

Industrializzazione e regolamentazione



di prodotti biotecnologici

❖ **Obiettivi formativi**

Prospettiva industriale relativa ai requisiti di sviluppo e produzione di prodotti biotecnologici per la cura e la prevenzione di malattie, sia dal punto di vista tecnico che normativo.

❖ **Docente**

PhD Gabriele Meli

❖ **FOCUS**

Industrializzazione di processo

❖ **Orario lezioni**

Martedì e Mercoledì 17-19

❖ **Modalità di esame**

Scritto

❖ **Contatto preferenziale**

gabriele.meli78@gmail.com

Questo corso contiene informazioni a scopo didattico, non correlate in alcun modo a dati rilevanti per Bracco Imaging S.p.A. e fa riferimento alla formazione personale ed all'esperienza professionale secondo il mio punto di vista.

GABRIELE MELI

Coltivazione di cellule



La **coltivazione di cellule** procariotiche ed eucariotiche su scala laboratorio può avvenire in sistemi semplici rappresentati dalle **beute** o in sistemi più complessi ed accurati rappresentati dai **fermentatori** o **bioreattori**.

Le **condizioni chimico-fisiche** per la crescita delle cellule sono molto variabili e dipendono essenzialmente dal tipo di microrganismo. I **parametri di fermentazione** da scegliere accuratamente ed eventualmente monitorare lungo l'arco del processo fermentativo sono l'**agitazione** del brodo di coltura, l'**ossigenazione** dello stesso (o l'assenza di O₂ in caso di processi anaerobici), il **pH**, la **temperatura**, e l'eventuale formazione di **schiuma**.

Coltivazione di cellule



La beuta (Fig. 1), solitamente posizionata su una pedana rotante all'interno di un incubatore, presenta tutta una serie di limitazioni al monitoraggio e al controllo di alcune di queste variabili come ad esempio il pH, l'ossigenazione o l'anaerobiosi e soprattutto la sterilità poiché si tratta di un sistema aperto e non chiuso ermeticamente.

Coltivazione di cellule



Figura 2 - Modello generico di bioreattore su scala laboratorio costituito da una unità di comando per il monitoraggio ed il controllo dei principali parametri di processo, un vessel di vetro in cui avviene la crescita cellulare, una serie di sensori per la misurazione dei parametri chimico-fisici (es. temperatura, pH, ossigenazione, schiuma), pompe peristaltiche per l'iniezione automatica di apposite soluzioni (acide, basiche o nutritive) e bottiglie come riserva delle soluzioni da introdurre nel brodo di coltura.

Per superare queste problematiche è stato messo a punto il **bioreattore** (Fig. 2), la cui tecnologia è ad oggi in grado di superare la semplice scala di laboratorio ed estendersi anche alla **scala industriale** (Fig. 3).

Coltivazione di cellule



Figura 3 - Fotografia di un impianto di fermentazione su scala industriale costituito da un numero variabile di bioreattori in acciaio collegati da tubazioni per il trasferimento di acqua e gas in uscita ed in entrata.

Coltivazione di cellule

Si definisce bioreattore un dispositivo in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita di microrganismi. Esso è in grado di assicurare una condizione di **sterilità** e fornire alle cellule tutto ciò di cui necessitano, permettendo allo stesso tempo di **monitorare** in maniera semplice e veloce tutti i **parametri di crescita**.

Uno dei parametri più importanti è la **temperatura**, la quale durante la crescita cellulare tende ad aumentare a causa delle reazioni esotermiche collegate al metabolismo microbico. Un suo incremento eccessivo causerebbe un rallentamento della crescita cellulare o in casi estremi la morte della coltura. Per questo motivo un **termometro** collegato all'unità di comando è immerso nel brodo di coltura per monitorare costantemente il suo valore. L'**isotermia** è garantita da una **camicia** posta a rivestimento del vessel di vetro in cui scorre dell'**acqua a temperatura controllata**.

Coltivazione di cellule



L'**agitazione** è garantita da una serie di **pale rotanti collegate ad un motore** (solitamente posto in testa al bioreattore). La forma, la dimensione, la distanza e la velocità di rotazione delle pale può essere modificata a seconda delle esigenze. Le pale sono fondamentali non solo per miscelare le cellule e i nutrienti (che vengono forniti sterilizzati e filtrati mediante una pompa in entrata) ma anche per disciogliere al meglio l'ossigeno che viene fornito dal basso sotto forma di bolle. Inoltre, un elemento fondamentale all'interno del vessel di vetro è rappresentato dai **frangi-flussi**, la cui funzione è appunto quella di rompere flussi rotativi fissi che creerebbero delle **zone non omogenee** all'interno del mezzo di coltura. Nel caso in cui l'organismo coltivato sia un **anaerobio stretto**, ovvero non sopravviva in presenza di ossigeno, viene semplicemente insufflato **azoto nel mezzo di coltura** piuttosto che aria.

In caso di coltura di cellule molto sensibili agli stress meccanici dovuti alle pale, come ad esempio i funghi filamentosi, l'agitazione è garantita mediante l'insufflazione di un **potente getto d'aria compressa sterile**. Bioreattori dotati di questa tipologia di agitazione prendono il nome di *air-lift*.

Coltivazione di cellule

I principali parametri sono monitorati mediante **sensori** di pH, temperatura, ossigeno e schiuma collegati all'unità di comando che, qualora il valore registrato si discosta dal valore di **set-point** impostato dall'operatore, innesca una risposta appropriata per riportare le condizioni alterate a quelle desiderate ed ottimali per la crescita cellulare. Ad esempio, se con l'aumento della biomassa cellulare dovesse verificarsi un aumento della CO₂ prodotta e quindi una diminuzione del pH, a causa della sua solubilizzazione nel mezzo di coltura con formazione di acido carbonico, l'unità di comando attiverebbe la pompa collegata alla **riserva di soluzione basica concentrata** per introdurre nel sistema un piccolo volume di soluzione tale da riportare il pH al valore ottimale impostato. Un meccanismo analogo si attiva in caso di aumento del pH con l'introduzione di una **soluzione acida**.

Analogamente, in caso di formazione di **schiuma**, dovuta all'agitazione, una apposita **sonda**, posta ad una altezza desiderata, ne rileva la presenza ed attiva la pompa collegata alla **riserva di anti-schiuma**.

Coltivazione di cellule



Analogamente, in caso di formazione di **schiuma**, dovuta all'agitazione, una apposita **sonda**, posta ad una altezza desiderata, ne rileva la presenza ed attiva la pompa collegata alla **riserva di anti-schiuma**.

Infine, tramite una **valvola in uscita** è possibile raccogliere in modo sterile un **campione** del mezzo di coltura su cui effettuare separatamente una serie di analisi per misurare la concentrazione cellulare, i nutrienti ancora presenti nel mezzo di coltura ed i prodotti di fermentazione.

Infine, alcuni bioreattori sono dotati di **sensori di gas** per la quantificazione della CO₂ o dell'H₂ (nel caso di microrganismi metanogeni).

Coltivazione di cellule

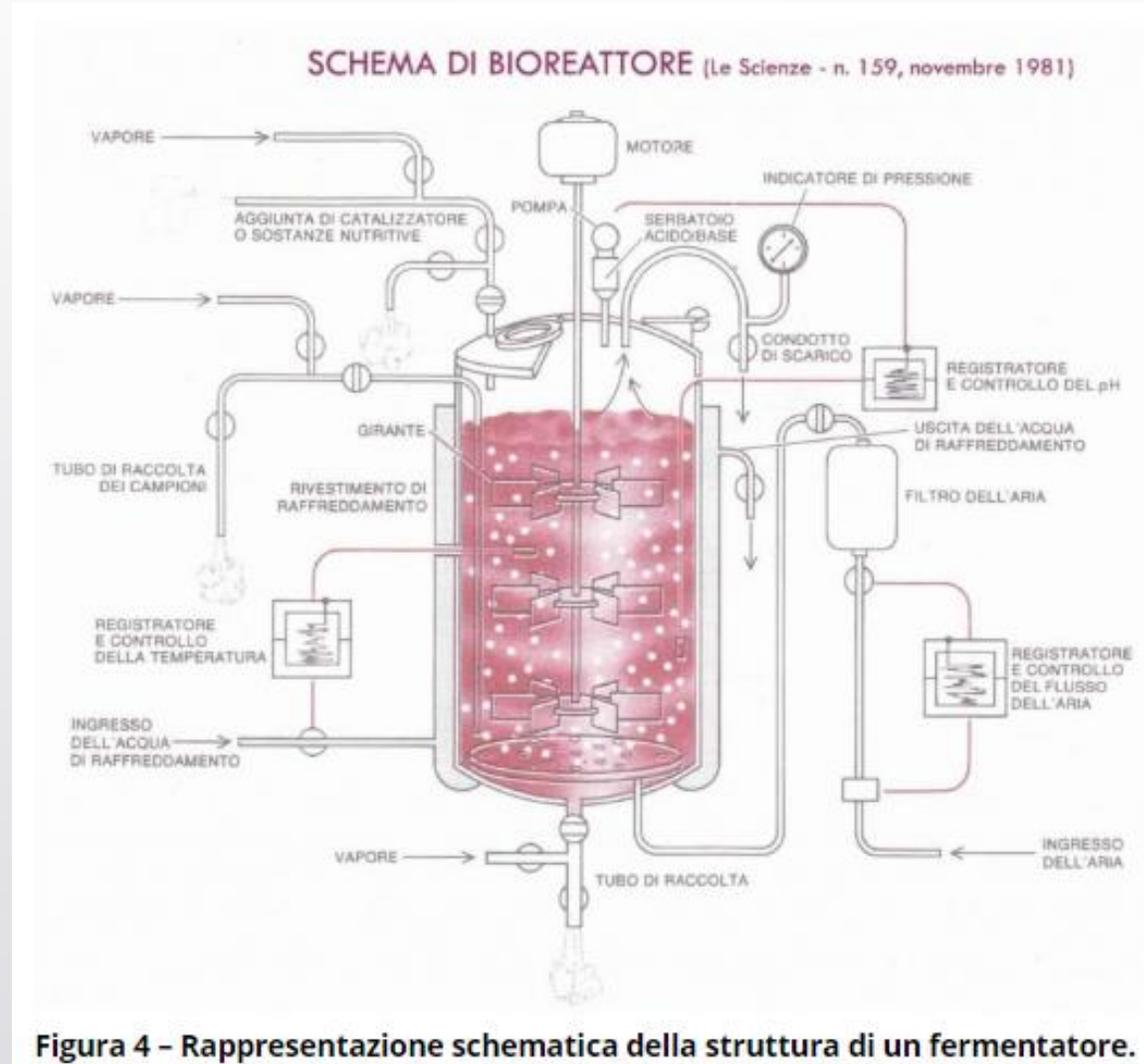


Figura 4 - Rappresentazione schematica della struttura di un fermentatore.

Coltivazione di cellule

In generale, esistono bioreattori di diverse dimensioni, da quelli di 1L di volume, utilizzati sui banconi dei laboratori di ricerca, fino a quelli da 1 milione di litri, usati per le grandi produzioni industriali. Il passaggio della produzione da un bioreattore più piccolo a uno più grande viene chiamato *scale-up*.

I metodi di coltura delle cellule in un bioreattore sono essenzialmente cinque, classificabili sulla base del metodo di somministrazione del terreno di coltura.

1) Colture in *batch* (a sistema chiuso), in cui il volume di terreno liquido nel quale le cellule crescono è essenzialmente costante. Le cellule, crescendo, aumentano la loro biomassa, riducono la quantità di nutrienti disponibile, producono metaboliti da eliminare. Le cellule raggiungono così un livello (detto stato stazionario) tale da impedire di aumentare ulteriormente il loro numero.

2) Colture in *fed-batch* (sistema chiuso alimentato), in cui è possibile prolungare il tempo di crescita delle cellule prima di raggiungere lo stato stazionario. Il terreno viene infatti continuamente addizionato alla coltura.

Coltivazione di cellule

3) Colture in **perfusione** in cui oltre all'aggiunta di terreno fresco, viene anche prelevato il terreno usato (privo di cellule) ed i metaboliti escreti. È un metodo ampiamente usato nelle colture di cellule animali.

4) Colture **continue** in cui ad una coltura in batch in fase di crescita esponenziale si aggiunge una certa quantità di terreno fresco e se ne sottrae una equivalente di terreno usato con cellule. In questo modo, restando costante la biomassa, si ottiene una crescita pressoché bilanciata: anche le concentrazioni di sostanze nutrienti e di metaboliti, infatti, restano essenzialmente costanti.

5) Colture **su strato solido** che si svolgono in assenza di acqua allo stato libero (in alcuni casi l'acqua è presente in quantità ridotte). Tra i substrati solidi più utilizzati figurano legumi, cereali, ed altri materiali di origine vegetale come paglia o segatura.

In conclusione, la gestione dei processi di **biotrasformazione microbiologica** non risulta troppo dissimile dalla gestione di un processo di sintesi o comunque di trasformazione chimica. La conduzione di un fermentatore, sia esso in scala pilota oppure di grandi dimensioni utilizzato per finalità produttive, presenta diverse analogie con la conduzione di un reattore dove uno o più reagenti, in determinate condizioni ambientali (es. temperatura, pressione, pH) ed eventualmente in presenza di catalizzatori sono trasformati in uno o più prodotti, magari con la co-generazione più o meno controllabile di sottoprodotti indesiderati.

Coltivazione di cellule

Le reazioni biologiche, come tutte le reazioni chimiche, necessitano un ambiente dedicato, che permetta di separarle dall'esterno, controllandone l'andamento.

In particolare, l'utilizzo delle cellule necessita particolari accorgimenti, funzionali alla sopravvivenza e alla crescita delle cellule stesse, come per esempio la sterilità, che permette di escludere organismi indesiderati.

Talvolta invece è possibile modificare le condizioni di crescita per spingere le cellule a fare ciò che ci interessa, come produrre un farmaco o un enzima.

Lo strumento più semplice per coltivare un discreto numero di cellule (principalmente lieviti o batteri) fa parte della vetreria di laboratorio: si tratta della beuta. Poiché la miscela di cellule e nutrienti (come il glucosio), chiamata brodocoltura, deve essere costantemente mescolata e mantenuta omogenea per evitare il deposito sul fondo, la beuta viene posta su una particolare pedana agitante.

Coltivazione di cellule

////////////////////////////////////

L'agitazione è importante anche per l'ossigenazione della miscela, in quanto l'ossigeno è un importante nutriente che permette alle cellule di compiere la respirazione aerobica all'interno dei mitocondri.

Tuttavia nella beuta non è semplice facile mantenere la sterilità in quanto essa non risulta chiusa ermeticamente e non è possibile monitorare ciò che sta accadendo al suo interno, se non prelevando un campione.

L'insieme di tutti i nutrienti forniti alle cellule viene chiamato terreno (o medium) di crescita.

Per questi motivi è stato inventato un macchinario in grado di accogliere al proprio interno le cellule, che fosse capace di mantenere la sterilità e fornire alle cellule tutto ciò di cui necessitano, permettendo allo stesso tempo di monitorare in maniera semplice e veloce tutti i parametri di crescita: il bioreattore. In primis, l'agitazione è garantita da una serie di pale rotanti collegate a un motore, che nei modelli più grandi si trova in testa al bioreattore stesso: la forma, la dimensione, la distanza e la velocità di rotazione delle pale può essere modificata a seconda delle esigenze.

Coltivazione di cellule

Le pale sono fondamentali non solo per miscelare le cellule e i nutrienti (che vengono forniti sterilizzati e filtrati mediante una pompa in entrata) ma anche per disciogliere al meglio l'ossigeno che viene fornito dal basso sotto forma di bolle.

Nel caso in cui invece l'organismo sia un anaerobio stretto, ovvero non sopravviva in presenza di ossigeno, viene semplicemente insufflato azoto nella brodocoltura: microrganismi come il produttore di biobutanolo *Clostridium acetobutylicum* infatti sarebbero difficilmente coltivabili in beuta proprio per il fatto di essere anaerobi stretti.

Nel caso invece di particolari microrganismi come il fungo filamentoso *Aspergillus niger*, utilizzato per la produzione di acido citrico, non è possibile usare bioreattori con pale rotanti, in quanto andrebbero a distruggere le cellule stesse: per questo motivo vengono utilizzati bioreattori che mescolano la brodocoltura utilizzando un potente getto d'aria compressa (ovviamente sterilizzata). Questo bioreattore viene chiamato air-lift.

Coltivazione di cellule



Come detto in precedenza, è possibile visionare ciò che sta accadendo all'interno del bioreattore grazie a una serie di sensori che, collegati a un computer dotato di un particolare software, permettono di raccogliere dati numerici e visionare l'evoluzione della brodocoltura nel tempo.

Il software permette anche di definire un valore fisso (o un valore soglia massimo/minimo) per ogni parametro e di mantenerlo tale nel bioreattore, intervenendo in caso di necessità: per esempio nel caso in cui si voglia mantenere un pH interno di 7, nel momento in cui il sensore capta un calo di pH dovuto alla crescita o alla produzione di un metabolita, il computer ordina l'immissione di una base in concentrazione tale da ristabilire il pH desiderato.

In caso contrario ovviamente verrà aggiunto un acido. Un'altra sostanza che spesso viene aggiunta alla brodocoltura è un anti-schiuma che elimina le bolle che si formano a causa dell'agitazione e che possono disturbare la crescita.

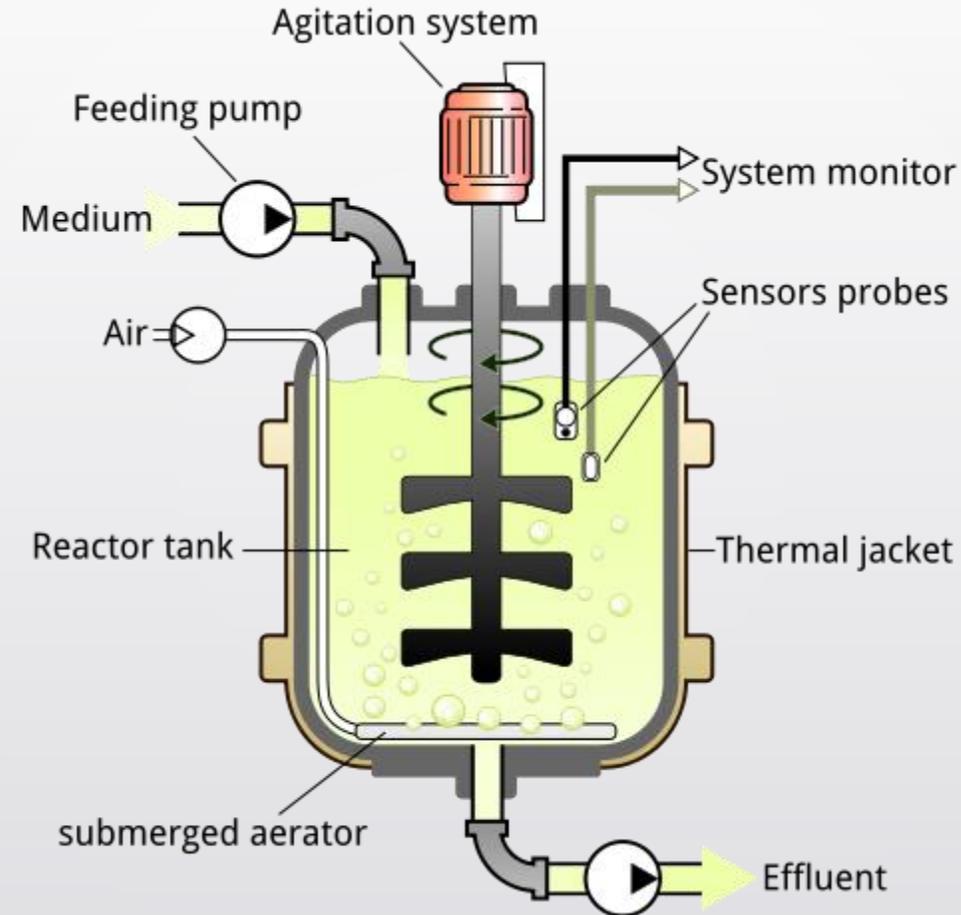
Coltivazione di cellule

Un altro parametro importante è la temperatura, che durante la crescita cellulare tende ad aumentare a causa delle reazioni esotermiche collegate al metabolismo: la temperatura può essere abbassata facendo passare acqua fredda in una serpentina posta all'interno di una camicia che riveste il bioreattore.

Tramite una valvola in uscita è possibile raccogliere un campione della brocoltura mantenendone la sterilità e calcolando la concentrazione di cellule, nutrienti e prodotti di fermentazione. Il sensore del glucosio, per esempio, è simile a quello che viene utilizzato dai malati di diabete: un enzima, chiamato glucosio ossidasi, libera perossido di idrogeno (H_2O_2) in maniera proporzionale alla concentrazione di glucosio disciolta.

Altri parametri, come il rapporto fra la concentrazione di ossigeno disciolto e l'anidride carbonica in uscita, possono dare indicazioni sullo "stato di salute" delle cellule, ovvero se esse si trovano sotto stress e di conseguenza rallentano la propria crescita, riducendo la produzione del metabolita d'interesse.

Coltivazione di cellule



Coltivazione di cellule

