivio solfitico** è un liquido che si ottiene dalla lavorazione del legno.

Il legno viene trattato chimicamente per solubilizzare la lignina e ottenere la pasta di cellulosa. Tra i sottoprodotti si ha anche il liscivio solfitico che viene separato per filtrazione e che poi deve essere trattato per eliminare ogni presenza di anidride solforosa.

Il liquido contiene circa il 20% di carboidrati ed è utilizzato soprattutto per la coltivazione di lieviti come *Saccharomyces* e *Candida*.

# I TERRENI: siero di latte

Il **siero di latte** è il residuo della coagulazione della caseina, la principale proteina del latte. Quindi lo si recupera nell'industria lattiero casearia durante la produzione dei formaggi. In genere non viene buttato via perché ci si produce la ricotta o lo si dà come alimento agli animali.

Anche l'industria biotecnologica ne fa ampio uso per la produzione di etanolo, acidi organici e le biomasse microbiche.

Contiene il 5% di lattosio, lo zucchero del latte.



Siero di latte di capra

# I TERRENI: estratto di malto e CSL

L'**estratto di malto** è un ingrediente comune dei terreni di coltura anche nei laboratori.

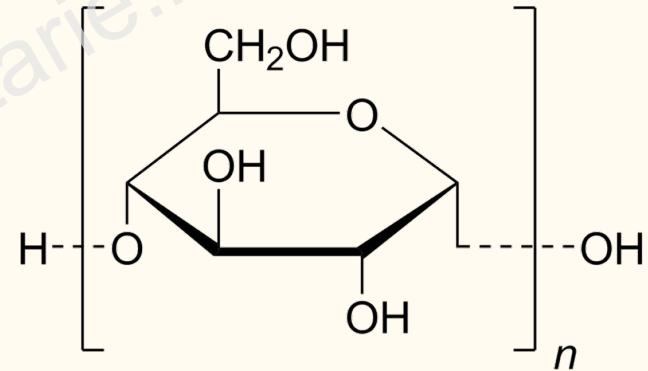
Deriva dalla lavorazione dell'orzo nella produzione della birra dopo l'essiccamento e l'ammostamento. Si ottiene un prodotto ricco di carboidrati e di azoto (5%) che viene venduto in genere come sciroppo o in forma solida.

**Corn steep liquor**. Si ottiene dal prettamento per la produzione dell'amido dal mais ed è l'acqua di macerazione residua. È un'eccellente fonte di azoto organico, vitamine e sali minerali.

# I TERRENI: maltodestrine

Le **maltodestrine**, usate nella produzione di antibiotici, sono polimeri di lunghezza variabile di glucosio (da 3 a 17 unità) con legame  $\alpha$ -1,4 glicosidico. Sono idrosolubili e si ottengono per idrolisi in ambiente acido da amido di patate e cereali.

Hanno un interesse nutrizionale anche nell'alimentazione di chi pratica sport perché sono facilmente digeribili e rapidamente assimilabili. Questa caratteristica dipende dalla facilità con cui si rompe il loro legame glicosidico.



$\alpha$ -1,4

$2 < n < 20$

12

# I TERRENI: borlande di distilleria ...

Le **borlande di distilleria** sono il residuo nella produzione di etanolo. Nell'ottica che non si deve buttare via niente ma si deve riciclare, anche le borlande vengono utilizzate in microbiologia industriale perché fonte di proteine e di vitamine del gruppo b. Inoltre contengono ancora tracce di lieviti.

**Farina di semi di soia.** Dalla soia si ottiene l'olio di semi. Il processo estrattivo lascia un residuo che è una farina con un alto contenuto di proteine.

Anche il residuo della lavorazione dei semi del cotone può essere utilizzato.

# I TERRENI

I terreni vanno scelti opportunamente in base alle esigenze nutrizionali dei singoli microrganismi e in relazione ai prodotti che si vogliono ottenere, come abbiamo già visto.

E poi oltre alle fonti di carbonio, azoto, vitamine e sali minerali bisogna anche tenere conto di:

- eventuali precursori che i microrganismi dovranno incorporare
- agenti antischiuma, vale a dire sostanze ad azione tensioattiva che riducono la tensione superficiale
- sistemi tampone; il fattore pH è estremamente importante e quindi, al di là dei sistemi di cui in genere i terreni sono provvisti, bisogna spesso aggiungere carbonati di calcio o fosfati per correggere pH acidi o alcalini

# I PRODOTTI



# I PRODOTTI

È arrivato il momento di sapere qualche cosa di più sui prodotti che si ottengono nei processi industriali biotecnologici.

Non sempre vengono impiegati i microrganismi intatti. A volte vengono sfruttati solo per produrre l'enzima giusto che, una volta estratto, può trasformare opportunamente un substrato. Gli enzimi possono agire liberi o immobilizzati. Quindi, a seconda che si usino solo gli enzimi o i microrganismi interi si parla di:

- ➔ **bioconversioni** da cui poi il prodotto deve essere separato
- ➔ **fermentazioni**, procedimento molto più complesso da controllare in cui la cellula fornisce il supporto e il mezzo biochimico e da cui poi il prodotto deve essere estratto o separato a seconda dei casi



# I PRODOTTI

Considerando entrambe le vie produttive i prodotti ottenuti dai microrganismi sono:

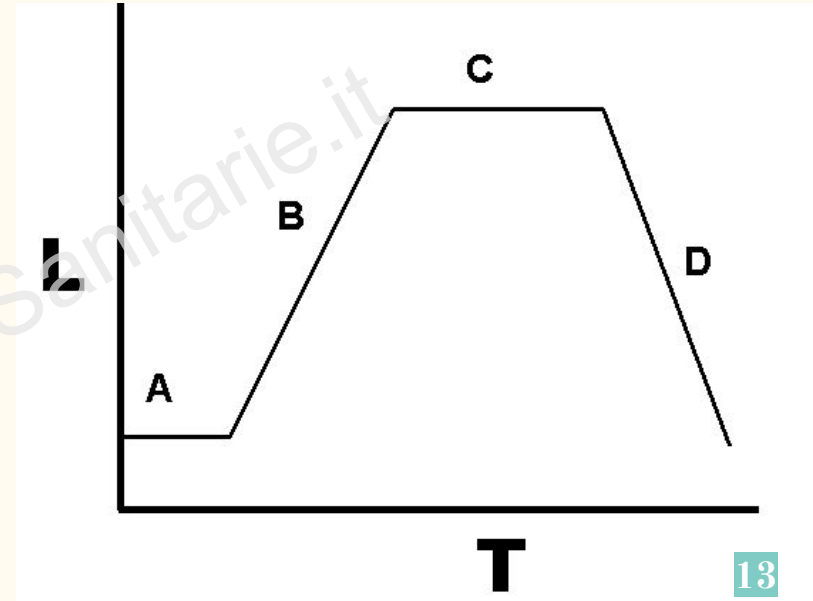
- ★ metaboliti primari
- ★ metaboliti secondari
- ★ biomasse microbiche
- ★ enzimi
- ★ alimenti
- ★ bioconversioni

# I PRODOTTI

Nell'esame di questo argomento teniamo sempre presente la **curva della crescita batterica** che è essenziale per capire perché i prodotti si ottengono in una fase piuttosto che in un'altra.

Il grafico si ottiene riportando:

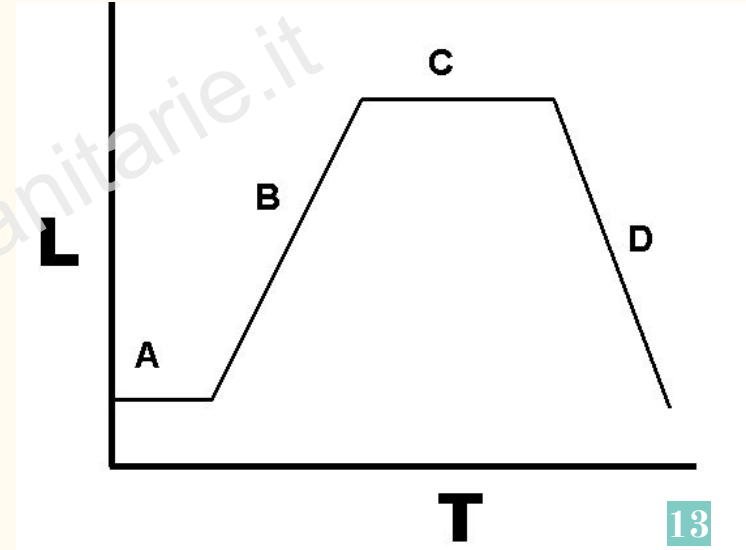
- ❖ sull'asse delle x il tempo
- ❖ sull'asse delle y il logaritmo del numero delle cellule vive o del numero di unità formanti colonia



- A. fase di latenza
- B. fase esponenziale o trofofase
- C. fase stazionaria o idiofase
- D. fase di declino o morte

# I PRODOTTI

- ❖ Fase di latenza o lag: i batteri si devono adattare al nuovo ambiente e questo richiede un tempo variabile; non aumentano.
- ❖ Fase di crescita esponenziale o log o trofofase: il consumo dei nutrienti e delle fonti energetiche è strettamente correlato all'aumento del numero delle cellule.
- ❖ Fase di latenza o idiofase: il sistema è in equilibrio; le nuove cellule sostituiscono quelle morte e tutto ciò succede perché incominciano a scarseggiare i nutrienti mentre si accumulano le sostanze di rifiuto.
- ❖ Fase di declino: per l'aggravarsi della situazione precedente le cellule morte sono sempre di più.



- A. fase di latenza
- B. fase esponenziale o trofofase
- C. fase stazionaria o idiofase
- D. fase di declino o morte

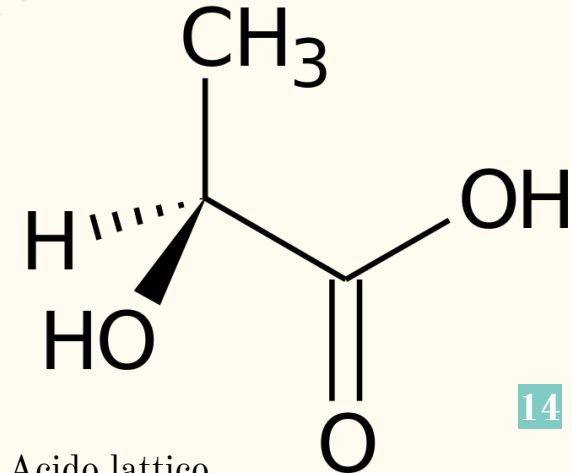
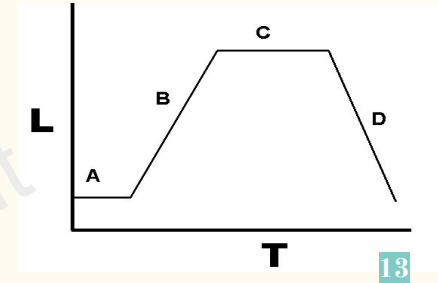
# I PRODOTTI: metaboliti primari

## Metaboliti primari.

Sono considerati essenziali per il metabolismo microbico nel suo complesso (sia le vie anaboliche che cataboliche) e in genere vengono prodotti durante la crescita esponenziale.

Alcuni esempi sono l'acido lattico, l'etanolo e alcuni aminoacidi.

Non è escluso però che possa avvenire la produzione anche durante la fase stazionaria (*acido citrico e fumarico*).



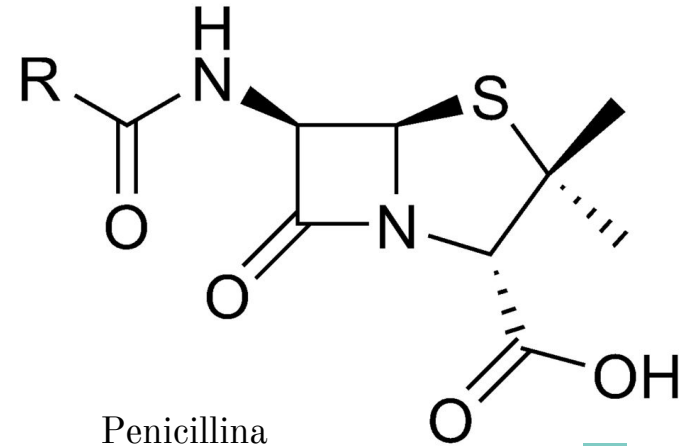
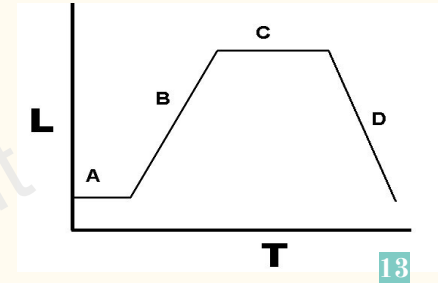
Acido lattico

# I PRODOTTI: metaboliti secondari

## Metaboliti secondari.

Non vengono considerati essenziali per la vita dei microrganismi e fanno la loro comparsa in genere durante la **fase di latenza**. Alcuni studiosi attribuiscono loro un significato più ecologico (attività antagonista, antimicrobica) o di protezione da agenti fisici o ancora di agenti di comunicazione.

Tra questi prodotti sono da ricordare gli antibiotici.



Penicillina

# I PRODOTTI: biomasse microbiche

## Biomasse microbiche.

Ovviamente in questo caso lo scopo è far aumentare numericamente e in modo ottimale il microrganismo in questione. A questo scopo vengono forniti nutrienti e fonti energetiche in modo che si possa creare prioritariamente la quantità di energia necessaria (reazioni cataboliche) per poi far crescere le cellule (reazioni anaboliche).

Le cellule così ottenute possono essere utilizzate per il loro contenuto, ad esempio in proteine o in vitamine. Diventano quindi dei veri e propri integratori alimentari da utilizzare in contesti completamente diversi. Oppure si possono ottenere enzimi, lipidi, RNA, miscele molecolari varie.

Ma possono essere utilizzate anche per la loro attività.

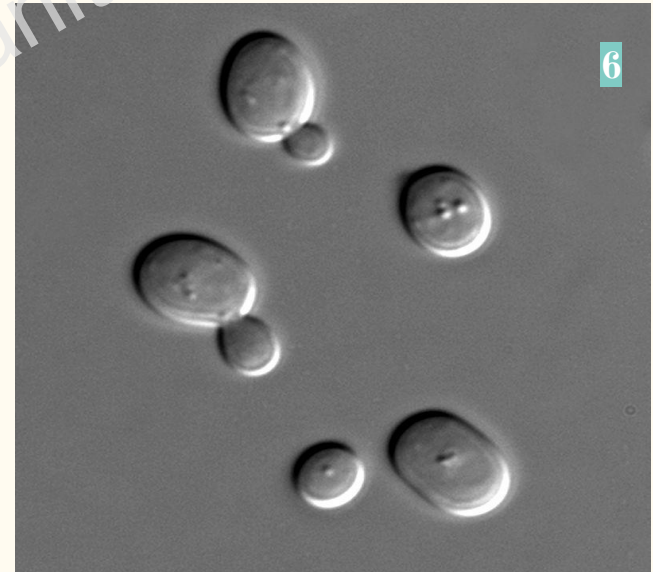
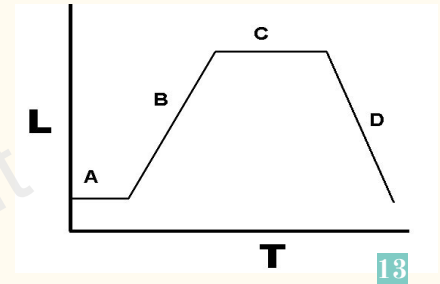
# I PRODOTTI: biomasse microbiche

## Biomasse microbiche.

L'esempio più eclatante è il Saccharomyces cerevisiae.

Può essere prodotto per la panificazione in forma ad esempio di lievito di birra.

Oppure essere prodotto per altri tipi di fermentazioni in campo enologico o nella produzione della birra (fermentazione alta).



# I PRODOTTI: biomasse microbiche

## Biomasse microbiche.

Anche quando vengono fatte proliferare specie di batteri o funghi che devono essere usati per problemi di biorisanamento del terreno o delle acque si può parlare di produzione di biomasse microbiche.

Oppure quando si deve far moltiplicare in maniera controllata il B. thuringiensis da utilizzare poi nella lotta biologica contro gli insetti.

Esaminando le varie produzioni biotecnologiche incontreremo diversi esempi in campi applicativi molto diversi.



# I PRODOTTI: enzimi

## Enzimi.

Abbiamo già citato il Bacillus subtilis come produttore di amilasi. Ma la produzione di enzimi non è sempre semplice. Richiede una conoscenza molto particolareggiata del microrganismo coinvolto e delle sue vie metaboliche perché non sempre tutti gli enzimi potenziali vengono espressi. Alcuni hanno bisogno della presenza dello specifico substrato, per esempio. In altri casi l'enzima di interesse non può essere ottenuto dal suo produttore naturale perché di difficile coltivazione. Oggi, però, la tecnologia del DNA ricombinante ha consentito di superare difficoltà come questa. Basta trasferire il gene che codifica la proteina in un batterio alto-produttore come Escherichia coli.

# I PRODOTTI: alimenti

## Alimenti.

Alimenti come il vino, la birra, l'aceto, il pane, lo yogurt e le verdure fermentate sono sempre stati prodotti dall'uomo da migliaia di anni. Le condizioni nell'epoca industriale però sono diverse.

Non si può fare affidamento sulla presenza naturale di batteri e lieviti fermentanti ed aspettare che la natura faccia il suo corso. Inoltre l'industria deve garantire al consumatore qualità organolettiche identiche tra le varie partite e soprattutto un prodotto che risponda a condizioni igienico-sanitarie declinate dalla legge,

Il che significa che bisogna ricorrere a procedure standard tra cui anche le miscele di starter di lieviti e batteri.

# I PRODOTTI: alimenti

## Alimenti.

Ciò significa che la produzione del vino, ad esempio, come di tanti altri alimenti è un procedimento complesso che richiede l'intervento di almeno due strutture biotecnologiche.

Chi produce lo starter di microrganismi fermentanti e chi, invece, si incarica di lavorare l'uva e ottenere il vino.

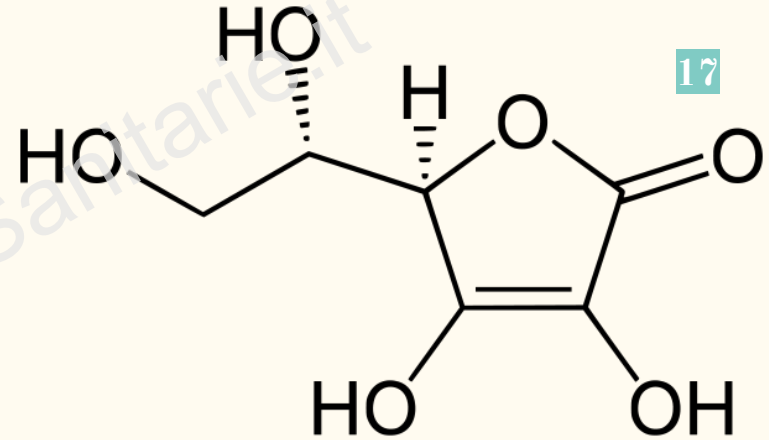


# I PRODOTTI: bioconversioni

## Bioconversioni.

Gli esempi più noti sono la bioconversione di vitamina C e di steroidi.

La sintesi della vitamina C prevede una serie complessa di passaggi chimici e un passaggio enzimatico che coinvolge la sorbitolo-deidrogenasi. Possono effettuare questo passaggio vari generi di batteri, da *Acetobacter* a *Gluconobacter* a *Erwinia*. Nelle industrie biotecnologiche si preferisce il *Gluconobacter oxydans*.



Acido L-ascorbico o vitamina C

# I BIOREATTORI



BioTecnologieSanitarie.it

# I BIOREATTORI

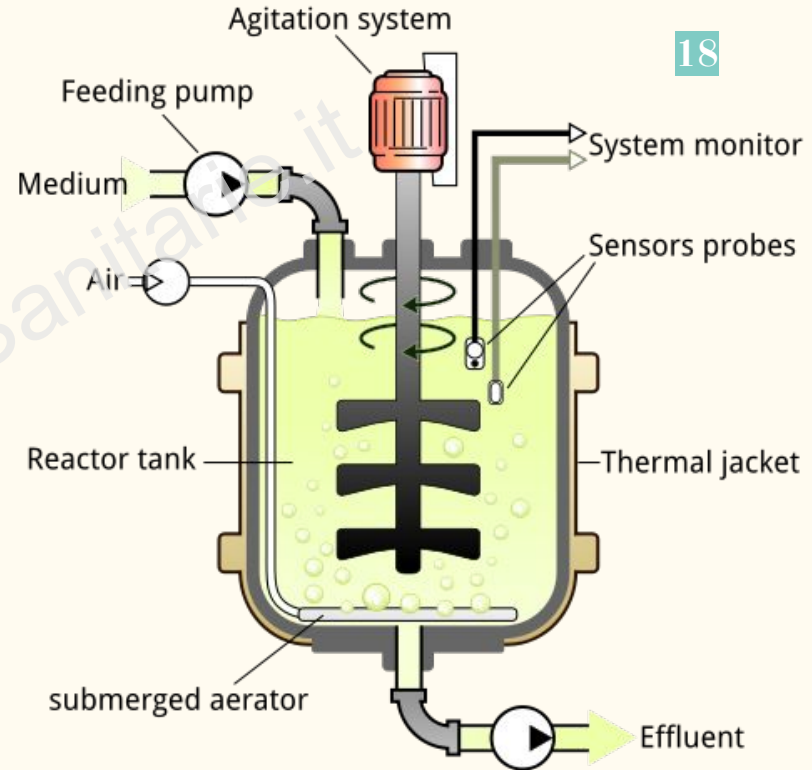
## Bioreattori o fermentatori.

I prodotti appena elencati si ottengono all'interno di bioreattori.

I bioreattori simulano un ambiente biochimico naturale per la crescita ottimale di microbi e di altri tipi di cellule.

Si tratta in genere di contenitori cilindrici che possono raggiungere anche i 300.000 litri di capacità.

In genere sono costruiti in acciaio inossidabile.

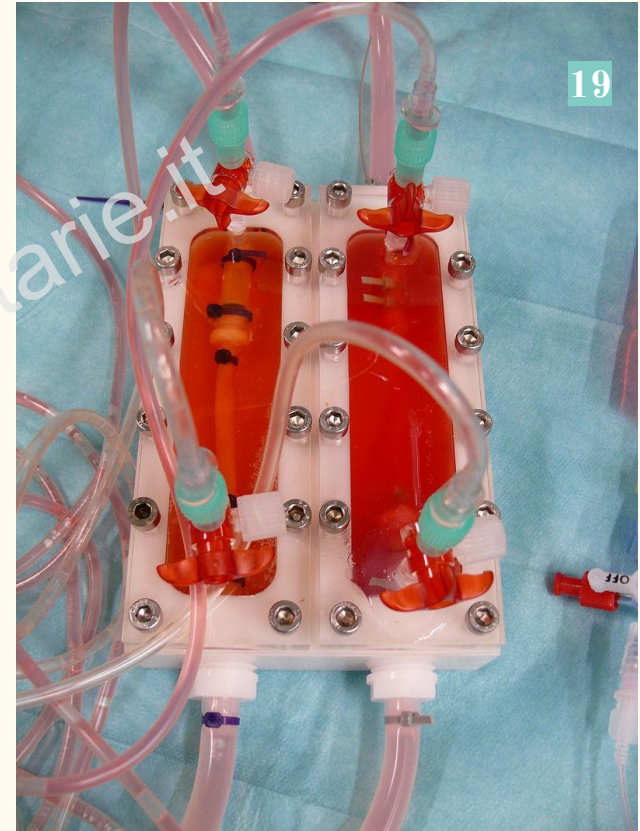


Fermentatore STR ad agitazione meccanica

# I BIOREATTORI

La definizione appena riportata include anche le strutture per la crescita di cellule umane e di tessuti (medicina rigenerativa e ingegneria tissutale).

Quindi non bisogna pensare ai bioreattori solo come a sistemi utilizzati nelle industrie biotecnologiche da adibire a grandi produzioni. Il concetto è ben visibile nella foto che mostra un bioreattore per la produzione di strutture vascolari da trapiantare.



# I BIOREATTORI

I bioreattori che ci interessano dal punto di vista della microbiologia industriale però sono dei fermentatori in cui i biocatalizzatori (termine che include sia gli enzimi che i microrganismi) sono in sospensione o in soluzione in un mezzo di coltura liquido. Vediamone allora le caratteristiche generali per poi riprenderle una ad una.

- Tutto il sistema deve essere facilmente sterilizzabile.
- Nel caso di fermentazioni aerobiche devono avere un sistema di aerazione.
- Devono essere dotati di un sistema di agitazione, di valvole nei punti di ingresso e uscita per consentire l'accesso in qualsiasi momento, di sensori per i controlli di parametri fisici e chimici.



# I BIOREATTORI: sterilizzazione

Tutto il sistema deve essere facilmente sterilizzabile. Da qui l'uso di acciaio inossidabile.

La temperatura, il tempo e le modalità devono essere scelte accuratamente. Bastano temperature decisamente inferiori a quella di ebollizione dell'acqua per eliminare qualsiasi tipo di cellula (50 - 60 °C per dieci minuti). Al contrario l'eliminazione delle spore richiede interventi più drastici (15 minuti a 121 °C). Nel caso di produzioni biotecnologiche non sempre si può avere la completa assenza di tutti i microrganismi contaminanti in quanto bisogna tenere conto di tutte le esigenze del processo. Si considera quindi accettabile se un lotto ogni 1000 o 10.000 risulta contaminato.

# I BIOREATTORI: sterilizzazione

Bisogna sottoporre a sterilizzazione sia il terreno di coltura che il fermentatore e questo può avvenire separatamente o meno. Inoltre deve essere anche filtrata l'aria da immettere nelle fermentazioni aerobiche.

L'**aria** viene fatta passare attraverso filtri di lana di vetro oppure a cartuccia (composti da materiale polimerico).

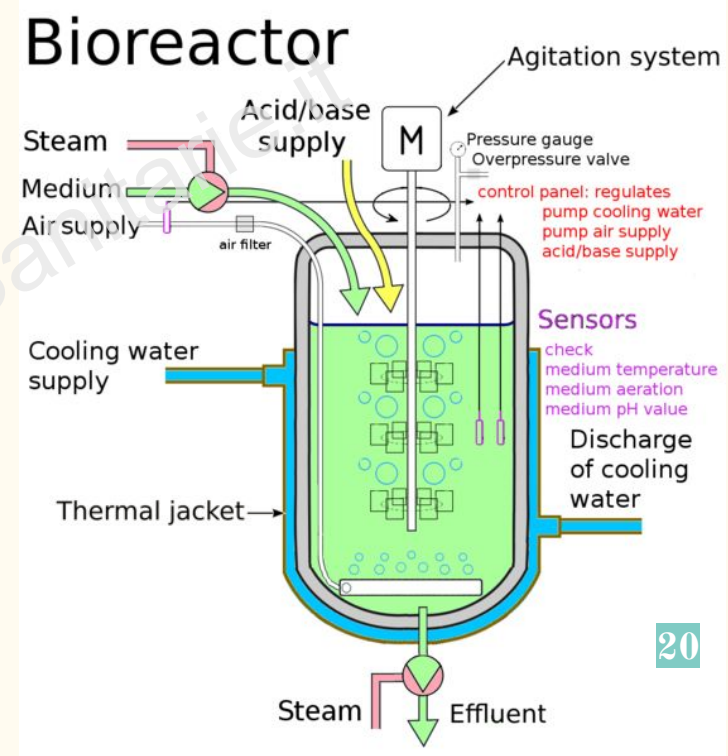
Il **terreno di coltura** può essere sterilizzato nel contenitore in cui viene preparato con il sistema HTST (High Temperature Short Time), cioè sottoposto a  $130^{\circ}$  -  $150^{\circ}$  C per qualche minuto. Una volta abbassata la temperatura a  $60^{\circ}$  C è inviato al bioreattore che nel frattempo è stato sterilizzato separatamente.

Oppure **terreno e bioreattore sono sterilizzati contemporaneamente** inviando vapore ad alta temperatura nelle intercapedini del reattore (se esistono) oppure direttamente nella brodocoltura. È importante tenere sotto agitazione il terreno in modo che la temperatura possa essere distribuita in modo uniforme.

# I BIOREATTORI: sistema di agitazione

I bioreattori devono essere dotati di un sistema di agitazione (meccanico o ad aria) per omogeneizzare meglio il contenuto e consentire una distribuzione uniforme della temperatura.

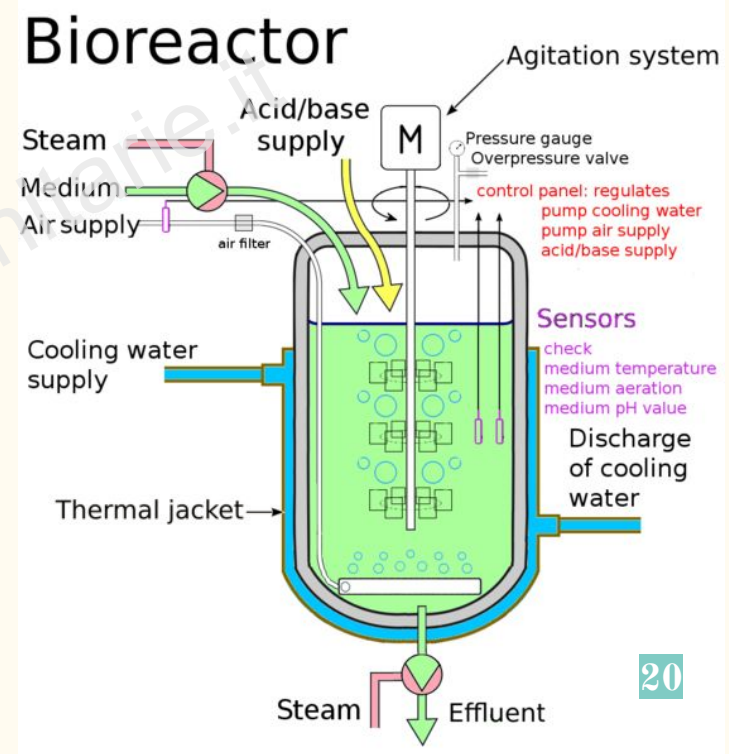
Il disegno rappresenta uno stirred tank reactor (**reattore STR**) con agitazione di tipo meccanico. Si possono notare le pale di agitazione e il sistema frangivento per rendere ottimale la miscelazione di tutta la brodocoltura.



# I BIOREATTORI: sistema di aerazione

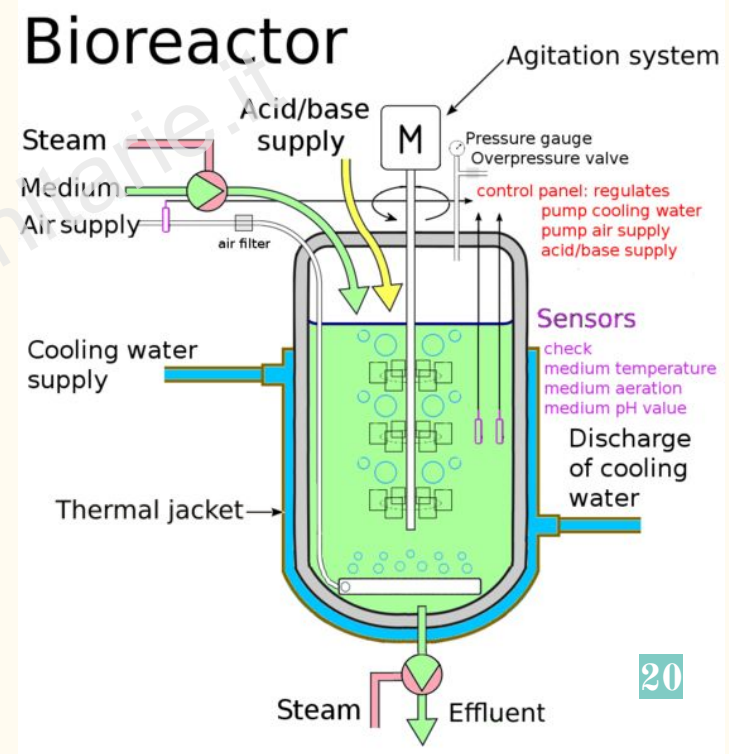
Inoltre deve essere previsto anche un sistema di aerazione per le fermentazioni aerobiche. Lo stesso disegno evidenzia il condotto di immissione dell'aria.

La sua pressione deve essere determinata a seconda dei casi e deve poter essere controllata attraverso manometri. In genere viene suddivisa in piccole bolle da uno spurger; le bolle si dirigono dal basso verso l'alto e pertanto sono coinvolte nel sistema di agitazione.



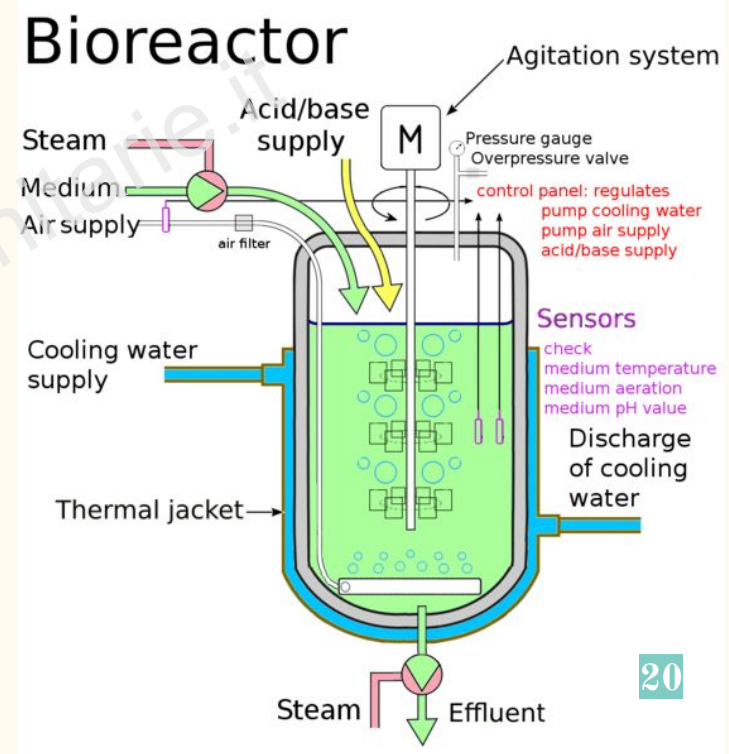
# I BIOREATTORI: sistema di aerazione

Il meccanismo in toto consente un miglior controllo della fermentazione perché la solubilità dell'ossigeno nell'acqua dipende dalla sua temperatura. Più si alza la temperatura più diminuisce la solubilità. Quindi i sistemi di aerazione e agitazione devono essere coordinati in modo da garantire un'alta resa del prodotto.



# I BIOREATTORI: sistema di controllo

Lo schema mostra anche i punti di ingresso del terreno di coltura e del vapore già illustrati nella sterilizzazione. Inoltre sono evidenziate le immissioni di acqua di raffreddamento e dei sistemi tampone. Tutti i parametri fisico-chimici (temperatura, pH, aerazione) sono controllati da sensori e possono essere seguiti sul pannello di controllo. Si può quindi intervenire in ogni momento quando si vede che i valori non sono ideali. L'effluente viene scaricato dal basso.

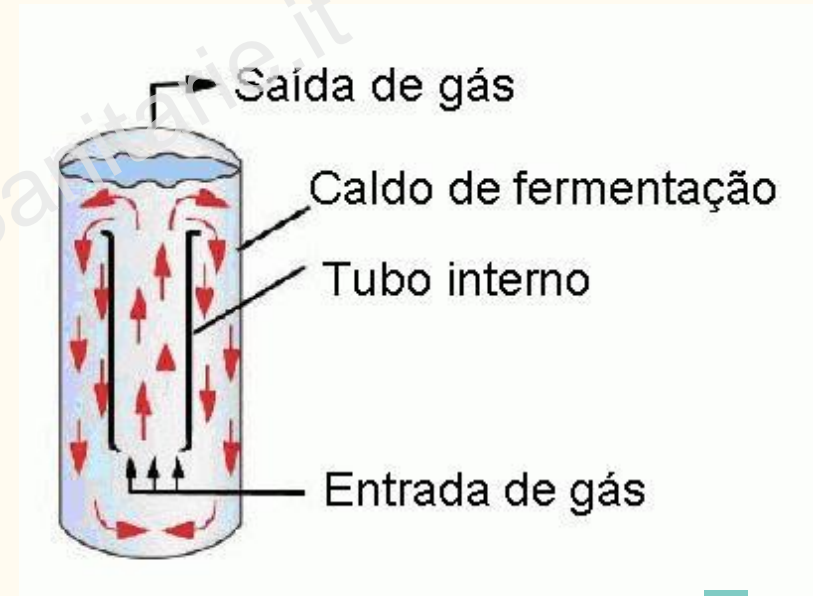


# I BIOREATTORI: reattori airlift

Il sistema di agitazione/aerazione può essere anche di tipo diverso, non meccanico come nel caso della figura.

In questo caso l'aria viene immessa alla base ad alta pressione e favorisce il ricircolo di tutto il mezzo di coltura compreso l'ossigeno. La brodocoltura si porta verso l'alto per la minore densità, si libera del gas e scende di nuovo verso il basso dove subirà una nuova immissione di aria.

Il bioreattore proposto nel disegno è a circolazione interna perché le parti ascendenti e discendenti sono separate.



# I PROCESSI





# I PROCESSI

I processi biotecnologici ovvero le procedure che si possono realizzare sono essenzialmente di tre tipi:

- ❑ fermentazione discontinua o a lotti (batch)
- ❑ fermentazione continua
- ❑ fermentazione semicontinua (fed-batch)

# I PROCESSI: batch

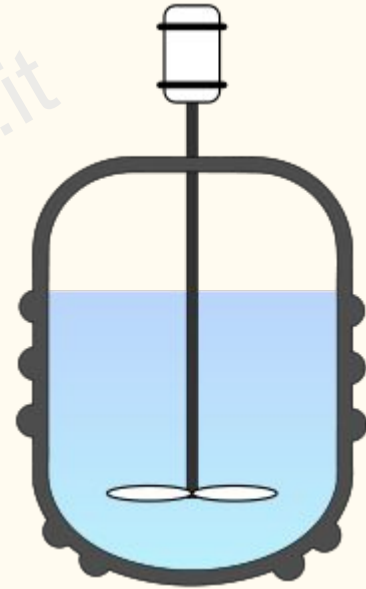
Il **reattore batch** è progettato per essere sterilizzato indipendentemente dal terreno di coltura e ricevere l'inoculo di microrganismi insieme al terreno.

Viene avviata la produzione (fermentazione discontinua o a lotti) mirando alla massima resa produttiva qualunque sia il prodotto cercato, compresa la massa microbica. A questo punto viene interrotto il processo e recuperato il prodotto.

Contemporaneamente viene allontanato dal reattore anche il terreno esaurito e il biocatalizzatore.

Tra gli svantaggi il dover ripartire da capo ogni volta ma è comunque il processo più diffuso. La resa viene calcolata con la percentuale di substrato trasformata in biomassa o prodotto.

Tra i principali prodotti quelli medicali e le bevande.



22

Simbolo del reattore batch

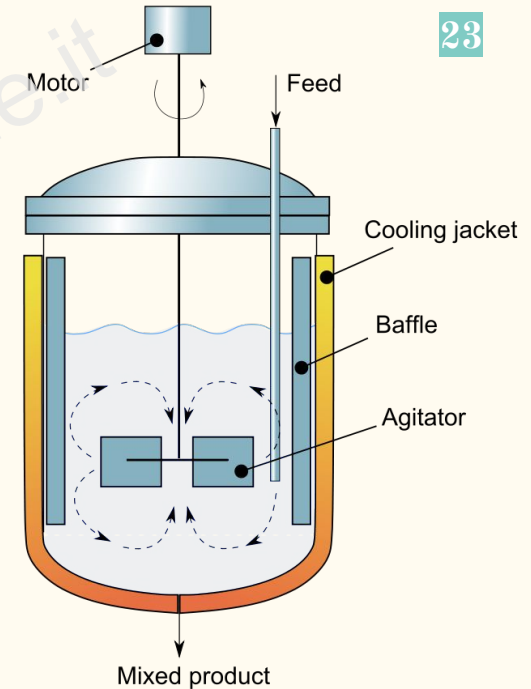
# I PROCESSI: fermentazione continua

## Fermentazione continua o processo in continuo.

Questo processo, usato per la prima volta nel XIX secolo per la conversione di birra e vino in aceto, è molto diverso dal precedente perché prevede che le sostanze nutritive vengano fornite in modo continuo e in modo altrettanto continuo venga recuperato l'effluente.

L'immagine mostra la sezione di un reattore STR a flusso continuo. Si nota l'ingresso delle sostanze nutritive e il recupero dell'effluente.

In questo caso una parte del biocatalizzatore rimane all'interno del reattore.



# I PROCESSI: fermentazione continua

Bisogna considerare la permanenza del biocatalizzatore da tutti i punti di vista. Sicuramente è vantaggiosa ma l'aspetto negativo è legato alla difficoltà di mantenere il biocatalizzatore sempre efficiente.

Nella pratica si agisce in questo modo.

Si parte con un processo batch (chiuso) per far aumentare la massa microbica.

Nel punto voluto della curva di crescita (fase B) si può intervenire mantenendo la crescita costante per un tempo indefinito. Basta passare dal sistema chiuso batch al sistema aperto in continuo. In altre parole si interviene introducendo nel reattore terreno di coltura sterile, alla giusta concentrazione e a portata costante. A questa immissione corrisponde il recupero dell'effluente che è costituito da: terreno di coltura a minore concentrazione, cellule microbiche e prodotto.

# I PROCESSI: fermentazione continua

L'importante è calcolare bene tutti i parametri in maniera che si possa raggiungere un equilibrio tra la biomassa in crescita nel reattore e la biomassa che esce nell'effluente. Il che non è semplice.

Per esempio, se la velocità di rimozione dell'effluente supera quella di moltiplicazione cellulare è chiaro che si verificherà una diminuzione della biomassa all'interno del reattore con le ovvie conseguenze sulla resa. A questo punto si dovrà intervenire aumentando la concentrazione di terreno di coltura immesso. Questo porterà ad un aumento della velocità di crescita della biomassa interna e alla formazione di un nuovo equilibrio. La situazione è molto più articolata e complessa di come appare da questo esempio ed è legata a competenze molto specifiche e a strumentazioni spesso sofisticate.

# I PROCESSI: parametri da controllare

Infatti nei bioreattori vengono immessi microrganismi il cui comportamento spesso non segue rigidamente standard di processo controllati dalla matematica.

Al contrario l'industria richiede procedimenti standard. Come è possibile superare questi ostacoli? solo con un controllo dei vari parametri chimico-fisici, costante e molto attento. Abbiamo già avuto occasione di vedere quali sono i parametri fondamentali sotto osservazione nello schema di un reattore STR ed in quella occasione si è parlato in modo generico di sensori.

Alla registrazione di temperatura, pH, concentrazione di  $O_2$  immesso e poi nel terreno di coltura, della sua pressione e di  $CO_2$ , bisogna aggiungere altri dati che potrebbero compromettere la resa e che in parte abbiamo già visto. Per esempio la formazione di schiuma, l'eventuale viscosità del mezzo colturale, la concentrazione dei nutrienti, della biomassa e dei prodotti del metabolismo microbico.

# I PROCESSI: controllo off-line

La concentrazione della biomassa può essere controllata all'esterno del bioreattore (controllo off-line) e quindi in ambiente non sterile.

I metodi sono tanti e come al solito hanno aspetti positivi e negativi. Per citare qualche fattore negativo:

- possono impegnare molto gli addetti (conta cellulare sulle camere apposite al microscopio)
- presentare tempi lunghi (semina in piastra)
- non essere utilizzabili se ci sono particelle solide nel terreno (determinazione del peso secco e misura della torbidità tramite densità ottica)

Si possono anche utilizzare metodi chimici e fluorescenti per misurare la quantità di RNA, DNA, proteine, ATP nei microrganismi

# I PROCESSI: controllo on-line

La maggior parte degli altri parametri viene controllata direttamente all'interno del reattore (**controllo on-line**) perché molto spesso bisogna effettuare il controllo in tempo reale.

In questo caso c'è la necessità di rispettare la sterilità e ci si affida così a sensori che sono a contatto direttamente con la biomassa. La situazione viene visionata attraverso un pannello di controllo.

La tecnologia moderna ha messo a punto dei sensori particolari chiamati **biosensori**



Fermentatore da banco



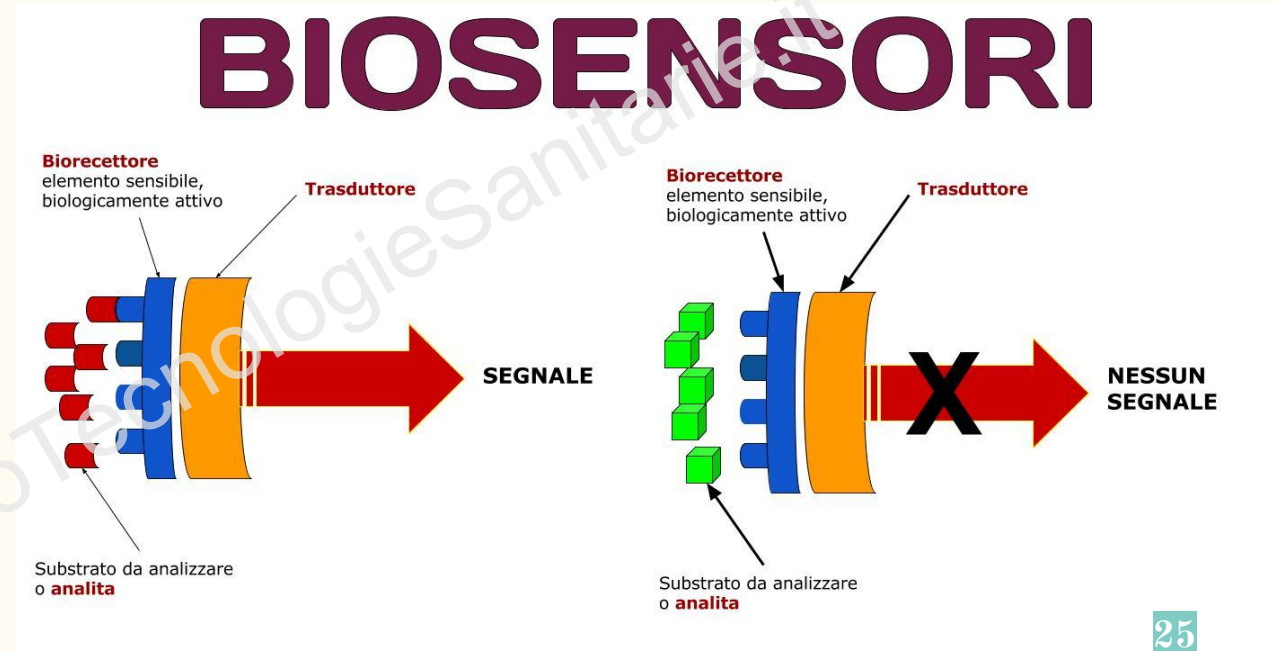
# I PROCESSI: biosensori

I biosensori devono analizzare un substrato (**analita**) e lo fanno attraverso una componente biologica.

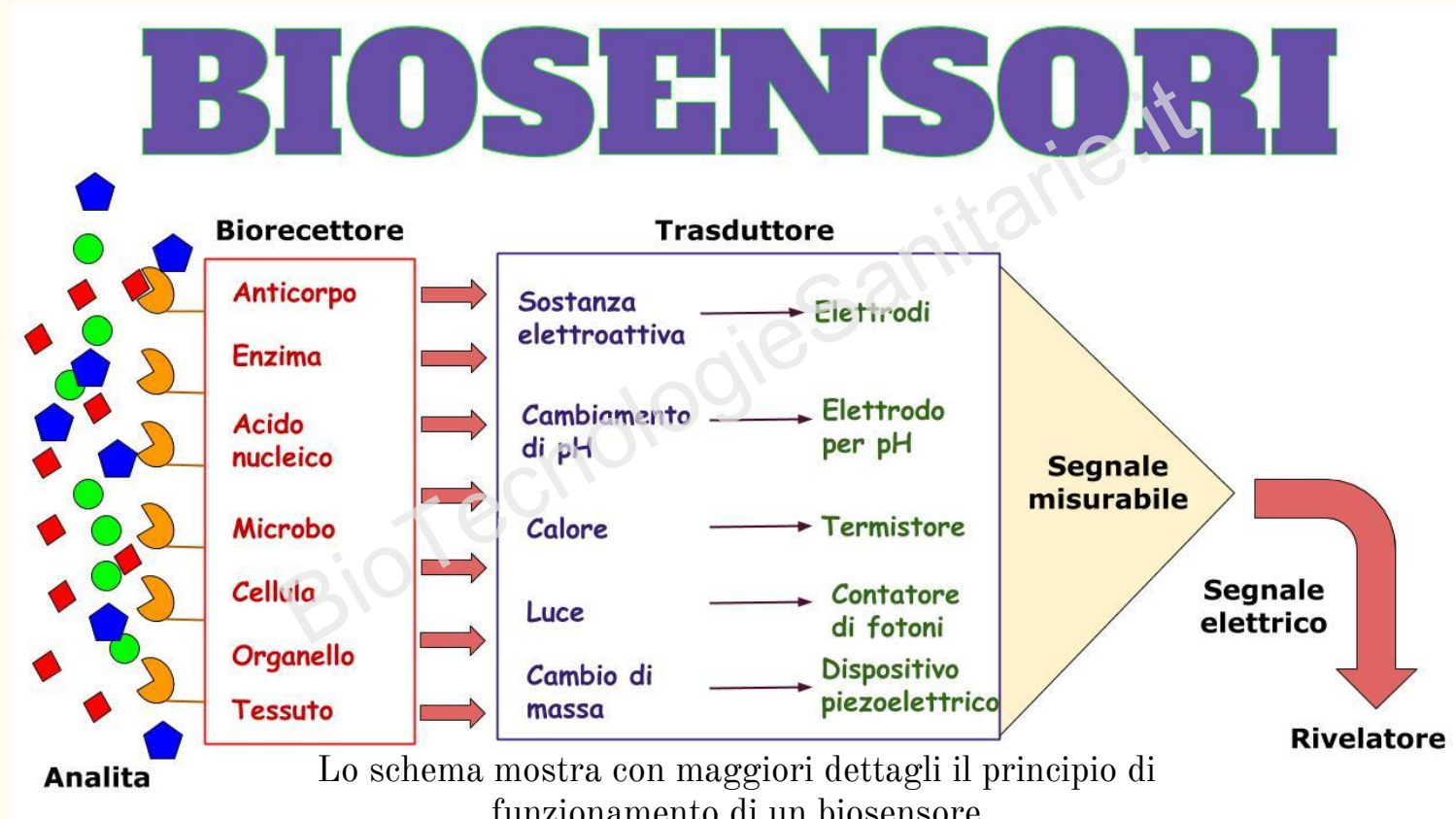
La componente biologica si integra con una componente elettronica che serve da trasduttore di segnale.

La componente biologica può essere rappresentata da enzimi, antigeni, anticorpi, cellule ...

La componente elettronica da transistor, fibre ottiche, elettrodi, cristalli piezoelettrici,

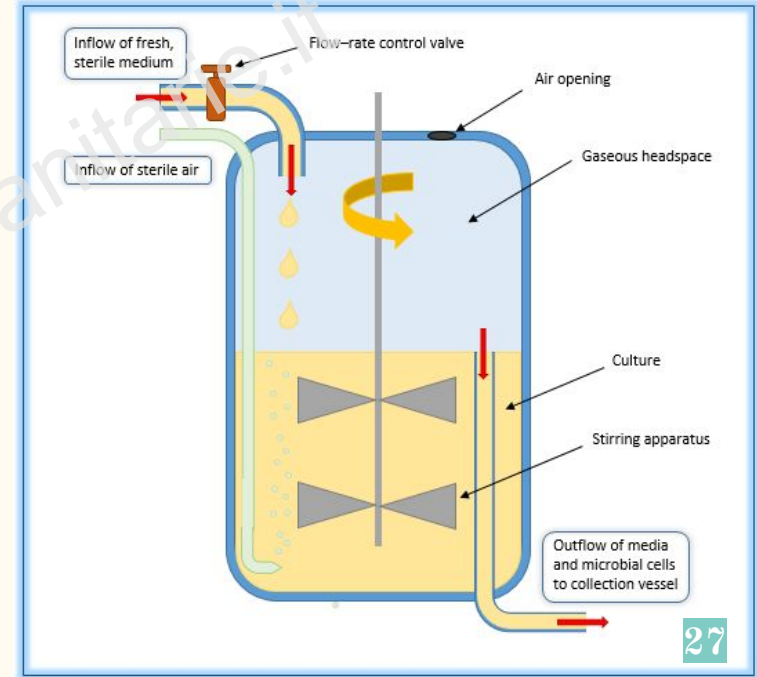


# I PROCESSI: biosensori



# I PROCESSI: chemostato

I bioreattori utilizzati in continuo possono essere di due tipi diversi a seconda della tipologia di controllo che viene eseguita. Per esempio nel **chemostato** la velocità di crescita del biocatalizzatore è controllata attraverso la velocità di immissione del terreno di coltura. Mentre la densità della popolazione cellulare viene regolata dalla concentrazione di un nutriente che agisce come fattore limitante. Un esempio di fattore limitante può essere la fonte di carbonio che viene monitorata attraverso la misura della densità ottica. Il sistema mantiene costante il volume e l'aerazione (quando necessaria).



Chemostato

# I PROCESSI: turbidostato

Il secondo tipo di bioreattore usato in continuo è il turbidostato.

In questo caso tutti i nutrienti vengono forniti in eccesso e il controllo viene esercitato sull'effluente. Infatti viene misurata la sua torbidità che è indice della massa microbica, attraverso una fotocellula.

# I PROCESSI: svantaggi

Diversi sono gli svantaggi della fermentazione in continuo anche se continua ad essere molto sfruttata in campo industriale.

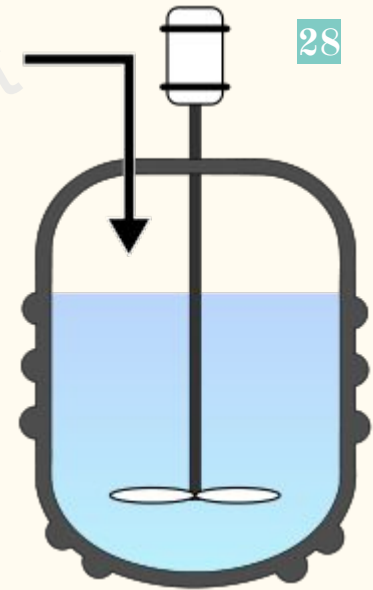
- È limitata a prodotti associati alla crescita
- Può essere utilizzata solo su microrganismi che hanno caratteristiche specifiche (non hanno un alto tasso di mutazioni e sono in grado di sintetizzare il prodotto rapidamente)
- Il metodo ha maggiori possibilità di contaminazione

# I PROCESSI: fed-batch

Il **reattore fed-batch** è progettato per un funzionamento semicontinuo, in modo che all'inizio riceve solo 1/10 del volume massimo prestabilito di terreno di coltura. Quando viene raggiunta la fase logaritmica della curva di crescita viene immesso un flusso costante di terreno fresco e sterile senza però scaricare contemporaneamente l'effluente.

Lo svuotamento viene effettuato quando si raggiunge un volume di riempimento del bioreattore prestabilito.

Lo svuotamento può essere totale o parziale. In questo ultimo caso si lascia all'interno un volume da cui si può iniziare un nuovo ciclo produttivo.



Simbolo del reattore  
fed-batch

# PREPARAZIONE DELL'INOCULO



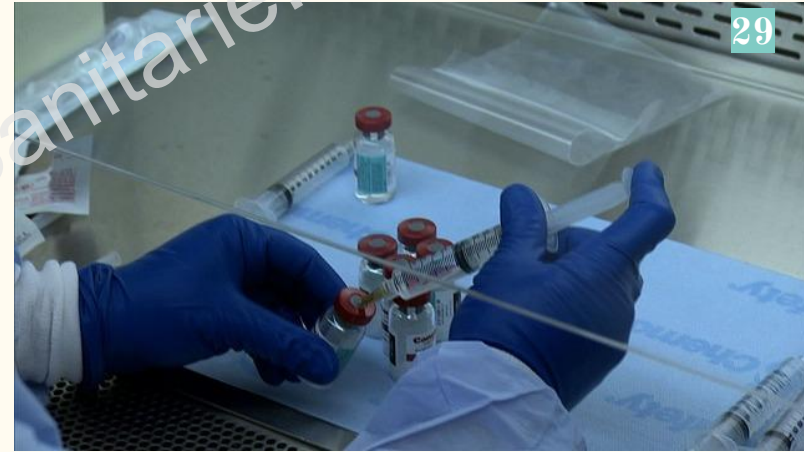
# PREPARAZIONE INOCULO

Un'altra fase molto importante in una produzione industriale biotecnologica è la preparazione dell'inoculo.

Ci si basa in genere su **starter selezionati** e ampiamente usati da tempo o su nuovi ceppi ottenuti da screening che possono richiedere anni di lavoro.

La stessa industria biotecnologica può avere degli starter conservati in azoto liquido ( $-178^{\circ}\text{C}$ ) o liofilizzati da riattivare quando necessario. Oppure li acquista da ditte specializzate.

Se i tempi di conservazione sono limitati si può ricorrere anche alla refrigerazione in brodocoltura coperta da olio di paraffina.



Ogni fase di lavoro deve seguire le più strette indicazioni di sterilità come è stato già ampiamente ricordato.



# PREPARAZIONE INOCULO

Particolare attenzione deve essere posta a non far subire stress biochimici e fisiologici ai microrganismi.

Un conto è coltivarli nei pochi millilitri su piastra o in provetta come succede nel laboratorio e un conto è farli moltiplicare in ettolitri di brodocoltura.

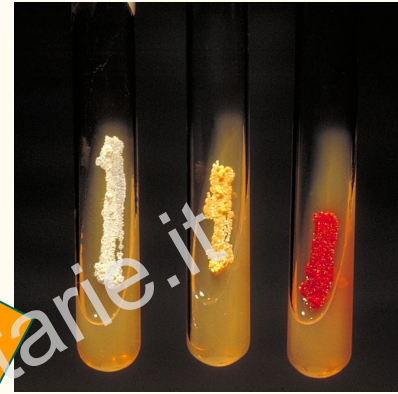
Il passaggio deve essere graduale.



# PREPARAZIONE INOCULO

Quindi spesso si passa da uno slant (coltura in provetta su terreno solido a becco di clarino) ad una beuta di piccola capacità con terreno liquido per aumentare poi gradualmente la quantità della brodocoltura e passare così ad un minifermentatore.

A questo punto l'inoculo è pronto. Il procedimento si chiama **scale-up**.



# DOWNSTREAM



# DOWNSTREAM

Una volta completato il processo produttivo si deve recuperare il prodotto che spesso è composto da:

- ★ la biomassa microbica
- ★ il terreno di coltura esaurito
- ★ il prodotto se si tratta di metaboliti extracellulari (molti antibiotici, alcuni enzimi, acidi organici, etanolo, polisaccaridi, acido citrico ...)

Ovviamente il prodotto può anche essere la massa microbica oppure delle molecole ancora all'interno delle cellule (alcuni antibiotici, alcuni enzimi, vitamine, acidi nucleici ... ).

Il processo di recupero si chiama **downstream** per contrapporlo ad **upstream** che è il processo produttivo all'interno del bioreattore.

# DOWNSTREAM

È veramente difficile schematizzare dei procedimenti generali perché ogni prodotto ha le sue caratteristiche e bisogna conservare il più possibile la sua funzionalità. Quindi il downstream deve essere attentamente valutato ed è anch'esso oggetto di studi analitici prima di avviare la produzione biotecnologica vera e propria.

Sicuramente è più semplice **isolare la biomassa microbica dal terreno di coltura esaurito**. Basta agire per:

- ★ centrifugazione, nel caso di microrganismi unicellulari
- ★ filtrazione, per i microrganismi filamentosi

Possono rimanere poi da effettuare lavaggi e separazione tra cellule.

# DOWNSTREAM

Quando invece si tratta di **recuperare metaboliti extracellulari**, si isola la biomassa microbica, che può essere anche riutilizzata, come appena detto e poi si procede all'estrazione, concentrazione e purificazione del prodotto.

Se il recupero riguarda **metaboliti endocellulari** è ovvio che prima bisogna rompere gli involucri cellulari. Non è però sempre detto perché tutto dipende dal peso molecolare. Se sono piccole molecole le si può far fuoriuscire con trattamenti acidi o basici o solventi idrosolubili.

Tornando alle macromolecole endocellulari sono diversi i metodi che si possono applicare.

# DOWNSTREAM

Metodi usati per la rottura delle cellule:

- ★ meccanici (ultrasuoni, omogeneizzatori, presse ...)
- ★ fisici (cicli di congelamento e scongelamento, disidratazione ...)
- ★ chimici (shock osmotico, uso di solventi, detergenti ...)
- ★ biologici (enzimi diversi tra cellule batteriche e lieviti, antibiotici che inibiscono la sintesi della parete cellulare)

# Photo credits

## Immagine nell'intestazione di sezione

**Bioreattore industriale completo di tutta l'attrezzatura per la sterilizzazione e la filtrazione, usato per le colture di cellule vegetali in sospensione per ottenere metaboliti secondari**

By Titovamv (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], via Wikimedia Commons - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AIPPRAS1.jpg>

**In1** Di sconosciuto - Illustreret Tidende, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10111474>

**In2** Di Nadar - File:Louis Pasteur, foto av Félix Nadar.jpg, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=28039885>

**In3** By Official photographer - <http://media.iwm.org.uk/iwm/mediaLib//32/media-32192/large.jpg> This is photograph TR 1468 from the collections of the Imperial War Museums., Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24436974>



# Photo credits

- 1** By Peter Highton - Estate of Peter Highton a molecular biologist working at University of Edinburgh 1968-1990, CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50418353>
- 2** By Dr. Sahay - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29339272>
- 3** Di Kookaburra di Wikipedia in tedesco - Trasferito da de.wikipedia su Commons., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7022865>
- 4** By A doubt - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29635523>
- 5** Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=716469>
- 6** Di Masur - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1069017>
- 7** By Eva Decker (University Freiburg, AG Reski Ralf Reski) [CC BY-SA 1.0 (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/1.0)], via Wikimedia Commons - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ABioreaktor\\_quer2.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ABioreaktor_quer2.jpg)
- 8** Di Nessun autore leggibile automaticamente. Biopolako presunto (secondo quanto affermano i diritti d'autore). - Nessuna fonte leggibile automaticamente. Presunta opera propria (secondo quanto affermano i diritti d'autore)., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1071164>

# Photo credits

- 9** Di Genome Management Information System, Oak Ridge National Laboratory - [1] U.S. DOE. 2006. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, DOE/SC/EE-0095, U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, [http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/.](http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/), Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3882727>
- 10** Di Badagnani - Opera propria, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4129522>
- 11** By Jason Riedy [CC BY 2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)], via Wikimedia Commons - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AWhey.jpg>
- 12** Di Edgar181 - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6493956>
- 13** Di L'utente che ha caricato in origine il file è stato MyRedDice di Wikipedia in inglese - Trasferito da en.wikipedia su Commons., GPL, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2047401>
- 14** Di Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48206104>
- 15** Di Cacycle - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=101628>

# Photo credits

16 CCO Public Domain - via pixabay.com

17 Di Yikrazuul - Opera propria, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5886009>

18 By GYassineMrabetTalk ✉ - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8301774>

19 By HIA - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12201181>

20 By KVDP (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Commons -

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AReal life bioreactor.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AReal_life_bioreactor.png)

21 By Marcelcerri (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAirlift bioreactor.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAirlift_bioreactor.jpg)

22 By GYassineMrabetTalk ✉ - Own work, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8278840>

23 By Daniele Pugliesi - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6915706>

24 By El Carlos (Own work) [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) or CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons -

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ALabfors 4 with touchscreen.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ALabfors_4_with_touchscreen.jpg)

# Photo credits

**25** - **26** Immagine di proprietà dello studio associato R&D

**27** By CGraham2332 - Own work, CC BY-SA 4.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=53801095>

**28** By GYassineMrabetTalk ✉ - Own work, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8278897>

**29** CCO Public Domain via Pixabay.com

**30** By Retama - Own work, GFDL, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5722489>

**31** By CDC/Dr. David Berd (PHIL #3078), 1972 (CDC) [Public domain], via Wikimedia Commons -

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AActinomyces\\_sp\\_01.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AActinomyces_sp_01.png)

**32** Di Miropiro, www.bioreactors.eu, www.bioreactor.ch - Opera propria, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29055211>

**33** By RickLawless (talk) (Uploads) - Own work, CC BY 3.0,

<https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=33113735>

**34**