



FACOLTA' DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

TESI DI LAUREA

**Implementazione di colture continue in bioreattori per l'ottimizzazione di un
processo di fermentazione**

Candidato: Elena Magistrali

Relatore: Prof. Lorenzo Pasotti

Correlatore: Dott.ssa Giulia Mordeglia

A.A 2025/2026

Sommario

La biologia sintetica è un'area della bioingegneria che si occupa dell'ingegnerizzazione di sistemi biologici, come microrganismi, per conferire loro specifiche funzionalità, tra cui la capacità di produrre molecole di interesse. In questo contesto si inseriscono i processi di *bioproduction*, che sfruttano sistemi biologici per la produzione di composti destinati a diverse applicazioni industriali. Tra questi, i processi fermentativi rappresentano una delle principali strategie e sono oggi impiegati per la produzione di farmaci, composti chimici, biomateriali e *biofuels*. In particolare, l'impiego di sottoprodotti dell'industria agroalimentare come materie prime rappresenta un approccio promettente per rendere questi processi più sostenibili e favorire la valorizzazione di risorse altrimenti inutilizzate. In questo contesto, il permeato concentrato del siero di latte, uno scarto dell'industria casearia con costosa procedura di smaltimento, costituisce uno scarto ricco di lattosio. Questa risorsa è potenzialmente impiegabile come substrato per la produzione biologica di etanolo, al fine di attuare un processo di bioeconomia circolare.

Il presente lavoro di tesi si concentra sull'ottimizzazione delle condizioni fermentative per la produzione di etanolo mediante un ceppo etanogenico di *Escherichia coli* (*E. coli*), con particolare attenzione all'implementazione di colture continue ed ai vantaggi che ne conseguono. Rispetto ai più tradizionali processi di fermentazione *batch* e *fed-batch*, la fermentazione in continua, infatti, può offrire una maggior produttività volumetrica, un utilizzo più efficiente dei nutrienti e la possibilità di mantenere le cellule in uno stato metabolico pressoché costante. Tuttavia, l'applicazione di colture continue è limitata da problematiche come il fenomeno del *wash out* e la difficoltà di mantenere elevate concentrazioni cellulari (colture ad alta densità) all'interno del bioreattore.

L'attività sperimentale presentata in tesi è stata condotta utilizzando una piattaforma scalabile di bioreattori: Chi.Bio. L'utilizzo di bioreattori su piccola scala permette di parallelizzare più esperimenti, limitarne i costi e gli sprechi. L'obiettivo finale è individuare le condizioni operative ottimali della fermentazione in continua e massimizzare così la produzione di etanolo. Una volta ottimizzato il processo, è stata implementata una strategia di immobilizzazione della biomassa sfruttando la flocculazione cellulare. A tale scopo, il ceppo di *E. coli* è stato ingegnerizzato con un

sistema di espressione di una proteina artificiale in grado di promuovere l'aggregazione spontanea delle cellule e favorirne la permanenza all'interno del bioreattore, anche nel momento di ricambio del terreno, per limitare il *wash out* ed aumentare il *production rate* del processo.

Il lavoro di tesi (**Figura 1**) è stato svolto presso il laboratorio di Bioinformatica e Biologia Sintetica e le attività sperimentali presso il laboratorio di colture cellulari CHT, *Centre for Health Technologies*.

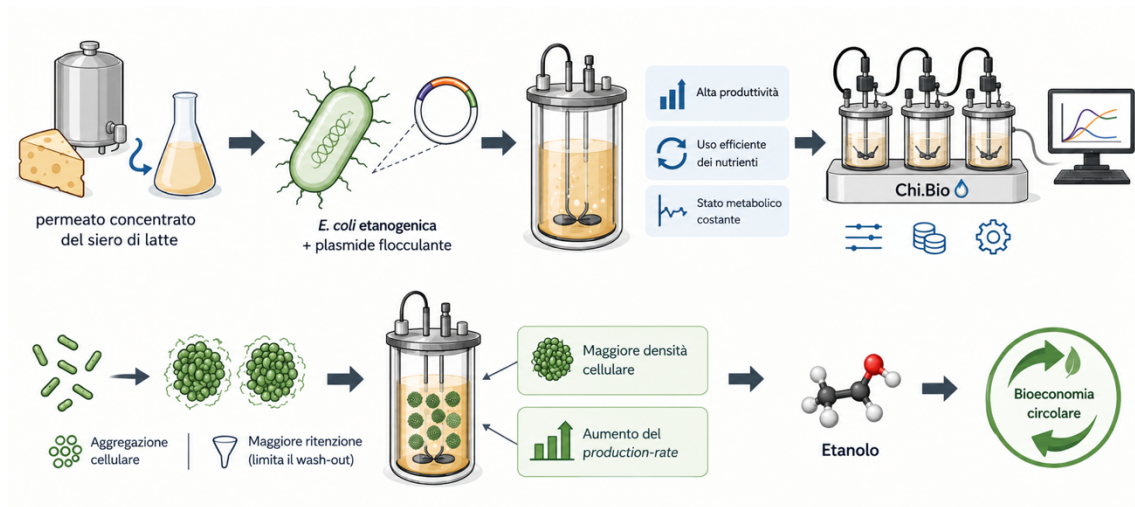


Figura 1. Sommario grafico del presente lavoro di tesi.

Indice

Lista delle figure	7
Lista delle tabelle	11
1. Introduzione	12
1.1. Principi di biologia sintetica	12
1.1.1. Regolazione dell'espressione genica	13
1.2. Bioproduzione	15
1.2.1. Fermentazione alcolica	16
1.2.2. Microrganismi per la produzione di etanolo	17
1.2.3. Ingegnerizzazione di batteri per la produzione di etanolo	17
1.2.4. Colture batteriche	18
1.2.4.1. Coltura <i>batch</i>	21
1.2.4.2. Coltura <i>fed-batch</i>	21
1.2.4.3. Coltura continua	22
1.3. Strategie di immobilizzazione	23
1.3.1. Strategie convenzionali	24
1.3.2. Strategie emergenti	25
1.4. Obiettivo	26
2. Metodi sperimentali	28
2.1. Descrizione dei ceppi etanogenici	28
2.1.1. Flocculazione	29
2.1.1.1. Flocculazione ingegnerizzata in <i>E. coli</i> e sistema Lys10	30
2.1.2. Protocollo di trasformazione batterica	32
2.2. Terreni di coltura, induttori ed antibiotici	32
2.3. Analisi dei prodotti di fermentazione	34
2.4. Misura di densità ottica con lettore di micropiastre	35
2.5. Piattaforma di bioreattori Chi.Bio	35
2.5.1. Protocollo di utilizzo della piattaforma Chi.Bio	37
3. Metodi di analisi dei dati	41
3.1. Modalità di utilizzo dei reattori	41

3.1.1. Chi.Bio in modalità turbidostato	41
3.1.2. Chi.Bio in modalità chemostato	42
3.2. Elaborazione dei dati restituiti da Chi.Bio	44
3.2.1. Metodi di calcolo del <i>dilution rate</i> cellulare	46
4. Risultati	50
4.1. Valutazione dell'arricchimento della coltura tramite test di sedimentazione in provetta	50
4.2. Valutazione delle modifiche effettuate al <i>setup</i> della piattaforma Chi.Bio	55
4.3. Caratterizzazione del <i>production rate</i> del ceppo non flocculante W105 in bioreattore	59
4.4. Caratterizzazione del <i>production rate</i> del ceppo flocculante W105-Lys10 in bioreattore	65
5. Conclusioni	74
Bibliografia	81
Appendice	86
A. Colture <i>overnight</i> per inoculo in Chi.Bio	86
B. Calibrazione del <i>detector</i> di OD di Chi.Bio e Tecan e conversione in OD reale	86
C. Fermentazioni <i>batch</i> di W105 e W105-Lys10	89
D. Protocollo per test di sedimentazione di W105-Lys10	91
E. Portata delle pompe in <i>input</i> e <i>output</i> dei reattori Chi.Bio	92
F. Tracciati di OD del ceppo non flocculante rilevati dal <i>detector</i> di Chi.Bio	93
G. Tracciati di OD del ceppo flocculante rilevati dal <i>detector</i> di Chi.Bio	95

Lista delle figure

1	Sommario grafico del presente lavoro di tesi.	4
1.1	Blocchi fondamentali costituenti un plasmide. Immagine creata con <i>BioRender</i> .	13
1.2	Rappresentazione schematica di un circuito genetico. Immagine creata con <i>BioRender</i> .	15
1.3	Schema del <i>pathway</i> biochimico della fermentazione alcolica.	16
1.4	Coltura batterica solida.	19
1.5	Coltura batterica liquida.	19
1.6	Fasi di crescita batterica in scala semi-logaritmica, da [12].	20
1.7	Coltura <i>batch</i> .	21
1.8	Coltura <i>fed-batch</i> , si raggiungono concentrazioni di biomassa e di prodotto maggiori.	22
1.9	Coltura continua, la biomassa ed il prodotto oscillano nell'intorno della fase di crescita desiderata, e il prodotto nel terreno viene costantemente rimosso dalle pompe per mantenere il volume costante.	23
2.1	<i>Pathway</i> fermentativo di <i>E. coli</i> modificato. Immagine creata con <i>BioRender</i> .	29
2.2	Circuito genetico del sistema EhaA-ELP-Lys10, da [22].	31
2.3	Sistema EhaA-ELP-Lys10, da [22].	31
2.4	Piattaforma Chi.Bio con connessioni tra le componenti, da [30].	36
2.5	Struttura del tappo della <i>vial</i> di Chi.Bio.	38
2.6	<i>Setup</i> sperimentale Chi.Bio montato.	39
2.7	Interfaccia grafica di Chi.Bio da cui si avviano gli esperimenti.	40
3.1	Modalità di funzionamento di bioreattori, a sinistra chemostato e a destra turbidostato.	44

4.1	Variazione dell'OD nel tempo in test di sedimentazione del ceppo W105.	51
4.2	Variazione dell'OD nel tempo in test di sedimentazione del ceppo W105-Lys10.	52
4.3	Arricchimento delle colture nel tempo rispetto all'istante iniziale.	53
4.4	Arricchimento di tre provette di <i>pellet</i> di W105-Lys10 tenute in incubatore statico per 5, 10 e 15 minuti (da sinistra a destra).	54
4.5	Arricchimento di tre provette di <i>pellet</i> di W105 tenute in incubatore statico per 5, 10 e 15 minuti (da sinistra a destra).	54
4.6	Posizionamento delle componenti della piattaforma Chi.Bio.	56
4.7	<i>Scatter plot</i> delle misure di <i>dilution rate</i> ottenute dai Metodi 2 e 3.	59
4.8	Crescita <i>batch</i> in Chi.Bio con evidenziati gli OD_{target} a cui sono stati effettuati gli esperimenti con il ceppo non flocculante.	60
4.9	<i>Dilution rate</i> in funzione dell' OD_{target} a cui è imposto l'esperimento per il ceppo W105.	62
4.10	Concentrazione di etanolo in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105.	63
4.11	<i>Production rate</i> in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105.	64
4.12	Resa percentuale in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105.	64
4.13	Concentrazione di etanolo in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.	68

4.14	<i>Production rate</i> in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.	69
4.15	Resa percentuale in funzione del <i>dilution rate</i> dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.	70
4.16	<i>Biofilm</i> adesivo al pescante in silicone con cui è allungato il tappo di Chi.Bio, foto di differenti esperimenti.	71
4.17	<i>Biofilm</i> adesivo alle pareti della <i>vial</i> in vetro di Chi.Bio, foto di differenti esperimenti.	72
B.1	Retta di regressione per OD misurato in Tecan.	87
B.2	Retta di regressione per OD misurato in Chi.Bio	87
B.3	<i>Fitting</i> dei dati sul modello per Tecan.	88
B.4	<i>Fitting</i> dei dati sul modello per Chi.Bio.	88
C.1	Concentrazione di lattosio nel tempo per fermentazioni <i>batch</i> di W105.	89
C.2	Concentrazione di etanolo nel tempo per fermentazioni <i>batch</i> di W105.	90
C.3	Concentrazione di lattosio nel tempo per fermentazioni <i>batch</i> di W105-Lys10.	90
C.4	Concentrazione di etanolo nel tempo per fermentazioni <i>batch</i> di W105-Lys10.	91
F.1	Tracciati di densità ottica rilevati dal <i>detector</i> di Chi.Bio per il ceppo non flocculante. I grafici presentano i punti di campionamento. A sinistra le prime repliche a destra le seconde.	94

G.1	Tracciati di densità ottica rilevati dal <i>detector</i> di Chi.Bio per il ceppo flocculante. I grafici presentano i punti di campionamento.	96
-----	--	----

Lista delle tabelle

2.1	Tempi di ritenzione caratteristici del metodo HPLC utilizzato.	34
3.1	Dati memorizzati in un esperimento Chi.Bio.	45
4.1	Esperimenti di fermentazione in continua del ceppo W105 in Chi.Bio.	61
4.2	Esperimenti di fermentazione in continua del ceppo W105-Lys10 in Chi.Bio.	67
E.1	Portata delle pompe in <i>input</i> e <i>output</i> dei reattori Chi.Bio.	93

Capitolo 1

Introduzione

In questo primo capitolo si introducono i principi alla base della biologia sintetica (Sezione 1.1) e della regolazione dell'espressione genica (Sezione 1.1.1). Si passa poi ad introdurre la bioproduzione (Sezione 1.2) con vari sottocapitoli che riguardano: la fermentazione alcolica (Sezione 1.2.1), i microrganismi per la produzione di etanolo (Sezione 1.2.2), lo sviluppo di batteri ingegnerizzati a questo scopo (Sezione 1.2.3) e le tipologie di colture batteriche attuabili per implementare la fermentazione (Sezione 1.2.4). Infine, si descrivono le strategie di immobilizzazione batterica (Sezione 1.3), convenzionali (Sezione 1.3.1) ed emergenti (Sezione 1.3.2). Si termina riportando gli obiettivi del presente lavoro di tesi (Sezione 1.4).

1.1 Principi di biologia sintetica

La biologia sintetica è una disciplina trasversale che unisce le conoscenze biologiche con i principi dell'ingegneria. Il suo scopo è quello di costruire nuovi organismi o modificarne di esistenti per permettere loro di svolgere una specifica funzione di interesse [1]. Le principali tecniche impiegate in biologia sintetica sono due: la costruzione *de novo* di organismi e la modifica di organismi esistenti tramite inserimento di DNA plasmidico [2]. La prima strategia ha lo svantaggio di essere onerosa sia dal punto di vista dei costi sia delle risorse, in quanto richiede la progettazione dell'intero corredo genetico necessario alla sopravvivenza di una cellula, oltre all'implementazione della nuova funzione di interesse. La seconda strategia consiste nell'utilizzare plasmidi, ovvero piccole molecole di DNA circolare, che si replicano autonomamente all'interno della cellula ospite. In questi vettori si vuole veicolare il gene, o il circuito genetico, responsabile della funzione che si desidera conferire all'organismo ricevente. Nel seguente lavoro sono stati utilizzati batteri di *Escherichia coli* (*E. coli*) ingegnerizzati mediante l'utilizzo di plasmidi.

I plasmidi sono costituiti dai seguenti blocchi fondamentali (**Figura 1.1**):

- Gene di resistenza antibiotica (AB^R): permette di individuare le cellule che hanno inglobato il plasmide rispetto a quelle che non lo contengono. Le cellule trasformate sono in grado di crescere in presenza dell'antibiotico corrispondente, mentre quelle che non contengono il plasmide vengono eliminate.
- Origine di replicazione (ORI): è la sequenza di DNA che permette l'inizio della replicazione del plasmide e ne determina il *copy number*, ovvero la frequenza con cui avviene la duplicazione. Per questo motivo i plasmidi possono essere definiti *high-copy*, *medium-copy* o *low-copy*.
- Sito di clonaggio: è una regione in cui viene inserito il programma genetico di interesse. Le endonucleasi di restrizione riconoscono i siti di restrizione presenti in questa regione e consentono il taglio del DNA per l'inserimento del frammento desiderato.

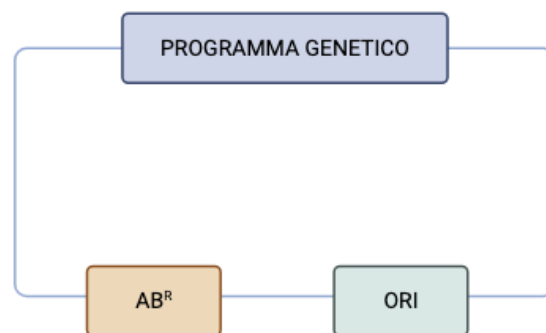


Figura 1.1: Blocchi fondamentali costituenti un plasmide. Immagine creata con *BioRender*.

1.1.1 Regolazione dell'espressione genica

All'interno del circuito genetico sono presenti sequenze responsabili della regolazione genica, che contengono informazioni sia sul livello di espressione del gene di interesse sia sulla produzione della proteina corrispondente. I principali moduli regolatori sono i seguenti (**Figura 1.2**):

- Promotore: è la regione di DNA localizzata a monte della sequenza codificante a cui si lega l'RNA-polimerasi con conseguente sintesi dell'RNA messaggero

(mRNA). Generalmente un promotore di *E. coli* è costituito da un sito d'inizio della trascrizione (*Transcription Start Site*, TSS) e da due regioni (ciascuna formata da 6 paia di basi) dette -35 e -10, le quali sono sequenze posizionate rispettivamente 35 e 10 basi prima del TSS. La struttura del promotore determina l'affinità dell'RNA-polimerasi e rappresenta uno dei principali fattori che influenzano il *transcription rate*, ovvero la velocità di sintesi dell'mRNA. Esistono promotori costitutivi, che producono una quantità di trascritto costante, ed inducibili, quando l'attività trascrizionale viene modulata dalla presenza di specifici fattori di trascrizione o molecole induttrici.

- *Ribosome binding site* (RBS): è la regione a cui si aggancia la subunità minore del ribosoma, ovvero quella struttura che si occupa della traduzione delle triplette di basi azotate (codoni) in aminoacidi. Nei batteri come *E. coli*, l'RBS, contiene la sequenza di Shine-Dalgarno che si appaia, per complementarità delle basi, con la subunità 16S dell'RNA ribosomiale (rRNA). Questa regione determina la forza di legame tra ribosoma e DNA e, di conseguenza, l'efficienza di traduzione e la quantità di proteina sintetizzata.
- Sequenza codificante (CDS): è la sequenza costituita da codoni contenente l'informazione genetica per la sintesi della proteina di interesse. Ogni CDS inizia con un codone di *start* (ATG) e termina con uno di *stop* (TAA o TAG o TGA).
- Terminatore: è la regione di DNA a valle della sequenza codificante che ha lo scopo di interrompere la trascrizione. I terminatori possono essere Rho-dipendenti, quando richiedono l'azione della proteina Rho che rompe il legame tra RNA-polimerasi e DNA, oppure Rho-indipendenti, nel caso in cui per terminare la trascrizione è sufficiente una regione ricca in GC (guanina e citosina) seguita da una catena di poli-T per formare un *hairpin* nell'RNA.

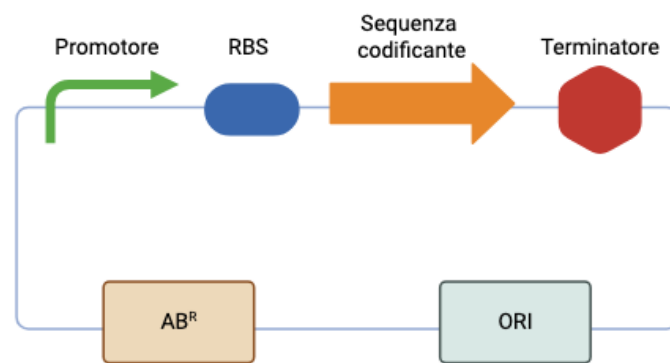


Figura 1.2: Rappresentazione schematica di un circuito genetico. Immagine creata con *BioRender*.

La possibilità di attuare un preciso controllo sull'espressione genica è sfruttata per costruire un ceppo di *E. coli* etanologico ed introdurre in esso il gene responsabile della flocculazione (descritto con precisione in Sezione 2.1).

1.2 Bioproduzione

Con il termine bioproduzione si intendono quei processi di produzione che impiegano organismi viventi per la sintesi di molecole e di prodotti di interesse industriale, farmaceutico, alimentare ed energetico. A differenza dei tradizionali processi di sintesi chimica, la bioproduzione sfrutta la capacità metabolica di microrganismi per ottenere prodotti attraverso processi sostenibili e con ridotto impatto ambientale. Lo sviluppo di discipline come la biologia sintetica ha permesso di ottimizzare questi processi, modificando i circuiti metabolici al fine di renderli più efficienti per lo scopo. Oggi la bioproduzione trova applicazione nella sintesi di un'ampia gamma di prodotti, come enzimi, antibiotici, bioplastiche e biocarburanti.

Nel caso specifico di questo lavoro si fa riferimento al recupero di uno scarto dell'industria casearia attraverso fermentazione alcolica del lattosio. Lo scarto in questione è il permeato concentrato del siero di latte (*Concentrated Whey Permeate* – CWP), derivato dalla produzione di latticini e dall'estrazione di sieroproteine. L'elevato quantitativo di lattosio presente nel permeato di latte non ne permette lo smaltimento con trattamenti convenzionali, in quanto non ne riducono il contenuto organico [3, 4]. Per

questo motivo è di interesse utilizzare il sopracitato scarto per ricavarne molecole utili al fine di implementare un processo di bioeconomia circolare.

La fermentazione alcolica del lattosio permette la produzione di una molecola che può essere utilizzata come fonte energetica o impiegata nelle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche [5].

1.2.1 Fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica (**Figura 1.3**) è un processo metabolico anaerobico ampiamente diffuso in numerosi lieviti e batteri, attraverso il quale il glucosio viene convertito in etanolo ed anidride carbonica. Il processo ha inizio con la glicolisi, via catabolica che porta alla degradazione di una molecola di glucosio in due di piruvato, con la produzione di ATP e la riduzione di NAD^+ in NADH. In condizioni anaerobiche, il piruvato viene decarbossilato, generando acetaldeide e anidride carbonica. L'acetaldeide viene ridotta ad etanolo, reazione che comporta l'ossidazione del NADH a NAD^+ . La rigenerazione di NAD^+ è essenziale per consentire la prosecuzione della glicolisi e garantire il mantenimento del bilancio redox.

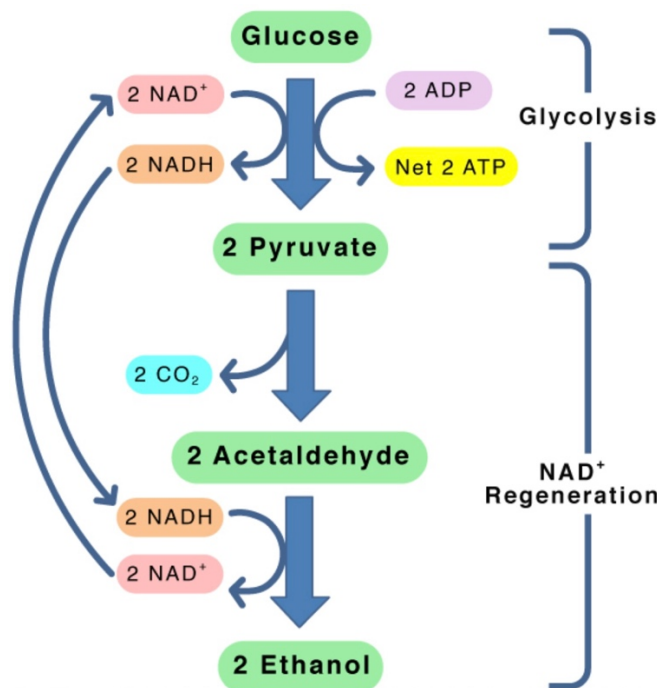


Figura 1.3: Schema del *pathway* biochimico della fermentazione alcolica.

Nel caso in esame, per la valorizzazione del permeato concentrato da siero di latte, il principale substrato disponibile è il lattosio, un disaccaride composto da glucosio e galattosio. Il lattosio, per essere metabolizzato, è necessario che venga idrolizzato nei due suoi monosaccaridi costituenti. Diversi studi [31] hanno evidenziato la possibilità di convertire lattosio in etanolo grazie all'impiego di lieviti opportunamente selezionati o ingegnerizzati per poter implementare la bioproduzione di etanolo.

1.2.2 Microrganismi per la produzione di etanolo

In letteratura sono descritti vari microrganismi che hanno la naturale capacità di effettuare fermentazione alcolica, trasformando il lattosio in etanolo. Tra i lieviti che naturalmente fermentano il lattosio sono noti *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* [5]. Questi microrganismi presentano alcuni svantaggi: hanno bassa tolleranza all'etanolo, rese fermentative non ottimali in quanto una parte di carbonio è destinata alla formazione di metaboliti secondari e, inoltre, garantiscono una minore robustezza per applicazioni industriali [6]. Sono stati studiati anche un ulteriore lievito ed un batterio, che però non utilizzano naturalmente lattosio, ma glucosio, fruttosio o saccarosio e sono rispettivamente *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* [7]. Questi microrganismi riescono a fermentare zuccheri in etanolo grazie a due enzimi: la piruvato decarbossilasi (*pdc*), che converte l'acido piruvico in acetaldeide, e l'alcol deidrogenasi II (*adhB*), che trasforma l'acetaldeide in etanolo. In entrambi i casi, però, è necessario un processo di pre-idrolisi chimica o enzimatica per ricavarne i monosaccaridi costituenti del lattosio, quali glucosio e galattosio. Sebbene *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* abbiano un'ottima efficienza, il *pre-processing* necessario risulta costoso e quindi poco applicabile dal punto di vista industriale [8]. A tale scopo *E. coli* costituisce un organismo *chassis* particolarmente adatto alla biologia sintetica, grazie alla facilità di manipolazione genetica, alla rapida crescita e alla conoscenza approfondita del suo metabolismo, consentendo di progettare e ottimizzare vie metaboliche finalizzate alla produzione di etanolo [8,9,10].

1.2.3 Ingegnerizzazione di batteri per la produzione di etanolo

E. coli possiede un *pathway* metabolico fermentativo che comprende l'isoenzima *adhE*, simile ad *adhB* (sopracitato in Sezione 1.2.2 per *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas*

mobilis), ma con un'attività inferiore rispetto a quella posseduta dall'enzima eterologo, per questo produce principalmente acidi organici e basse concentrazioni di etanolo. Di conseguenza è stata attuata una modifica genetica in *E. coli* al fine di far esprimere i geni *pdc* e *adhB* di *Zymomonas mobilis* per ottimizzare la produzione di etanolo da lattosio: *pdc* trasforma il piruvato in acetaldeide e a *adhB* trasforma acetaldeide in etanolo. Inoltre, per rendere ulteriormente performante il ceppo di *E. coli* selezionato (ceppo W) è stato introdotto anche un operone etanologeno [10]. La descrizione più dettagliata dei ceppi utilizzati in questo lavoro è presente in Sezione 2.1.

In questo contesto, la ricerca scientifica degli ultimi anni ha dedicato crescente attenzione all'identificazione di strategie in grado di ottimizzare ulteriormente i processi fermentativi. Di seguito vengono descritte le tipologie di colture che possono essere implementate ed il tipo di fermentazione che ne consegue (Sezione 1.2.4). Volendo esplorare i vantaggi dei processi fermentativi condotti in coltura continua [11], si procede ad implementare un'ulteriore modifica nel ceppo già ottimizzato, introducendo il plasmide contenente il gene per la flocculazione. La flocculazione è un processo che permette di lavorare ad alta densità, effettuare *cell retention* (immobilizzazione cellulare, discussa in Sezione 1.3) in modo da ridurre il *wash out* cellulare senza ricorrere a membrane filtranti con conseguente aumento dei costi di produzione.

1.2.4 Colture batteriche

Per coltura batterica si intende l'insieme di tecniche utilizzate in laboratorio per permettere ai microrganismi di proliferare all'interno di un ambiente controllato. Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati ceppi di *E. coli* (W105 e W105-Lys10) descritti in Sezione 2.1, coltivati in terreni ricchi di nutrienti (Sezione 2.2) fondamentali per la crescita cellulare. Questi terreni di crescita possono essere in forma solida o liquida.

Nel primo caso (**Figura 1.4**) il terreno è solidificato mediante l'aggiunta di agar e distribuito in piastre Petri. Dopo la semina di batteri da *stock*, si notano agglomerati di cellule visibili ad occhio nudo. La crescita *overnight* avviene all'interno di incubatore statico a 37°C.



Figura 1.4: Coltura batterica solida.

Le colture liquide (**Figura 1.5**), invece, vengono preparate in provette contenenti terreno privo di agar, quindi non solidificato. La crescita in questo caso è visibile ad occhio nudo con aumento della torbidità del mezzo dovuto all'incremento della concentrazione cellulare. In questo caso la crescita *overnight* avviene all'interno di incubatore dinamico a 37°C così da garantire adeguata ossigenazione e distribuzione omogenea dei nutrienti.

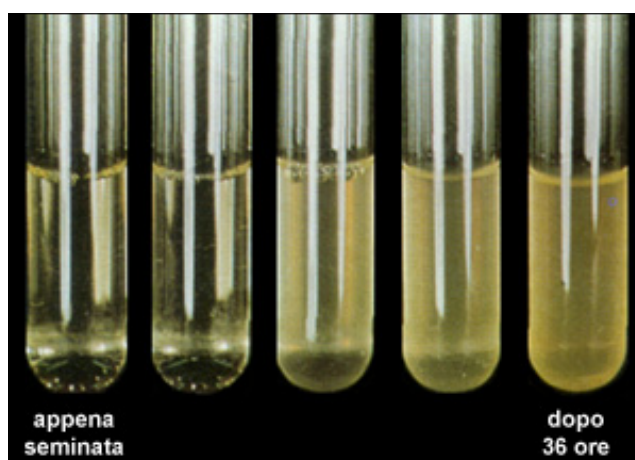


Figura 1.5: Coltura batterica liquida.

La crescita di una popolazione batterica è generalmente caratterizzata da quattro fasi [12] (**Figura 1.6**):

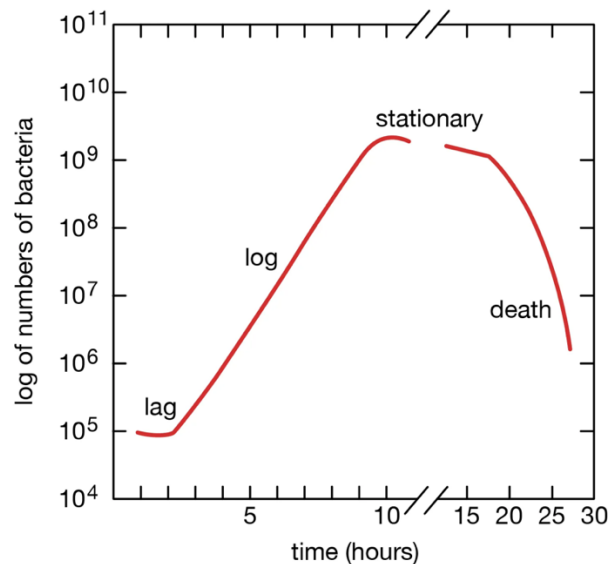
- Fase di latenza (*lag*): fase di preparazione, in cui le cellule sintetizzano enzimi e componenti cellulari necessari alla successiva divisione, mentre il numero di cellule rimane pressoché costante.

- Fase esponenziale (*log*): fase in cui si ha la maggior proliferazione cellulare, qui le cellule si duplicano con la massima velocità di crescita. La riproduzione avviene per scissione binaria e può essere modellizzata dalla seguente relazione:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

Con:

- N_0 : il numero iniziale di cellule.
- N : il numero finale di cellule.
- n : il numero di generazioni durante la fase esponenziale.
- Fase stazionaria (*stationary*): fase in cui la velocità di duplicazione è molto inferiore rispetto alla fase esponenziale. In questa zona la velocità di divisione cellulare e la velocità di morte risultano approssimativamente uguali, di conseguenza il numero totale di cellule rimane circa costante.
- Fase di morte (*death*): fase raggiunta nel momento in cui vengono esauriti i nutrienti presenti nel brodo di coltura e le cellule iniziano ad andare incontro a lisi. In questa fase si osserva una riduzione della biomassa.



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 1.6: Fasi di crescita batterica in scala semi-logaritmica, da [12].

Le modalità e le condizioni in cui vengono coltivate le cellule influenzano la crescita. Si possono distinguere tre principali tipologie di colture cellulari *batch*, *fed-batch* e continua.

1.2.4.1 Coltura *batch*

La coltura *batch* [13] (**Figura 1.7**) è un processo condotto in un sistema chiuso senza ricambio di terreno. Il brodo sterile viene fornito all'inizio della crescita cellulare e al suo interno viene fatto l'inoculo batterico che corrisponde circa al 1-5% del volume totale. Durante la crescita i nutrienti vengono progressivamente consumati e i prodotti del metabolismo si accumulano fino all'esaurimento delle risorse disponibili, momento in cui il processo termina. In questa tipologia di coltura la popolazione batterica attraversa tutte le fasi di crescita cellulare prima descritte. La crescita *batch* è una modalità operativa semplice da implementare: condurre processi fermentativi con questo metodo di crescita permette di ottenere concentrazioni di prodotto elevate.

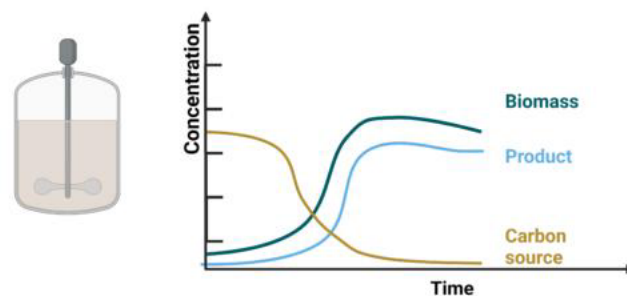


Figura 1.7: Coltura *batch*.

1.2.4.2 Coltura *fed-batch*

La coltura *fed-batch* [13, 14] (**Figura 1.8**) rappresenta un sistema semi-aperto, in quanto aperto in entrata, ma non in uscita. È una tipologia di coltura a volume variabile, che aumenta nel tempo. A differenza della semplice coltura *batch* i nutrienti vengono forniti anche dopo l'inizio della fermentazione. In questa coltura la biomassa aumenta in proporzione ai nutrienti forniti. Inizialmente evolve come una normale coltura *batch*, successivamente sono aggiunte quantità controllate di substrato. Questa strategia consente di prolungare la fase esponenziale, mantenendo elevate concentrazioni cellulari.

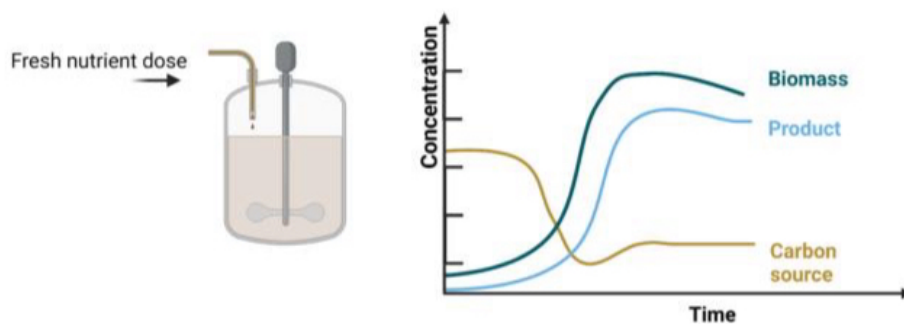


Figura 1.8: Coltura *fed-batch*, si raggiungono concentrazioni di biomassa e di prodotto maggiori.

1.2.4.3 Coltura continua

La coltura continua [13, 15] (**Figura 1.9**) è implementata attraverso un sistema ad anello chiuso in cui terreno viene costantemente ricambiato, aggiungendo quello fresco ed eliminando l'esausto. In questo modo il volume della coltura rimane pressoché costante. Tale strategia di coltura viene generalmente condotta all'interno di bioreattori: nel caso del presente lavoro viene utilizzata la piattaforma Chi.Bio (descritta in Sezione 2.5), dotata di un sistema di pompe peristaltiche per l'aggiunta e la rimozione di terreno. In questa tipologia di colture le fasi che si susseguono sono tre:

- Fase *batch*: entrambe le pompe sono inattive, in questa fase la biomassa aumenta fino al raggiungimento di una concentrazione adeguata.
- Fase di *start-up*: le pompe in *input* ed *output* sono funzionanti, c'è ricambio di terreno e la biomassa continua ad aumentare in proporzione all'apporto di nuovi nutrienti.
- Fase stazionaria (*steady state*): si raggiunge un livello costante di biomassa, in questa fase la velocità di crescita cellulare è bilanciata dalla velocità di diluizione.

L'obiettivo della coltura continua è quello di mantenere più a lungo possibile le cellule nella fase di crescita desiderata mediante ricambi di terreno, al fine di coltivarle nelle condizioni ottimali di produzione. In queste condizioni si ha quindi una produttività elevata e stabile nel tempo. Quanto descritto avviene grazie ad un continuo apporto di nutrimenti.

È di interesse, in questo lavoro, trovare le condizioni ottimali di fermentazione in continua dei ceppi descritti in Sezione 2.1 e confrontarne il *production rate* con la più semplice fermentazione *batch*.

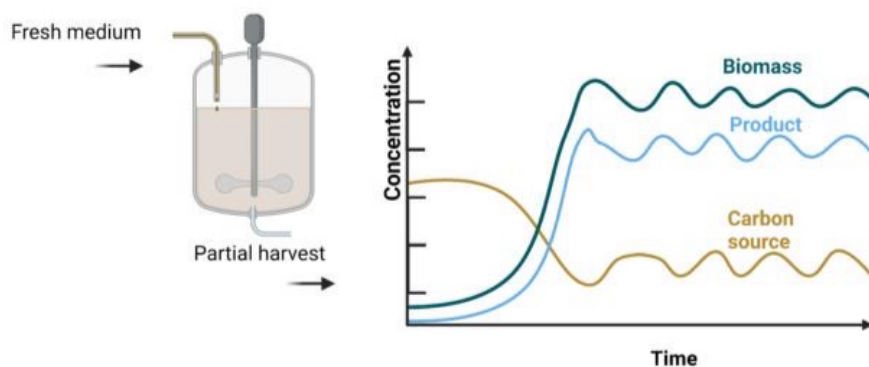


Figura 1.9: Coltura continua, la biomassa ed il prodotto oscillano nell'intorno della fase di crescita desiderata, e il prodotto nel terreno viene costantemente rimosso dalle pompe per mantenere il volume costante.

1.3 Strategie di immobilizzazione

L'immobilizzazione cellulare rappresenta una strategia biotecnologica che consente di confinare cellule all'interno o sulla superficie di un supporto, mantenendone però l'attività metabolica e consentendo il trasferimento di nutrienti, ossigeno e metaboliti tra il sistema di coltura e l'ambiente circostante. A differenza delle colture in cui le cellule sono sospese nel mezzo di crescita, attraverso l'immobilizzazione, le cellule sono trattenute mediante un supporto fisico oppure attraverso meccanismi di auto-aggregazione. Questi processi vengono sfruttati per implementare colture cellulari ad alta densità [16]. L'utilizzo di colture immobilizzate offre numerosi vantaggi rispetto alle colture convenzionali. Il contenimento della biomassa consente di aumentare la densità cellulare, riduce il rischio di *wash out* nelle colture continue e facilita il riutilizzo delle cellule. Inoltre, il microambiente creato dall'immobilizzazione può conferire una maggior resistenza agli stress meccanici, chimici e fisiologici, migliorando la tolleranza delle cellule a variazioni di pH, temperatura, concentrazione di substrato o presenza di composti tossici. Queste caratteristiche rendono l'immobilizzazione una tecnologia particolarmente interessante per la produzione di enzimi, proteine ricombinanti,

metaboliti e biocarburanti [17]. Esistono strategie di immobilizzazione definite convenzionali e strategie emergenti.

1.3.1 Strategie convenzionali

Di seguito una descrizione delle principali strategie convenzionali di immobilizzazione:

- **Adsorbimento superficiale:** consiste nell'adesione spontanea delle cellule alla superficie di un materiale (polimeri naturali o sintetici) mediante interazioni fisiche deboli (come legami ad idrogeno e forze di Van der Waals). Questa strategia è semplice e non richiede reagenti chimici che possono compromettere la vitalità cellulare, ma le interazioni, essendo deboli, possono determinare il distacco della biomassa in processi con elevate forze di taglio o lunghi tempi di coltivazione [16].
- **Reticolazione:** consiste nel creare una rete di collegamento tra cellule mediante agenti chimici formando una struttura tridimensionale stabile. Il *cross linking* non richiede necessariamente un supporto solido, poiché la biomassa viene stabilizzata attraverso una rete di legami chimici che garantisce stabilità meccanica, ma l'esposizione ad agenti reticolanti può compromettere la vitalità cellulare, di conseguenza questa strategia viene più frequentemente applicata per l'immobilizzazione di enzimi [18].
- **Intrappolamento in gel:** le cellule sono inglobate all'interno di una matrice tridimensionale porosa che permette la diffusione di nutrienti e metaboliti, ma al contempo la porosità è studiata in modo da impedire la fuoriuscita della biomassa. L'alginato è uno dei materiali più utilizzati a questo scopo grazie alla sua elevata biocompatibilità e al basso costo. Le cellule vengono sospese in una soluzione di alginato che, a contatto con un'altra soluzione contenente ioni calcio, forma rapidamente microsfele gelificate nelle quali la biomassa rimane intrappolata [16]. Questa strategia garantisce una buona resistenza meccanica, ma, nelle particelle di dimensioni maggiori, possono instaurarsi gradienti di concentrazione di nutrienti ed ossigeno che limitano l'attività delle cellule più interne.
- **Incapsulamento:** consiste nel confinare le cellule all'interno di microcapsule o membrane semipermeabili che consentono il passaggio selettivo di molecole di piccole dimensioni, ma trattengono la biomassa. Questa tecnica permette un

elevato controllo del microambiente cellulare, ma è più complessa e costosa rispetto ad altre metodologie [16].

- **Legame covalente:** le cellule sono ancorate permanentemente alla superficie del supporto mediante reagenti chimici. Questa tecnica garantisce immobilizzazione stabile e riduce il rilascio della biomassa. I trattamenti chimici necessari, però possono alterare l'integrità di membrana e l'attività metabolica cellulare [16].

1.3.2 Strategie emergenti

Negli ultimi anni, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di strategie di immobilizzazione che sfruttano le proprietà intrinseche dei microrganismi o si basano su modifiche genetiche attraverso la biologia sintetica per favorire l'aggregazione della biomassa [22], con l'obiettivo di ottenere sistemi più semplici ed economici, ma sempre mantenendo elevata densità cellulare e migliorando la produttività dei processi fermentativi in continua. Tra le principali strategie emergenti rientrano:

- *Biofilm*: sono comunità microbiche aderenti ad una superficie ed immerse in matrice extracellulare che protegge le cellule dagli stress ambientali e favorisce la comunicazione intercellulare. Le cellule organizzate in *biofilm* presentano elevata stabilità metabolica ed una miglior capacità di permanenza all'interno di bioreattori, risultando adatte a processi continui [19].
- *Engineered Living Materials* (ELMs): rappresentano una classe emergente di materiali biologici ibridi costituiti da cellule viventi ingegnerizzate in grado di produrre matrici extracellulari o proteine strutturali che conferiscono al materiale proprietà funzionali [20]. Gli ELMs, essendo vivi, sono materiali dinamici ed il loro comportamento è strettamente legato all'espressione genica delle cellule inglobate. Le cellule non sono semplicemente immobilizzate, ma sono unità attive del materiale stesso. Le principali strategie includono la produzione di matrici extracellulari ingegnerizzate e l'espressione di proteine strutturali modulari [21]. Uno dei possibili approcci è l'impiego di *Elastin-Like Polypeptides* (ELPs), ovvero proteine ricombinanti che grazie al loro auto-assemblaggio favoriscono l'aggregazione cellulare e la formazione di matrici tridimensionali per trattenere la biomassa. Tale approccio è stato validato principalmente in colture *batch* [22], ma la maggior ritenzione della biomassa e la semplificazione delle operazioni di

separazione, rende questa tecnica particolarmente promettente anche in processi fermentativi in continua che verranno analizzati di seguito.

1.4 Obiettivo

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi è lo sviluppo e l'ottimizzazione di processi fermentativi in coltura continua per la produzione di bioetanolo mediante un ceppo etanogenico, utilizzando una piattaforma scalabile di bioreattori (Chi.Bio [30]). Si è scelto di utilizzare questa piattaforma in quanto permette di lavorare con volumi di coltura ridotti, al fine di limitare il quantitativo di risorse necessarie ed avere la possibilità di parallelizzare più esperimenti. Come precedentemente descritto, il fine ultimo è poter applicare questo lavoro a colture continue che utilizzano come substrato il permeato concentrato del siero di latte, ma negli esperimenti effettuati è stato utilizzato come brodo di coltura un terreno ricco di nutrienti con l'ulteriore aggiunta di lattosio, al fine di svolgere il lavoro in condizioni riproducibili con zuccheri affini allo scarto di interesse.

Lo studio nasce dall'esigenza di migliorare l'efficienza dei processi fermentativi in continua [22], sfruttando strategie di immobilizzazione della biomassa, quali l'impiego della flocculazione, che consentano di incrementare la densità cellulare a cui lavora il sistema e ridurre il *wash out*.

Di seguito sono riportate i principali quesiti di ricerca a cui questo lavoro intende rispondere:

- *L'utilizzo di batteri resi flocculanti garantisce un effettivo arricchimento della coltura quando il terreno viene ricambiato?*

Si è verificato, attraverso test di sedimentazione, se l'impiego di un ceppo di *E. coli* etanogenico con fenotipo flocculante consenta effettivamente di incrementare la ritenzione e l'arricchimento della biomassa rispetto al corrispondente ceppo non flocculante.

- *È possibile definire un setup sperimentale della piattaforma Chi.Bio compatibile con le condizioni di fermentazione?*

È stato necessario ottimizzare le condizioni operative della piattaforma Chi.Bio, attraverso la definizione di parametri sperimentali necessari ad ottenere

fermentazioni stabili e adatte alla produzione di etanolo. Sono state apportate modifiche alle linee guida Chi.Bio al fine di migliorarne le prestazioni.

- *Come può essere caratterizzata la curva di production rate del ceppo etanogenico non flocculante W105?*

Il lavoro si è prima concentrato sulla caratterizzazione del comportamento fermentativo del ceppo etanogenico non flocculante W105, mediante fermentazioni in continua in modalità turbidostato al fine di trovare le condizioni ottimali di lavoro. Si è caratterizzato il *production rate* del ceppo grazie ad esperimenti in differenti fasi di crescita. Il fine ultimo di questa analisi è costruire il riferimento sperimentale per valutare gli effetti dell'introduzione del fenotipo flocculante.

- *Come può essere caratterizzata la curva di production rate del ceppo etanogenico flocculante W105-Lys10?*

Si è poi effettuato uno studio di fermentazione del ceppo etanogenico flocculante W105-Lys10 ottenuto mediante trasformazione con un plasmide contenente il gene responsabile della flocculazione. L'obiettivo è, attraverso fermentazioni in continua in modalità chemostato, valutare se l'impiego di un ceppo flocculante garantisce un aumento della produttività del sistema e rappresenta una strategia efficace per l'intensificazione delle fermentazioni continue destinate alla produzione di bioetanolo.

Capitolo 2

Metodi sperimentali

In questo capitolo sono descritti i ceppi etanologeni utilizzati nel presente lavoro (Sezione 2.1), illustrando le modifiche effettuate per renderli flocculanti (Sezione 2.1.1 e Sezione 2.1.1.1) attraverso il protocollo di trasformazione (Sezione 2.1.2). Si passa poi alla descrizione della preparazione dei terreni di coltura, degli induttori e degli antibiotici utilizzati (Sezione 2.2). Si procede con la caratterizzazione del metodo di analisi dei prodotti di fermentazione attraverso HPLC (Sezione 2.3). Si descrive il lettore di micropiastre utilizzato durante i test di sedimentazione per la misura della densità ottica (Sezione 2.4). Infine, si termina con un'accurata descrizione della piattaforma di bioreattori sfruttata nel presente lavoro con il relativo protocollo di utilizzo (Sezione 2.5).

2.1 Descrizione dei ceppi etanologeni

Come introdotto in Sezione 1.2.3, in questo lavoro sono stati impiegati batteri di *E. coli* derivati da ceppo W [8,10]. Il ceppo parentale è stato sottoposto ad ingegnerizzazione mediante l'eliminazione di tre *pathways* metaboliche corrispondenti ai geni *frdAB* (fumarato reduttasi), *ldhA* (lattato deidrogenasi) e *pflB* (piruvato formiato liasi) (**Figura 2.1**). Tali modifiche metaboliche introdotte riducono la formazione di metaboliti secondari e convogliano il piruvato verso la sintesi di etanolo.

Un'ulteriore modifica introdotta è stata integrare nel cromosoma del ceppo W un operone etanologeno sintetico costituito dai geni *pdc* e *adhB* di *Zymomonas mobilis*, ottenendo il ceppo W105. Il primo di questi due geni, espressi naturalmente nel batterio *Zymomonas mobilis* [24], codifica per la piruvato decarbossilasi e il secondo per l'alcol deidrogenasi II. Questi due enzimi catalizzano la conversione del piruvato in etanolo attraverso un *pathway* a due stati, con il rilascio di anidride carbonica e rigenerazione di NAD^+ . L'operone è stato posto sotto il controllo del promotore costitutivo P23J105, garantendone un'espressione costante. Questo aumenta la stabilità genetica e favorisce l'impiego del ceppo in processi fermentativi prolungati.

L'introduzione del sistema di flocculazione sintetica in ceppi etanologeni di *E. coli* [23] consente di valutare l'impatto dell'aggregazione cellulare sulle prestazioni fermentative e sull'applicabilità in colture continue [22], tema approfondito nei paragrafi successivi.

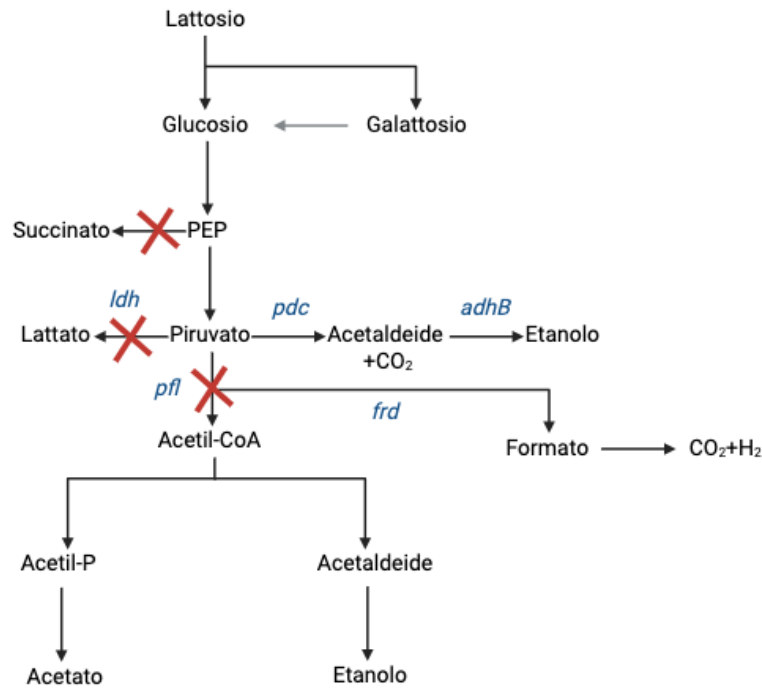


Figura 2.1: Pathway fermentativo di *E. coli* modificato. Immagine creata con BioRender.

2.1.1 Flocculazione

La flocculazione è un meccanismo biologico per cui le cellule aggregano a formare biomasse che sedimentano, note come fiocchi (*flocs*). Questo processo può essere spontaneo o indotto e ha diverse applicazioni, anche industriali. Il meccanismo alla base della flocculazione naturale consiste nella neutralizzazione delle cariche di superficie che riduce la repulsione elettrostatica e di conseguenza promuove l'adesione cellulare. La flocculazione è un processo che non richiede energia in *input* (auto-immobilizzazione) e viene sfruttato in reattori ad alta intensità per aumentare l'efficienza dei processi [24]. Esistono vari microrganismi che flocculano naturalmente: batteri (es. *Zoogloea ramigera* [25], *Bacillus subtilis* [26]), lieviti (es. *Saccharomyces cerevisiae* [27]), funghi filamentosi (es. *Aspergillus niger* [28]) e microalghe (es. *Chlorella vulgaris* [29]).

La flocculazione ha particolare rilevanza nella fermentazione microbica in particolare in caso di bioreattori che lavorano ad alta densità cellulare. La capacità di indurre o aumentare il fenomeno di aggregazione cellulare ha un impatto diretto sulla raccolta della biomassa e, nella sua totalità, il processo risulta più economico in quanto non sono necessarie operazioni di filtraggio o centrifugazione [25]. Purtroppo, però la maggior parte dei batteri non flocculano naturalmente. In particolare, è di nostro interesse il ceppo etanogenico di *E. coli* il quale, però rimane naturalmente sospeso nella coltura a causa dell'assenza di strutture che ne promuovono l'aggregazione.

È di interesse, quindi, implementare all'interno del ceppo W105 un sistema di flocculazione sintetico [24] al fine di studiarne i vantaggi che questo può portare in processi fermentativi in continua.

2.1.1.1 Flocculazione ingegnerizzata in *E. coli* e sistema Lys10

Per introdurre la flocculazione in organismi che non possiedono intrinsecamente questo meccanismo è necessario dotare le cellule di un sistema sintetico capace di esporre proteine funzionali sulla superficie cellulare. Nel caso di *E. coli*, una delle strategie più efficaci consiste nell'impiego di sistemi di *surface display* basati su autotrasportatori di tipo V, i quali consentono il trasporto e l'ancoraggio di proteine eterologhe sulla membrana esterna esposte verso l'ambiente extracellulare. Nel presente lavoro è utilizzato un sistema di *surface display* basato sull'autotrasportatore EhaA, ingegnerizzato per esporre sulla superficie cellulare un *Elastin-Like Polypeptide* (Sezione 1.3.2). Gli ELPs sono costituiti dalla ripetizione del motivo pentapeptidico Val-Pro-Gly-X-Gly (*repeats* VPGXG), dove X può essere sostituito con differenti aminoacidi per modificarne le proprietà chimico-fisiche. Nel costrutto utilizzato in questo lavoro, denominato Lys10, l'ELP è stato progettato introducendo dieci residui di lisina distribuiti lungo la sequenza. La presenza di questo aminoacido aumenta la carica positiva dell'ELP e modifica le interazioni tra le catene esposte sulla superficie di cellule adiacenti. L'elevata densità di ELP sulla membrana esterna favorisce le interazioni tra cellule, promuovendo la formazione di aggregati macroscopici stabili, e questo conferisce al ceppo il caratteristico fenotipo flocculante. L'espressione del sistema EhaA-ELP-Lys10 (**Figura 2.2**) è regolata mediante un circuito genetico inducibile basato sul *quorum sensing*: la trascrizione del costrutto viene attivata dall'aggiunta dell'induttore N-(3-

ossoesanoil)-L-omoserina lattone (HSL) che induce l'espressione di ELP sulla superficie cellulare (**Figura 2.3**). Questo approccio consente di controllare l'insorgenza della flocculazione evitando l'aggregazione durante le prime fasi di crescita.

L'utilizzo di questo sistema permette di ottenere una forma di auto-immobilizzazione della biomassa senza ricorrere a supporti esterni, risultando particolarmente promettente in processi fermentativi continui, dove l'elevata ritenzione cellulare rappresenta un requisito apprezzabile [28].

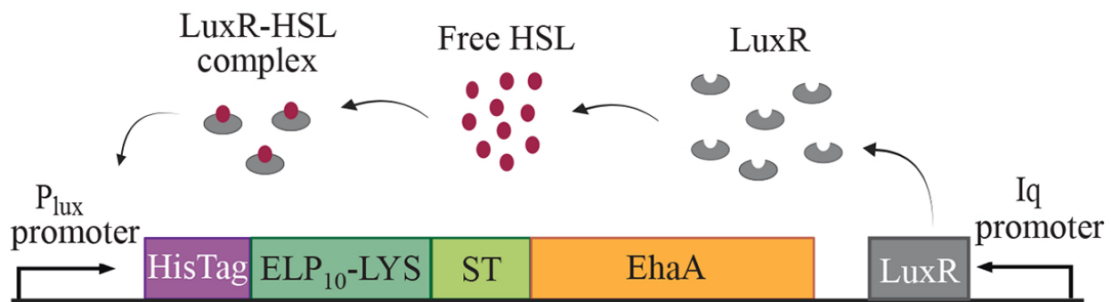


Figura 2.2: Circuito genetico del sistema EhaA-ELP-Lys10, da [22].

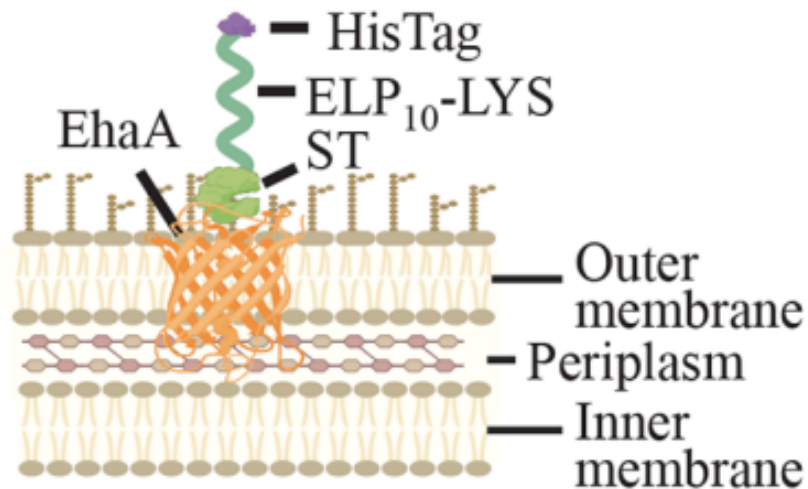


Figura 2.3: Sistema EhaA-ELP-Lys10, da [22].

2.1.2 Protocollo di trasformazione batterica

Il protocollo di trasformazione batterica permette l'incorporazione di DNA plasmidico all'interno di un microrganismo. In questo caso, come precedentemente discusso, si vuole implementare la flocculazione, fenotipo contenuto del plasmide chiamato Lys10, all'interno del ceppo di *E. coli* W105 reso competente, quindi in grado di inglobare DNA esogeno. La procedura consiste nell'unire le cellule batteriche competenti (W105) al DNA plasmidico (Lys10) e incubare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine, si procede con uno shock termico a 42°C per 1 minuto e poi ancora in ghiaccio per 3 minuti. Successivamente viene aggiunto 1mL di LB liquido preriscaldato a 37°C e i batteri vengono posti a crescere per 1 ora a 37°C a 220 rpm per permettere loro di esprimere la resistenza antibiotica. Come ultimo step la coltura viene centrifugata a 10000giri/min per separare il pellet costituito da batteri (solidi) dal surnatante (liquido). A questo punto si rimuove l'80% del surnatante e il pellet viene risospeso nel volume restante. Ciò che ne rimane viene piastrato su piastre Petri con lo stesso terreno, supplementato con antibiotico e lasciato crescere in incubatore statico *overnight*.

2.2 Terreni di coltura, induttori ed antibiotici

Come principale brodo di coltura è stato utilizzato il terreno Luria-Bertani (LB), supplementato con 40g/L di lattosio. La sua ricetta prevede la preparazione di un terreno LB standard con ridotto contenuto di acqua (chiamato LB POV) per fare in modo che i suoi componenti risultino ulteriormente concentrati. Di seguito si riportano i reagenti necessari a preparare 1L di soluzione:

- 10g bacto-trytone;
- 5g NaCl;
- 5g estratto di lievito;
- 750mL acqua deionizzata (MilliQ).

LB POV è quindi arricchito con lattosio da uno stock concentrato 200g/L e con buffer fosfato.

Per preparare 500mL di lattosio 200g/L sono necessari:

- 82,5g lattosio;
- 400mL acqua deionizzata (MilliQ).

La soluzione viene posizionata su una piastra riscaldata all'interno di una beuta e mescolata grazie ad uno *stirrer* per permettere la completa dissoluzione della polvere. Una volta diventata trasparente, la soluzione viene portata a volume (a 500mL). Successivamente si filtra la soluzione in sterilità utilizzando una membrana filtrante da 0.2 μ m.

Come ultimo componente del terreno si preparano componenti del buffer fosfato, fondamentali per stabilizzare il pH della coltura. Di seguito si riportano i reagenti necessari per preparare 100mL di ciascuno di loro:

- Na_2HPO_4 :
 - 14,196g di Na_2HPO_4 ;
 - 80mL acqua deionizzata (MilliQ).
- NaH_2PO_4 :
 - 15,601g di NaH_2PO_4 ;
 - 80mL acqua deionizzata (MilliQ).

Entrambe le soluzioni dopo essere state disciolte grazie a *stirring* sono portate a volume (a 100mL) ed infine filtrate per renderle sterili.

Si procede poi ad assemblare 1L di terreno di coltura che sarà utilizzato nei bioreattori Chi.Bio, in questo modo:

- 750mL di LB POV;
- 100mL di Lac 200g/L;
- 50mL di buffer fosfato:
 - 28,85mL Na_2HPO_4 ;
 - 21,15mL NaH_2PO_4 .

Nel momento in cui si utilizza il ceppo etanogenico flocculante W105-Lys10 è necessario aggiungere al terreno due ulteriori supplementi, l'antibiotico, Kanamicina, e l'induttore, HSL.

Kanamicina (Kana) è comunemente utilizzato in biologia molecolare per selezionare i batteri che contengono al loro interno i plasmidi con la resistenza a questo specifico antibiotico. Kana è conservato in *stock* a -20°C con concentrazione 50 µg/mL.

HSL è una piccola molecola segnale che regola l'espressione genica in batteri come *Vibrio fischeri*. Nel presente studio, HSL è utilizzato per modulare l'attività trascrizionale del promotore pLux in presenza del regolatore LuxR. HSL è disciolto in MilliQ con una concentrazione 2mM, filtrato con membrane da 0.2µm e conservato a -20°C, in tesi è utilizzato con concentrazione 2nM.

2.3 Analisi dei prodotti di fermentazione

Una volta effettuato il campionamento da coltura batterica, questo viene filtrato in sterilità con filtro da 0.2µm. Per identificare i prodotti presenti all'interno del campione si fa uso di *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), una tecnica spesso utilizzata per quantificare metaboliti. L'analisi è stata eseguita utilizzando il sistema *Jasco LC-4000 Series* con rilevatore di indice di rifrattarietà (RID-10°, Shimadzu), particolarmente adatto per rilevare composti che non assorbono gli UV, come l'etanolo, gli acidi organici e gli zuccheri. La separazione cromatografica è stata fatta su *SUPELCO C-610H ion-exclusion column* (30cm x 7.8mm, Sigma-Aldrich) mantenuta a temperatura costante di 30°C per assicurarsi la stabilità del tempo di ritenzione. La fase mobile è costituita da acqua deionizzata con 0.1% di acido fosforico, rilasciata con un flusso costante di 0.5mL/min sotto condizioni isocratiche. La quantificazione di etanolo, glucosio, lattosio, galattosio, acetato e succinato è eseguita grazie ad una curva di calibrazione esterna.

L'*output* fornito dall'analisi HPLC consiste in un cromatogramma in cui ogni elemento rappresenta un picco distinto ad un determinato tempo di ritenzione. I tempi caratteristici di ritenzione sono riportati in **Tabella 2.1**.

Composto	Tempo di ritenzione [min]
Lattosio	11.3
Glucosio	13.1
Galattosio	14.2
Acido lattico	18.0

Acido acetico	21.0
Etanolo	27.2

Tabella 2.1: Tempi di ritenzione caratteristici del metodo HPLC utilizzato.

2.4 Misura di densità ottica con lettore di micropiastre

Per effettuare misure di densità ottiche nel caso di test di sedimentazione è stato utilizzato il lettore di micropiastre *Tecan Infinite F2000Pro*. Questo strumento fornisce misurazioni sia in modalità statica sia dinamica, nell'ultimo caso controllando le condizioni delle colture (temperatura ed agitazione). La grandezza di interesse per questo lavoro di tesi è la densità ottica (o assorbanza) che permette di calcolare una stima del numero di cellule presenti in un pozzetto della piastra in base all'attenuazione del raggio incidente ad una lunghezza d'onda di 600nm. Il calcolo dell'assorbanza si basa sulla seguente legge di Lambert-Beer:

$$OD_{600} = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Con:

- I_0 l'intensità della radiazione incidente (con $\lambda = 600nm$).
- I l'intensità della radiazione trasmessa in un percorso di una lunghezza nota, nel presente caso l'altezza del pozzetto della micropiastra ed in Chi.Bio il diametro della *vial*.

Di questo strumento è stata effettuata la calibrazione del *detector* di OD per correggerne la saturazione ed è riportata in Appendice B.

2.5 Piattaforma di bioreattori Chi.Bio

Si vogliono utilizzare bioreattori in piccola scala in quanto permettono di ottimizzare processi di fermentazione scalando e parallelizzando più esperimenti al fine di garantire un basso dispendio di risorse. La piattaforma Chi.Bio, utilizzata nel presente lavoro,

permette di effettuare esperimenti sia in modalità turbidostato sia in modalità chemostato. Il codice *open source* che governa la piattaforma di bioreattori è stato riadattato al fine di soddisfare le esigenze sperimentali richieste. Le modifiche effettuate sono descritte in Sezione 3.1.

La piattaforma Chi.Bio [30] (**Figura 2.4**) fornisce alla coltura riscaldamento, agitazione e garantisce misurazioni di densità ottica e di fluorescenza. Lo strumento è costituito dalle seguenti componenti fondamentali:

- Reattore contenente la *vial* con all'interno la coltura batterica. Il reattore presenta la sensoristica deputata alla rilevazione *real time* di parametri della coltura come temperatura e densità ottica. Alla base del bioreattore è presente un piatto magnetico che permette lo *stirring* al fine di garantire la corretta ossigenazione della coltura.
- Sistema di pompe peristaltiche, di cui una che fornisce terreno fresco in *input* alla coltura e l'altra che preleva terreno esausto in *output*. Queste pompe funzionano con tubi in silicone con diametro interno/esterno di 2.5/4.5mm, come da specifiche tecniche [30].
- *Micro-controller* che permette di comandare fino ad 8 bioreattori ed è collegato ad un computer.

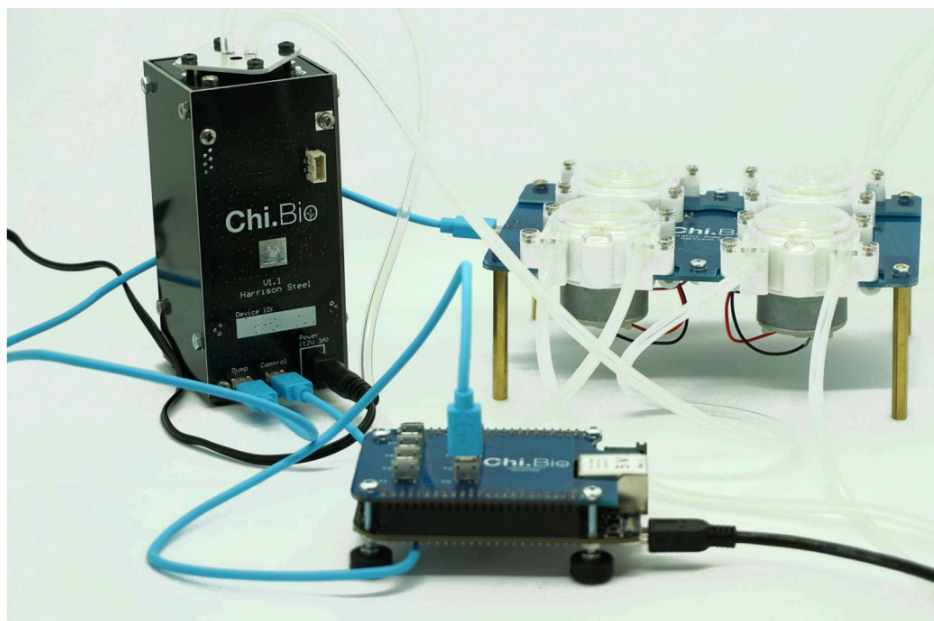


Figura 2.4: Piattaforma Chi.Bio con connessioni tra le componenti, da [30].

2.5.1 Protocollo di utilizzo della piattaforma Chi.Bio

La piattaforma Chi.Bio richiede un meticoloso protocollo di utilizzo, in particolare per quanto riguarda le accortezze necessarie per il mantenimento della sterilità di ciò che viene a contatto con la coltura e per permettere il corretto funzionamento delle pompe. Rispetto a quanto riportato da linee guida Chi.Bio [30], nel corso degli esperimenti sono state apportate modifiche. Di seguito la spiegazione dei processi eseguiti per permettere un corretto funzionamento della piattaforma ed una buona riuscita dell'esperimento.

Si procede con la connessione *hardware* per poi passare all'avvio del *software* come da [30] e alla preparazione del corretto *setup* sperimentale descritto di seguito.

Inizialmente si esegue la sterilizzazione di tutte le componenti che richiede i seguenti passaggi:

1. Autoclavare *stirrer* (da 1cm), *vial*, tappi (fabbricati in materiale autoclavabile PA12 dal Proto-Lab, DICAr, Università di Pavia) e bottiglie con appositi pescanti adatti ad incastrarsi con gli adattatori montati sui tubi delle pompe peristaltiche.
2. Far passare una soluzione di MilliQ e candeggina al 50% all'interno dei tubi, sia di *input* sia di *output* e lasciare la soluzione all'interno dei tubi almeno un'ora. Questo tipo di pulizia risulta fondamentale per uccidere tutti i batteri che possono essere rimasti all'interno dei tubi dagli esperimenti precedenti.
3. Risciacquare entrambi i tubi con abbondante MilliQ filtrata, il tutto in sterilità sotto fiamma. Questo viene fatto per risciacquare i tubi da eventuali residui di candeggina che potrebbero intossicare i batteri utilizzati per il nuovo esperimento.
4. Sterilizzare con alcol le estremità dei tubi che saranno a contatto con la *vial* e la bottiglia di terreno e asciugarli per evitare sgocciolamenti all'interno di essi.

Terminato il processo di sterilizzazione si passa alla preparazione della *vial* che conterrà la coltura:

1. Inserire 19.6mL di terreno fresco assemblato come da Sezione 2.2 all'interno di una *vial* precedentemente autoclavata.
2. Aggiungere 400 μ L di coltura cresciuta *overnight* come da Appendice A.
3. Inserire uno *stirrer* sterile.

4. Chiudere la *vial* con un apposito tappo Chi.Bio. Nel momento in cui si implementano fermentazioni in modalità chemostato (Sezione 3.1.2), sfruttando il ceppo flocculante, è necessario utilizzare specifici tappi allungati opportunamente grazie all'utilizzo di tubi in silicone (diametro interno/esterno 3/5mm). Questo procedimento è reso necessario in quanto, i tappi progettati originariamente, non permettono di ricambiare il quantitativo di coltura adeguato ad effettuare una fermentazione in modalità chemostato.

Preparata la *vial* e la bottiglia contenente il terreno che andrà in *input* alla coltura si può procedere a montare il *setup* sperimentale completo (**Figura 2.6**):

1. Avvitare l'estremità del tubo con l'adattatore di *input* con il pescante presente all'interno della bottiglia ed attivare la pompa di *input* in modo da avere il tubo di afflusso pieno di terreno. Si avvia sempre l'esperimento con il tubo in *input* pieno in modo da garantire che il terreno arrivi subito alla coltura nel momento di attivazione della pompa. La bottiglia è posizionata sullo stesso piano delle pompe e del reattore.
2. Collegare la *vial* nel seguente modo: l'estremità libera del tubo in *input* si inserisce nel beccuccio contrassegnato dal numero 1, il tubo di *output* si inserisce nel beccuccio contrassegnato da "Out" ed il terzo beccuccio va inserito in un ulteriore tubo, non collegato alle pompe, la cui altra estremità è posizionata all'interno di un contenitore di acqua coperto con *parafilm* che fungerà da condensatore (**Figura 2.5**). Come ultimo passaggio, posizionare l'estremità finale del tubo di *output* in un contenitore di *waste*, anch'esso chiuso con *parafilm*. Il *waste* è posizionato sullo stesso piano delle pompe e del reattore, mentre il condensatore su un livello inferiore, più basso di almeno 50cm.

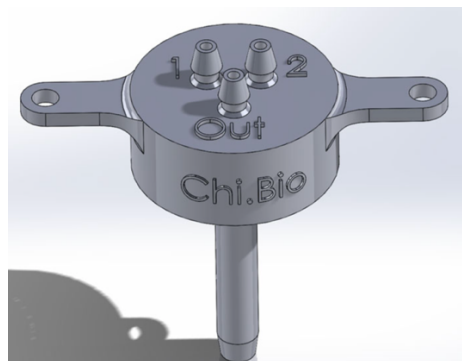


Figura 2.5: Struttura del tappo della *vial* di Chi.Bio.

3. Incastrare la *vial* all'interno del reattore.



Figura 2.6: Setup sperimentale Chi.Bio montato.

Il *setup* sperimentale è pronto e non resta che avviare l'esperimento da *software* (**Figura 2.7**). Di seguito si differenzia l'attivazione in base alle due modalità di controllo della coltura discusse in Sezione 3.1.1 e 3.1.2.

- Modalità turbidostato:
 1. Impostare l' OD_{target} al valore che si vuole raggiungere e mantenere.
 2. Impostare il valore del *blank*, ovvero la misura di OD del terreno senza batteri.
 3. Impostare lo *stirring* ad un valore di 0,7. Le velocità possono variare in un range da 0 a 1, il valore selezionato risulta ottimale da esperimenti passati in quanto genera un vortice che interessa la totalità della coltura da 20mL con cui si sta lavorando.
 4. Cliccare *START*.

5. Cliccare *Switch* e *Dither OD* che procederà al controllo a ZigZag dell'OD della coltura.
- Modalità chemostato:
 1. Impostare il valore del *blank*, ovvero la misura di OD del terreno senza batteri.
 2. Impostare come *Custom Program*, digitare nel campo *status* “-1” per partire dalla crescita libera e cliccare *Switch*.
 3. Cliccare *START*.

Per terminare gli esperimenti è sufficiente cliccare “STOP”.

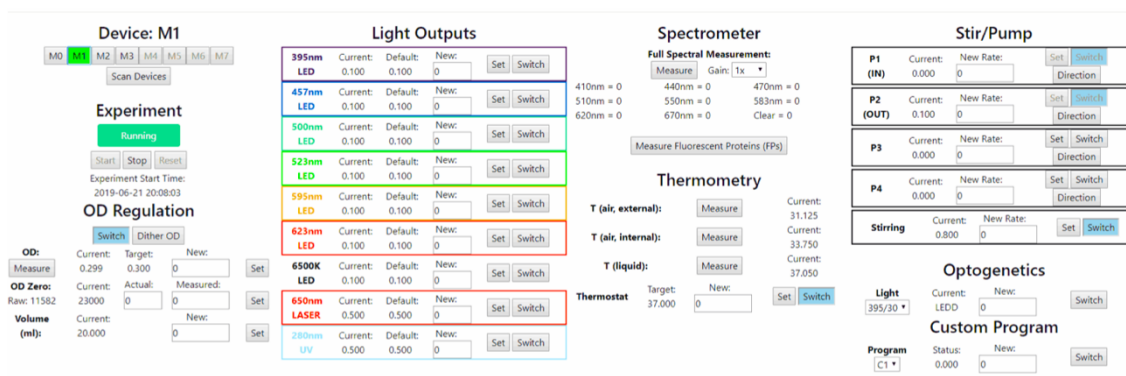


Figura 2.7: Interfaccia grafica di Chi.Bio da cui si avviano gli esperimenti.

Si sono effettuati campionamenti in sterilità ogni 24 ore per almeno tre giorni ($T_0 = 0h$, $T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$). I campioni sono filtrati e poi analizzati con HPLC (Sezione 2.3).

I file restituiti in *output* dal *software* (per la descrizione del protocollo di *download* dei dati si fa riferimento alle linee guida [30]) sono processati attraverso uno *script* MATLAB scritto per ripulire i dati e ricavare i parametri di interesse per permettere di effettuare analisi approfondite, come discusso in Sezione 3.2.

Capitolo 3

Metodi di analisi dei dati

Questo capitolo ha lo scopo di introdurre e spiegare i metodi di analisi dei dati utilizzati nel presente lavoro di tesi. Si inizia con una descrizione delle modalità di utilizzo della piattaforma di bioreattori su piccola scala Chi.Bio (Sezione 3.1) per poi passare ad un'analisi più specifica delle due modalità: turbidostato (Sezione 3.1.1) e chemostato (Sezione 3.1.2) e le loro implementazioni in codice sorgente. Si procede poi con una descrizione accurata dell'elaborazione MATLAB dei dati restituiti da Chi.Bio e HPLC e l'analisi di parametri di interesse tramite foglio di calcolo *Excel* (Sezione 3.2) con particolare attenzione alle quattro metodologie implementate per il calcolo del *dilution rate* delle colture (Sezione 3.2.1).

3.1 Modalità di utilizzo dei reattori

La piattaforma Chi.Bio permette l'utilizzo dei reattori in differenti modalità di controllo di crescita della coltura. Può essere applicato un controllo di tipo turbidostato (Sezione 3.1.1) o di tipo chemostato (Sezione 3.1.2). Nel presente lavoro di tesi sono state implementate colture con entrambe le modalità per trattare diversamente i due ceppi in esame.

3.1.1 Chi.Bio in modalità turbidostato

L'implementazione di fermentazioni in coltura continua è possibile utilizzando la piattaforma Chi.Bio in modalità turbidostato (**Figura 3.1 a destra**). Questa tipologia di utilizzo prevede di imporre un controllo sulla densità ottica cellulare (OD) affinché venga mantenuta circa costante. La logica alla base è quella di un sistema ad anello chiuso: viene definito un valore *target* di OD da mantenere costante. I sensori della piattaforma, consentendo la misura in tempo reale dell'assorbanza, monitorano continuamente la densità della coltura. Quando l'OD misurato supera il valore *target*, il sistema attiva la pompa di *input*, che agisce come elemento attuatore, introducendo terreno fresco e

diluendo così la coltura fino a riportarla al valore desiderato. In questo modo è possibile fissare la coltura ad un OD corrispondente ad una specifica fase di crescita cellulare.

Tale strategia di controllo è implementata nel codice *open source* della piattaforma secondo due modalità principali. La prima si basa su un controllore PII (*Proportional–Integral–Integral*), in cui il termine proporzionale reagisce all'errore istantaneo tra l' OD_{target} e l' $OD_{misurato}$, mentre il primo termine integrale tiene conto dell'accumulo dell'errore nel tempo. Il secondo termine integrale, caratterizzato da un guadagno superiore rispetto al primo, consente invece di compensare eventuali fluttuazioni nella portata della pompa di *input*.

La seconda modalità, denominata *ZigZag* o *Dither OD*, modifica temporaneamente la logica di regolazione dell'OD, permettendo alla coltura di oscillare attorno al valore *target*. La coltura viene lasciata crescere fino al raggiungimento di un limite superiore di OD, dopodiché viene rapidamente diluita fino a un limite inferiore. La ripetizione di questi cicli genera un profilo di OD caratteristico a *ZigZag*, che consente di stimare la velocità di crescita cellulare attraverso l'analisi della variazione logaritmica dell'OD durante le fasi di crescita.

Poiché nel presente lavoro è di particolare interesse stimare la velocità di crescita dei due ceppi etanogenici impiegati, W105 e W105-Lys10, il turbidostato viene utilizzato in modalità *ZigZag*. In condizioni standard, la finestra di oscillazione dell'OD è definita come $OD_{target} \pm 0,04$. Nel presente caso di studio, tale intervallo è stato invece ampliato a $OD_{target} \pm 1$. Un'ampiezza maggiore dell'oscillazione consente di prolungare il tempo di permanenza del terreno di coltura all'interno del reattore prima della sua sostituzione. In questo modo, le cellule dispongono di un tempo maggiore per metabolizzare il substrato e produrre etanolo, favorendo potenzialmente un incremento della produttività del sistema.

3.1.2 Chi.Bio in modalità chemostato

Un chemostato (**Figura 3.1 a sinistra**) è un sistema operato in anello aperto, nel quale la portata di alimentazione e, di conseguenza, il tasso di diluizione vengono definiti a priori, senza utilizzare la misura dell'OD come *feedback* per modulare l'azione di controllo. In

questo modo, viene predefinito un pattern di diluizioni volto a mantenere la coltura in un intervallo prossimo all' OD_{target} .

Nel caso in esame si vogliono valutare le proprietà fermentative del ceppo flocculante e confrontarle con quello non flocculante, per questo si è implementato un programma *custom* all'interno dell'app che gestisce Chi.Bio. L'obiettivo è creare una macchina a stati che permetta oltre che la fermentazione, anche la sedimentazione del ceppo W105-Lys10 e l'arricchimento della coltura.

In seguito a test di sedimentazione sia degli eluati sia del sedimento (protocollo riportato in Appendice D e risultati in Sezione 4.1), si è constatato che la coltura ha una notevole diminuzione di densità cellulare superficiale dopo circa 10 minuti in cui viene lasciata ferma. Di conseguenza, dopo questi test, si è progettata la seguente macchina a stati:

- *STATUS -1*: crescita libera. Si sono attuati due differenti protocolli, il primo prevedeva una crescita *batch* di circa 12 ore con *stirring ON*, dopo le quali la coltura raggiunge un OD stabile. Il secondo, implementato dopo aver visto i risultati dei primi esperimenti, prevedeva 24 ore di crescita con un *pattern* di attivazione e spegnimento dello *stirring* uguale a quello corrispondente allo STATUS 1 e 2. Il secondo protocollo è stato implementato per favorire ritenzione cellulare e la formazione del *biofilm*, come descritto successivamente nei risultati.
- *STATUS 1*: crescita libera per 50 minuti. Dopo la crescita libera si attiva l'effettiva macchina a stati, che si basa sull'alternarsi dello STATUS 1 e 2 fino ad interruzione della fermentazione. Lo STATUS 1 prevede una crescita libera con *stirring ON* per 50 minuti.
- *STATUS 2*: coltura ferma per 10 minuti. Si attivano i 10 minuti necessari alla coltura per sedimentare, quindi *stirring OFF*, fondamentale per arricchire il terreno sul fondo della *vial*. A questo punto può avvenire il ricambio di terreno, reso possibile dall'allungamento del tappo della *vial* da un tubo in silicone:
 - accensione della pompa di *output*: si attiva la pompa di *output* con un *rate* pari a 1 per eliminare terreno fino a livello del limite del pescante, precedentemente calibrato per avere il *dilution rate* richiesto.
 - accensione della pompa di *input*: come ultimo passaggio si attiva la pompa di *input*, anch'essa precedentemente calibrata per reimmettere la stessa

quantità di liquido esportato, in modo tale da mantenere il volume della coltura costante a 20mL.

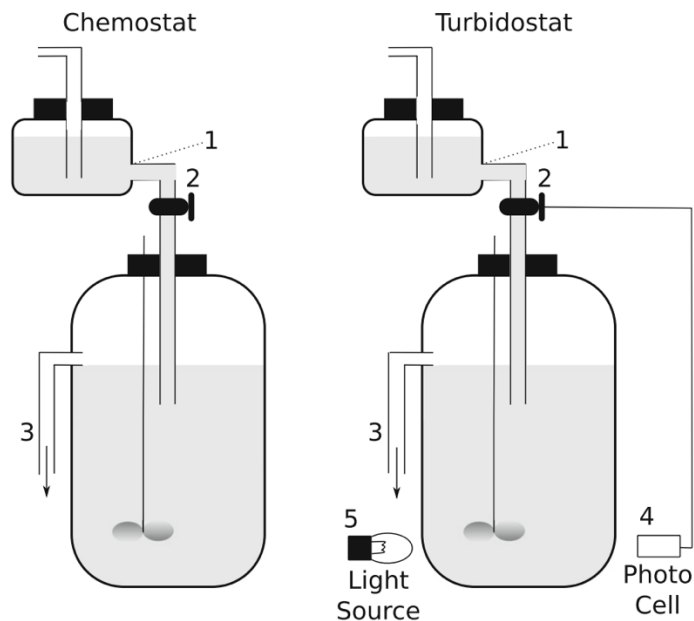


Figura 3.1: Modalità di funzionamento di bioreattori, a sinistra chemostato e a destra turbidostato.

3.2 Elaborazione dei dati restituiti da Chi.Bio

Ogni esperimento avviato su piattaforma Chi.Bio restituisce una coppia di *files*:

- *File .txt*: file contenente i parametri di configurazione dell'esperimento. Verrà utilizzato in MATLAB per assegnare il significato corretto alla tabella di misurazioni restituita come *.csv*.
- *File .csv*: file che memorizza al suo interno i dati derivanti dalle misurazioni effettuate minuto per minuto ed i parametri impostati da utente. È riportata la tabella che associa ad ogni colonna memorizzata un significato (**Tabella 3.1**). Oltre a queste sono state aggiunte tre colonne, di cui una di particolare interesse, in quanto memorizza il *growth rate* calcolato internamente da codice sorgente di Chi.Bio (Sezione 3.2.1).

Column	Parameter
1	Experiment time (s)
2	Measured OD
3	Turbidostat OD setpoint
4	OD zero setpoint
5	Thermostat setpoint
6	Heating rate
7	Internal air temperature (C)
8	External air temperature (C)
9	Media temperature (C)
10	Optogenetic actuation intensity
11	Pump 1 rate
12	Pump 2 rate
13	Pump 3 rate
14	Pump 4 rate
15	Volume
16	Stirring rate
17	395nm LED set-point
18	457nm LED set-point
19	500nm LED set-point
20	523nm LED set-point
21	595nm LED set-point
22	623nm LED set-point
23	6500K LED set-point
24	Laser set-point
25	UV LED intensity
26	Fluorescent protein 1 baseband
27	Fluorescent protein 1 emission band 1
28	Fluorescent protein 1 emission band 2
29	Fluorescent protein 2 baseband
30	Fluorescent protein 2 emission band 1
31	Fluorescent protein 2 emission band 2
32	Fluorescent protein 3 baseband
33	Fluorescent protein 3 emission band 1
34	Fluorescent protein 3 emission band 2
35	Custom program parameter 1
36	Custom program parameter 2
37	Custom program integrator

Tabella 3.1: Dati memorizzati in un esperimento Chi.Bio.

I dati di ogni esperimento sono elaborati secondo i seguenti passaggi:

- Eliminazione dei *record* corrispondenti all'accensione della pompa di *input* ($P_1 > 0$) oppure in cui il *growth rate* calcolato in automatico da codice risulta negativo ($GR < 0$), quindi fisicamente impossibile.
- Ricalcolo dell'OD grazie alla calibrazione del detector di Chi.Bio effettuata come da formula in Appendice B, al fine di avere le misure di OD_{reale} .
- Calcolo della produttività volumetrica $[\frac{g}{L \cdot h}]$ o *production rate* con la formula riportata di seguito:

$$Prod_{vol} = [EtOH]_{ss} \cdot Dilution_{rate}$$

Con:

- $[EtOH]_{ss}$: concentrazione di etanolo allo *steady state* (valore medio dei campionamenti a $T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$), valori restituiti da analisi HPLC.
- $Dilution_{rate}$: fattore di diluizione della coltura tra i due istanti di campionamento T_1 e T_2 , coincidente con il *growth rate* cellulare (Sezione 3.2.1).

Questa misura è particolarmente informativa in quanto permette di quantificare la velocità con cui viene prodotto etanolo.

- Calcolo della resa percentuale come da [9], considerando la stechiometria della conversione lattosio-etanolo e assumendo l'assenza di altre molecole fermentabili ad eccezione del lattosio:

$$Resa\% = 100 \cdot \frac{[EtOH]_{ss}}{0,538 \cdot ([Lac]_{T_0} - [Lac]_{T_2})}$$

Con:

- $[EtOH]_{ss}$: concentrazione di etanolo allo *steady state* (valore medio dei campionamenti a $T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$), restituiti da analisi HPLC.
- $[Lac]_{T_0}$: concentrazione di lattosio presente all'interno del terreno fresco utilizzato per implementare l'esperimento, restituito da analisi HPLC.
- $[Lac]_{T_2}$: concentrazione di lattosio presente all'interno del campione preso nel secondo istante di campionamento, prima al termine dell'esperimento, restituito da analisi HPLC.
- Calcolo del *dilution rate* cellulare, come riportato dettagliatamente di seguito (Sezione 3.2.1).

3.2.1 Metodi di calcolo del *dilution rate* cellulare

È di interesse analizzare il *dilution rate* cellulare (DR) nei vari esperimenti, ovvero la velocità di crescita della coltura, per poterli confrontare tra loro. L'unità di misura con cui viene riportato è sempre h^{-1} .

A questo scopo sono stati implementate quattro metodologie per calcolare il DR tra i due istanti di campionamento ($T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$):

- Metodo 1: analisi del peso del volume in *output*. In corrispondenza dell'istante di campionamento $T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$ si sono pesati i *waste* contenuti terreno esausto, dopo aver tarato la bilancia con il peso del contenitore. In questo modo si ricavano i volumi iniettati nella coltura V_1 e V_2 e con la seguente formula si calcola il *dilution rate*:

$$DR = \frac{V_2 - V_1}{V_{vial} \cdot (T_2 - T_1)}$$

Con:

- V_1 : volume presente nel *waste* all'istante $T_1 = 24h$.
- V_2 : volume presente nel *waste* all'istante $T_2 = 48h$.
- V_{vial} : volume della *vial*, mantenuto costante a 20mL.
- Metodo 2: media dei *growth rate* calcolati. Chi.Bio si propone di calcolare il *growth rate* all'interno del codice e lo riporta nel file .csv. In questo modo Chi.Bio lo calcola per ogni istante memorizzato, di conseguenza anche in corrispondenza dell'attivazione delle pompe, cioè nel momento di ricambio di terreno. Analizzando i *file* si è notato che, a causa di quanto descritto, in alcuni istanti i GR risultano negativi, di conseguenza si è deciso di ricalcolare il GR, nello stesso modo che viene effettuato da codice Chi.Bio, all'interno dello script MATLAB per poi poterne effettuare la media tra i due istanti di campionamento ($T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$):

$$dGR = \log(OD_i) - \log(OD_{i-1})$$

$$GR_i = 0.95 \cdot GR_{i-1} + 0.05 \cdot dGR$$

$$DR = \text{mean}(GR(T_1:T_2))$$

Con:

- OD_i : OD_{reale} all'istante i .
- OD_{i-1} : OD_{reale} all'istante $i-1$ (istante precedente).
- dGR : variazione di *growth rate* tra due istanti successivi.

- GR_i : il *growth rate* calcolato per l'i-esimo istante, pesando maggiormente il GR dell'istante precedente.
- Metodo 3: analisi dei picchi di OD. In questo caso si individuano i picchi superiori e inferiori di OD che corrispondono ai momenti appena prima e appena dopo il ricambio di terreno, per determinare di quanto la coltura è stata diluita. Successivamente si calcola il GR sempre tra i due istanti di campionamento ($T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$) in questo modo:

$$DR = \frac{\sum(\log\left(\frac{OD_{i-1}}{OD_i}\right) + (T_i - T_{i-1}) \cdot g_m)}{(T_2 - T_1)}$$

Con:

- OD_{i-1} : OD_{reale} all'istante i-1 (istante precedente).
- OD_i : OD_{reale} all'istante i.
- g_m : *growth rate* calcolato durante il tempo impiegato per effettuare le diluizioni, in quanto non istantanee, calcolato come media dei *growth rate* della fase di crescita precedente (dal picco minimo precedente al picco massimo considerato).
- Metodo 4: analisi dell'attività delle pompe. L'attività delle pompe è registrata da file in *output* attraverso due parametri, l'effettiva attivazione (1 se la pompa è *ON* 0 se è *OFF*) e il *rate* con cui viene attivata (compreso tra -1 e 1, corrisponde alla frazione di minuto in cui la pompa viene lasciata accesa). Si riporta di seguito la formula utilizzata per calcolare il DR tra i due istanti di campionamento ($T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$):

$$DR = \frac{Q_{pump} \cdot \sum(P_1(T_1:T_2))}{V_{vial} \cdot (T_2 - T_1)}$$

Con:

- Q_{pump} : portata volumetrica della pompa in *input*, per ogni pompa è stata valutata la portata effettiva.
- V_{vial} : volume della *vial*, mantenuto costante a 20mL
- P_1 : rate di attivazione della pompa in *input*.

Le quattro metodologie sono state valutate e al termine dell'analisi è stato scelto il Metodo 3, come riportato in modo più approfondito nella Sezione 4.2 dei Risultati.

Capitolo 4

Risultati

Nel seguente capitolo sono discussi i risultati ottenuti nel corso dell'intero lavoro sperimentale. Inizialmente viene presentata la valutazione preliminare dell'arricchimento della coltura flocculante mediante test di sedimentazione in provetta (Sezione 4.1). Successivamente vengono descritte le modifiche apportate al *setup* della piattaforma Chi.Bio rispetto alle linee guida di riferimento [30] (Sezione 4.2). Infine, vengono presentati i risultati relativi alla caratterizzazione del *production rate* del ceppo non flocculante W105 (Sezione 4.3) e del ceppo flocculante W105-Lys10 (Sezione 4.4) mediante colture continue in bioreattori Chi.Bio.

4.1 Valutazione dell'arricchimento della coltura tramite test di sedimentazione in provetta

Al fine di valutare preliminarmente la capacità del ceppo W105-Lys10 di aggregare e sedimentare la biomassa, sono stati effettuati test di sedimentazione in provetta con misure di densità ottica mediante il lettore di micropiastre *Tecan Infinite F200Pro*. Questa analisi ha permesso di verificare l'effettiva flocculazione del ceppo ingegnerizzato, indotto con HSL 2nM, e di valutare l'aumento della concentrazione cellulare nella frazione sedimentata in funzione del tempo di permanenza in condizioni statiche.

Determinare il tempo necessario affinché la biomassa sedimenti rappresenta un passaggio fondamentale per l'implementazione del sistema di flocculazione nella piattaforma Chi.Bio (Sezione 3.1.2). Tale parametro consente infatti di confermare la capacità di arricchimento della coltura sul fondo di una *vial* grazie al fenotipo flocculante, e definire un adeguato intervallo di spegnimento dell'agitazione, garantendo un tempo sufficiente alla sedimentazione dei batteri all'interno del programma *custom* sviluppato per la fermentazione del ceppo W105-Lys10. Per valutare la riproducibilità del fenomeno, i test di sedimentazione sono stati effettuati in triplicato seguendo il protocollo riportato in Appendice D.

Per ciascuna provetta sono state effettuate misure di densità ottica sia del surnatante, corrispondente alla frazione di coltura rimasta in sospensione, sia del *pellet*, corrispondente alla biomassa sedimentata in assenza di agitazione. In caso di flocculazione, l'atteso corrisponde ad una progressiva diminuzione della densità ottica del surnatante accompagnata da un aumento della densità ottica della frazione sedimentata.

I test sono stati condotti sia sul ceppo non flocculante W105, utilizzato per avere misure di controllo, sia sul ceppo flocculante W105-Lys10.

I campionamenti sono stati effettuati prima di posizionare la coltura in incubatore, dopo 5, 10 e 15 minuti di stazionamento a 37°. Per ogni provetta sono stati campionati i surnatanti, prelevando la parte superiore della coltura, e i *pellet*, prelevando la parte sedimentata dopo aver eliminato quasi completamente il surnatante.

In **Figura 4.1** sono riportate le curve di sedimentazione relative al ceppo W105. In questo caso, anche in condizioni statiche, non è attesa una significativa formazione di aggregati cellulari. I dati mostrano infatti l'assenza di un andamento sistematico delle misure di densità ottica, sia per il surnatante sia per il *pellet*, con variabilità tra le tre repliche sperimentali.

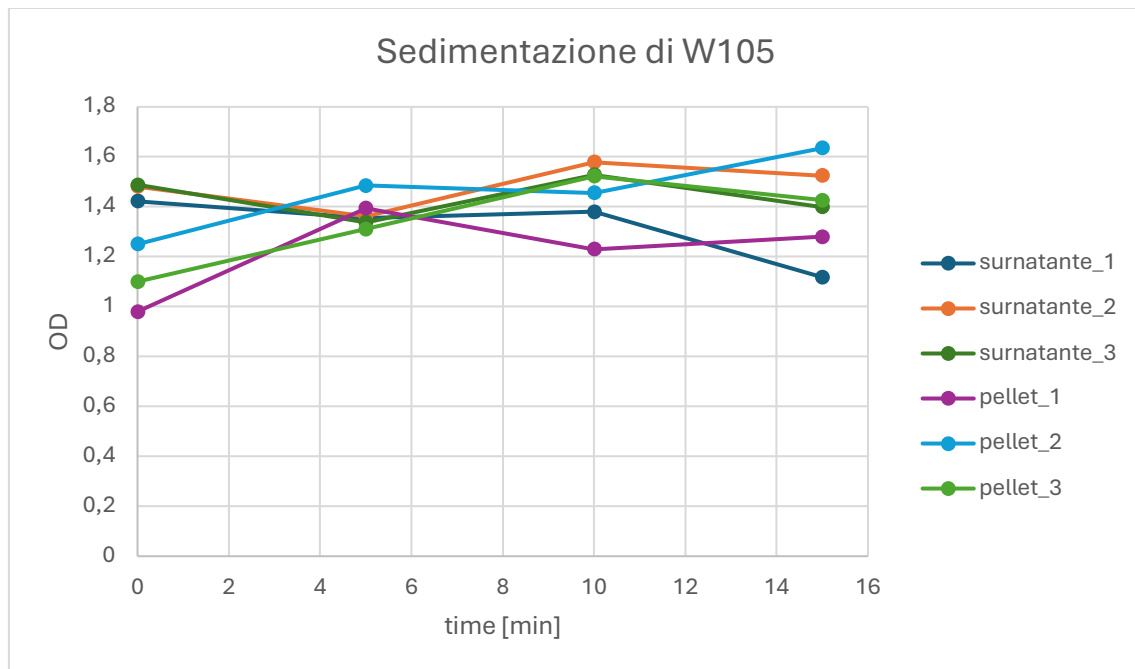


Figura 4.1: Variazione dell'OD nel tempo in test di sedimentazione del ceppo W105.

Per il ceppo W105-Lys10 si osserva un andamento più marcato delle misure di densità ottica nel tempo, sia del surnatante sia del *pellet* (**Figura 4.2**). In particolare, all'aumentare del tempo di stazionamento in incubatore statico della *vial* si osserva una progressiva variazione della densità ottica delle due frazioni, coerente con la sedimentazione della biomassa.

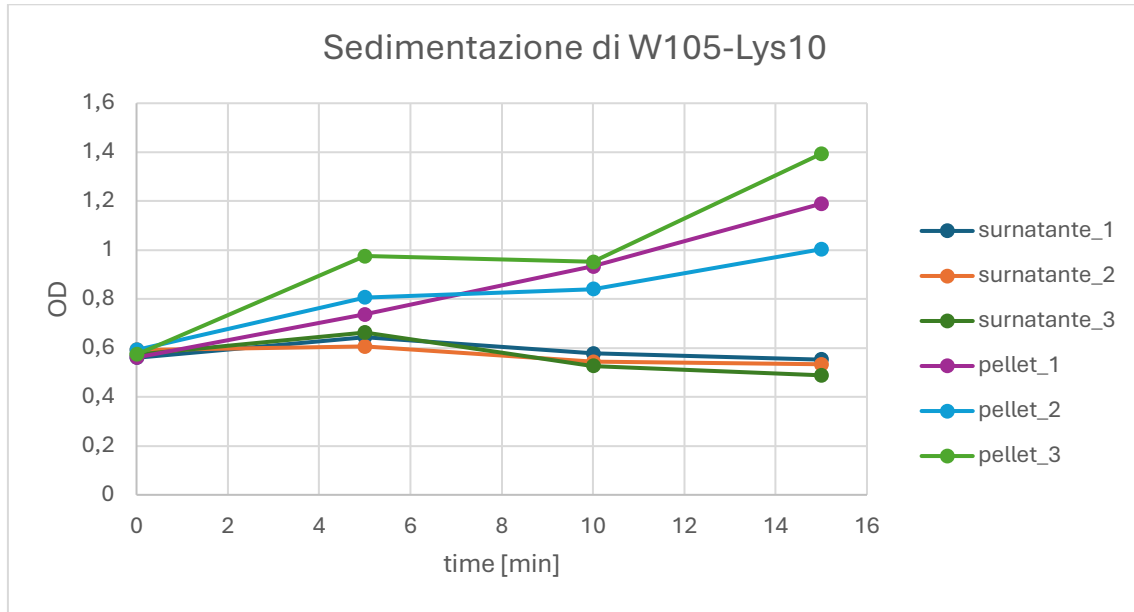


Figura 4.2: Variazione dell'OD nel tempo in test di sedimentazione del ceppo W105-Lys10.

Per evidenziare quantitativamente la variazione della concentrazione cellulare rispetto alla condizione iniziale, è stato calcolato il rapporto tra la media delle tre repliche dell'OD del *pellet* misurato al tempo t e la media delle tre repliche dell'OD del *pellet* misurato all'istante iniziale:

$$Enrichment(t) = \frac{OD_{pellet}(t)}{OD_{pellet}(t = 0)}$$

I risultati ottenuti per i due ceppi sono riportati in **Figura 4.3**.

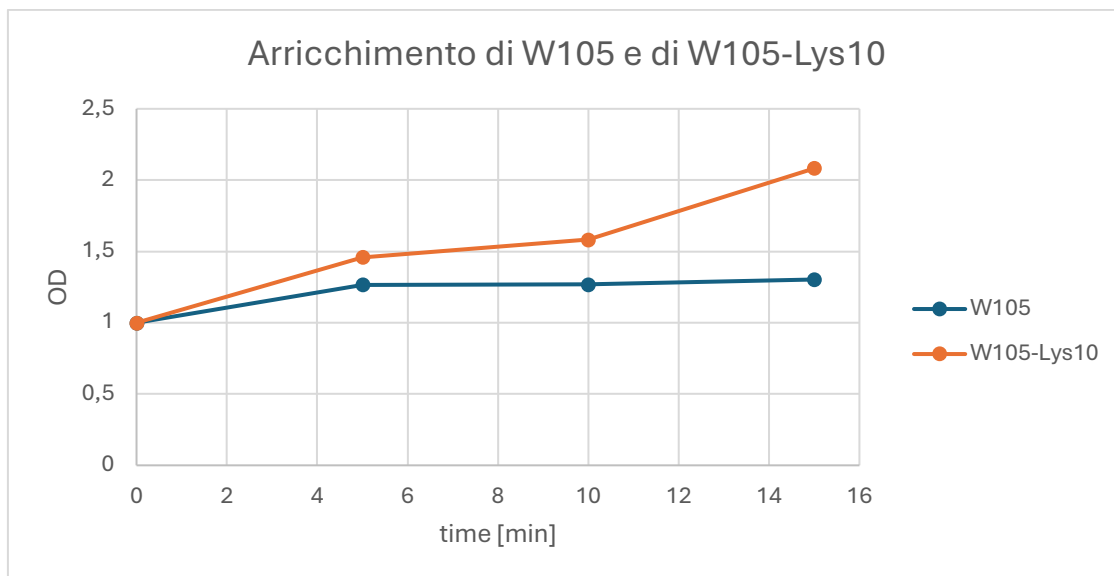


Figura 4.3: Arricchimento delle colture nel tempo rispetto all'istante iniziale.

Il ceppo W105-Lys10 mostra un progressivo aumento del rapporto tra OD con il passare del tempo di sedimentazione, indicando una maggior concentrazione di biomassa nella frazione sedimentata. Al contrario, per il ceppo W105 il rapporto rimane complessivamente prossimo all'unità evidenziando l'assenza di un significativo processo di aggregazione cellulare.

I risultati ottenuti hanno quindi confermato la capacità del ceppo ingegnerizzato di favorire la sedimentazione della biomassa e hanno permesso di individuare un intervallo temporale adeguato all'integrazione del fenomeno di flocculazione nel processo di coltura continua. Sulla base di tali osservazioni, è stato implementato un programma *custom* sulla piattaforma Chi.Bio, descritto in Sezione 3.2.1, nel quale l'agitazione della coltura viene interrotta per 10 minuti ogni 50 minuti di crescita in condizioni di *stirring ON*.

La scelta di un intervallo di sedimentazione pari a 10 minuti è stata effettuata come compromesso tra la necessità di favorire la sedimentazione e quella di mantenere un adeguato ricambio di terreno e condizioni compatibili con una modalità di coltura continua.

I risultati ottenuti mediante le misure di OD sono coerenti con quanto osservato visivamente durante gli esperimenti con entrambi i ceppi. Nel caso di W105-Lys10 dopo 5 minuti di permanenza in condizioni statiche è già visibile la formazione di una frazione

sedimentata, che risulta più evidente dopo 10 minuti e aumenta ulteriormente dopo 15 minuti.

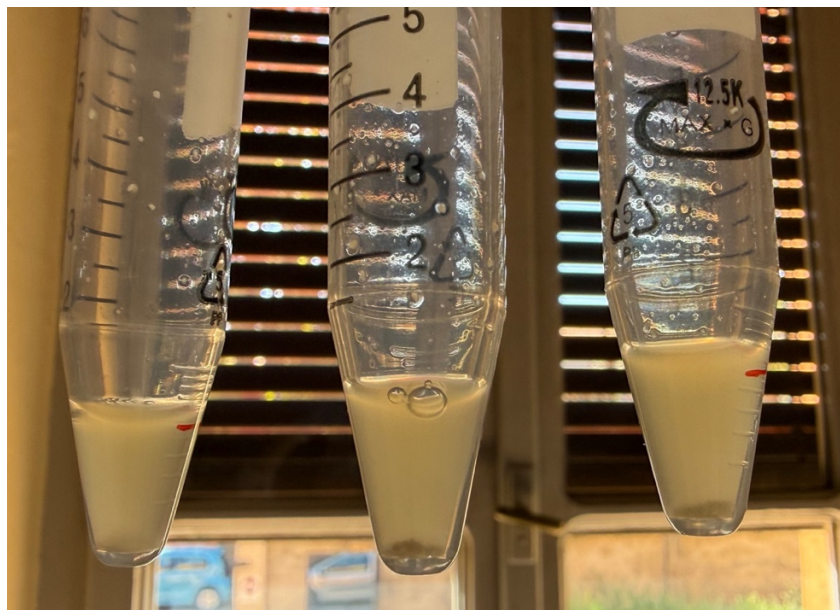


Figura 4.4: Arricchimento di tre provette di *pellet* di W105-Lys10 tenute in incubatore statico per 5, 10 e 15 minuti (da sinistra a destra).

Nel caso del ceppo non flocculante W105, invece, non sono state osservate differenze visive apprezzabili nella quantità di biomassa sedimentata a diversi tempi di permanenza in condizioni statiche (**Figura 4.5**).

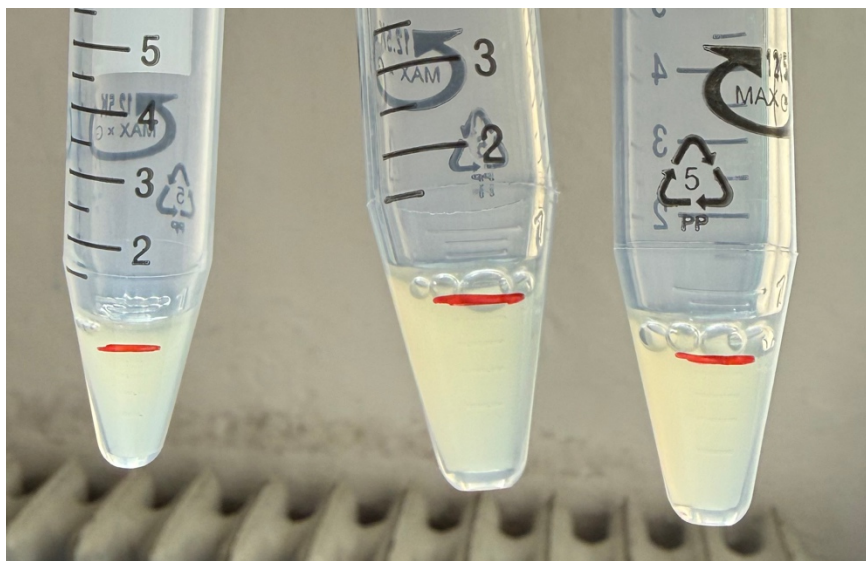


Figura 4.5: Arricchimento di tre provette di *pellet* di W105 tenute in incubatore statico per 5, 10 e 15 minuti (da sinistra a destra).

4.2 Valutazione delle modifiche effettuate al *setup* della piattaforma Chi.Bio

La piattaforma di bioreattori Chi.Bio è stata sfruttata nel presente lavoro di tesi grazie alle sue caratteristiche di modularità e scalabilità, che la rendono adatta allo sviluppo e alla caratterizzazione di processi di fermentazione su piccola scala. I primi esperimenti sono stati effettuati utilizzando il protocollo di sterilizzazione e di *setup* della piattaforma riportato nelle linee guida del produttore [30]. Durante le prove preliminari sono state riscontrate frequenti contaminazioni batteriche del terreno di coltura in *input* e alcune criticità relative al funzionamento delle pompe. Per migliorare l'affidabilità e la ripetibilità degli esperimenti, sono state pertanto introdotte alcune modifiche al *setup* e alle procedure operative, descritte in seguito.

Una prima modifica ha riguardato la composizione del terreno di coltura, al quale sono stati aggiunti buffer fosfato. Gli esperimenti preliminari condotti in assenza di tale supplementazione hanno evidenziato una crescita instabile, con difficoltà nel mantenimento di un valore di OD consistente nel tempo. L'aggiunta del buffer fosfato ha permesso di ottenere una maggior stabilità della coltura, fornendo una miglior capacità tamponante nei confronti delle variazioni di pH associate alla crescita batterica. Tale modifica si è pertanto resa necessaria per l'esecuzione di esperimenti di fermentazione prolungati e per ottenere condizioni di coltura più stabili.

Un'ulteriore criticità riguarda la sterilità dei tubi utilizzati per il trasferimento del terreno fresco in *input*. Le contaminazioni osservate durante gli esperimenti preliminari hanno portato a verificare l'inefficacia della procedura di sterilizzazione iniziale. In particolare, queste prevedono la sterilizzazione delle tubazioni mediante risciacquo con una soluzione di acqua e alcol al 50%. Per verificare se le contaminazioni fossero riconducibili ad una sterilizzazione non sufficientemente efficace delle linee, è stato realizzato un circuito chiuso nel quale il terreno in uscita della *vial*, inizialmente sterile e privo di inoculo batterico, veniva reimmesso nella bottiglia contenente terreno fresco. Il sistema è stato mantenuto in funzione tutta la notte nelle condizioni operative di un normale turbidostato ed al termine della prova il terreno di coltura risultava torbido, evidenziando la presenza di contaminazione. Sulla base del risultato ottenuto si è deciso di introdurre una procedura

alternativa basata sul risciacquo delle tubazioni con acqua e candeggina al 50%, con l'obiettivo di ridurre il rischio di contaminazione durante gli esperimenti successivi.

Sono state inoltre apportate alcune modifiche alla disposizione fisica dei componenti della piattaforma Chi.Bio per ridurre fenomeni di reflusso di terreno. In particolare, pompe, bioreattore, bottiglia di terreno fresco e contenitore di *waste* sono stati posizionati sullo stesso piano, mentre il condensatore è stato collocato ad un livello inferiore rispetto al bioreattore (**Figura 4.6**).



Figura 4.6: Posizionamento delle componenti della piattaforma Chi.Bio.

Come descritto nella Sezione 2.5.1, durante le fermentazioni viene utilizzato un condensatore costituito da un contenitore con acqua, nel quale è inserita la linea di sfiato collegata al bioreattore. Questo sistema consente la fuoriuscita di eventuali bolle o gas presente, evitando un'eccessiva variazione di pressione all'interno del sistema. Durante alcune prove preliminari è stato osservato che, al momento del campionamento, l'acqua contenuta nel condensatore risultava torbida e, tale fenomeno, è stato attribuito ad un

possibile risucchio della coltura associato alla formazione di una pressione negativa all'interno della *vial* che avrebbe determinato il trasferimento di parte della coltura verso il condensatore. Per limitare tale fenomeno, il condensatore è stato posizionato circa un metro al di sotto del bioreattore, modificando il dislivello tra i due componenti e riducendo il reflusso della coltura.

Oltre alle modifiche relative al *setup* fisico e alle procedure operative, sono state introdotte alcune accortezze nell'analisi dei dati. In particolare, è stata effettuata la calibrazione del *detector* di OD della piattaforma Chi.Bio e del lettore di micropiastre *Tecan Infinite F200Pro* utilizzato nei test preliminari di sedimentazione. Inoltre, è stata individuata una metrica univoca da utilizzare per la valutazione del *growth rate* e, conseguentemente, del *dilution rate* della coltura.

Il *detector* di OD installato nei bioreattori Chi.Bio presenta un limite di saturazione oltre determinato intervallo. Per ottenere misure affidabili anche a valori di OD elevati, è stata pertanto effettuata una calibrazione del segnale. La stessa calibrazione è stata effettuata anche per il lettore di micropiastre *Tecan Infinite F200Pro*. Le procedure utilizzate e le relative curve di conversione sono riportate in Appendice B e consentono di ricavare, a partire dai valori misurati dai due strumenti, le corrispondenti densità ottiche reali e il relativo fattore di conversione tra le due modalità di misura.

Come descritto in Sezione 3.2.1, sono state successivamente valutate diverse metodologie per il calcolo del *dilution rate* delle colture continue in Chi.Bio. Di seguito vengono riportate le considerazioni effettuate per ogni metodologia di calcolo:

- Metodo 1: analisi del volume in *output*. Tale metodologia non risulta estremamente precisa in quanto, lavorando con volumi piccoli, si può avere evaporazione di parte del terreno esausto presente nel *waste*, di conseguenza le misure possono risultare sfalsate. Il contenitore non garantisce una chiusura ermetica.
- Metodo 2: media dei *growth rate* calcolati. Il valore medio ottenuto risulta robusto e coerente con quanto ricavato dall'analisi dei picchi di OD (Metodo 3). Al contrario, il calcolo effettuato direttamente da codice Chi.Bio tende a fornire una sottostima del *growth rate* cellulare, rendendo necessario il ricalcolo dei valori a partire dagli OD reali.

- Metodo 3: analisi dei picchi di OD. L'identificazione dei picchi di OD consente di ricavare il *dilution rate* a partire dalla dinamica di crescita e diluizione della coltura, utilizzando l'intero andamento temporale della misura e risultando pertanto indipendente dagli istanti di campionamento.
- Metodo 4: analisi dell'attività delle pompe. Questa metodologia si è dimostrata tuttavia sensibile sia ai valori di attivazione registrati da Chi.Bio sia alla portata effettiva delle pompe. A seguito della calibrazione delle pompe (Appendice E) è stata osservata una variazione della portata in funzione del rate di lavoro, rendendo difficile assumere una portata costante, e, di conseguenza, ottenere una stima sufficientemente affidabile del *dilution rate*. Questa tecnica è stata sfruttata per il ceppo W105-Lys10, in quanto, nel momento in cui viene implementato il chemostato, il *rate* di attivazione della pompa in *input* viene deciso nel momento di scrittura del programma *custom*.

Per ciascun esperimento effettuato con il ceppo non flocculante sono stati calcolati i *dilution rate* mediante le prime tre metodologie sopra esposte. I risultati ottenuti sono complessivamente confrontabili, confermando la coerenza tra le diverse procedure di calcolo. Tra queste, l'analisi dei picchi di OD è stata selezionata come metodologia di riferimento per i successivi passaggi di analisi, in quanto consente di ricavare il *dilution rate* in maniera automatizzata dall'andamento temporale della densità ottica della coltura, sfruttando l'intero tracciato sperimentale e riducendo la dipendenza da misure puntuali o dalla calibrazione delle pompe. Per verificare la coerenza tra le grandezze calcolate mediante i diversi metodi e confermare che esse rappresentino la medesima quantità, è stato effettuato un confronto grafico mediante *scatter plot* (**Figura 4.7**) in cui si può notare, ad esempio, che le misure calcolate con il Metodo 2 ed il Metodo 3 per valori medio bassi di *dilution rate* sono ben allineati lungo la retta bisettrice, di conseguenza si possono considerare metodi equivalenti.

Nel caso del ceppo flocculante, come tecnica di calcolo del *dilution rate*, si utilizza il Metodo 4. Risulta inopportuno il Metodo 3 in quanto dipendente dalle rilevazioni di OD del *detector* di Chi.Bio che però sono influenzate dalla presenza del pescante in silicone per l'allungamento del tappo della *vial*, modifica funzionale necessaria per rendere compatibile il sistema con ricambi di terreno di volume consistente.

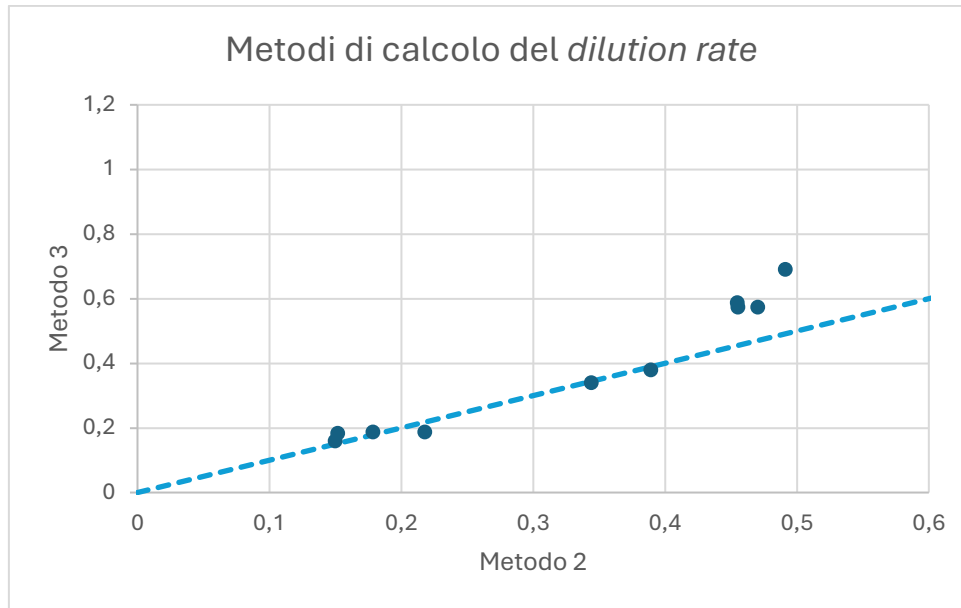


Figura 4.7: Scatter plot delle misure di *dilution rate* ottenute dai Metodi 2 e 3.

Nella Sezione 4.3 viene presentata la caratterizzazione delle fermentazioni in continua del ceppo W105 utilizzando come metrica di riferimento il *dilution rate* calcolato mediante il Metodo 3, mentre nella Sezione 4.4 viene riportata la caratterizzazione del ceppo W105-Lys10 utilizzando il Metodo 4.

4.3 Caratterizzazione del *production rate* del ceppo non flocculante W105 in bioreattore

Per caratterizzare le prestazioni fermentative in continua del ceppo non flocculante W105, sono state inizialmente considerate fermentazioni *batch* come riferimento per il confronto con i risultati ottenuti in continua. A tale scopo, sono state effettuate fermentazioni *batch* sia in *falcon* da 50mL sia in *vial* della piattaforma Chi.Bio, come da Appendice C. Per ciascuna fermentazione *batch* sono stati determinati la resa percentuale, calcolata come riportato da [9], e la produttività volumetrica espressa come *production rate*:

$$Prod_{vol} = \frac{EtOH_{ss}}{T_2 - T_1}$$

Con:

- $EtOH_{ss}$: concentrazione di etanolo allo *steady state*, media delle concentrazioni tra T_1 e T_2 .
- T_1 e T_2 : istanti di campionamento.

I dati ottenuti dalle fermentazioni *batch*, riportati in Appendice C, sono stati utilizzati come riferimento nei grafici riportati nei paragrafi successivi.

Per caratterizzare il comportamento del ceppo W105 in condizioni di coltura continua, sono stati selezionati differenti valori di OD_{target} corrispondenti a diverse fasi di crescita cellulare, come mostrato in **Figura 4.8**. Per ciascuno di questi valori sono stati effettuati esperimenti in duplicato, impostando un opportuno intervallo di oscillazione del segnale mediante il controllo ZigZag (Sezione 3.1.1).

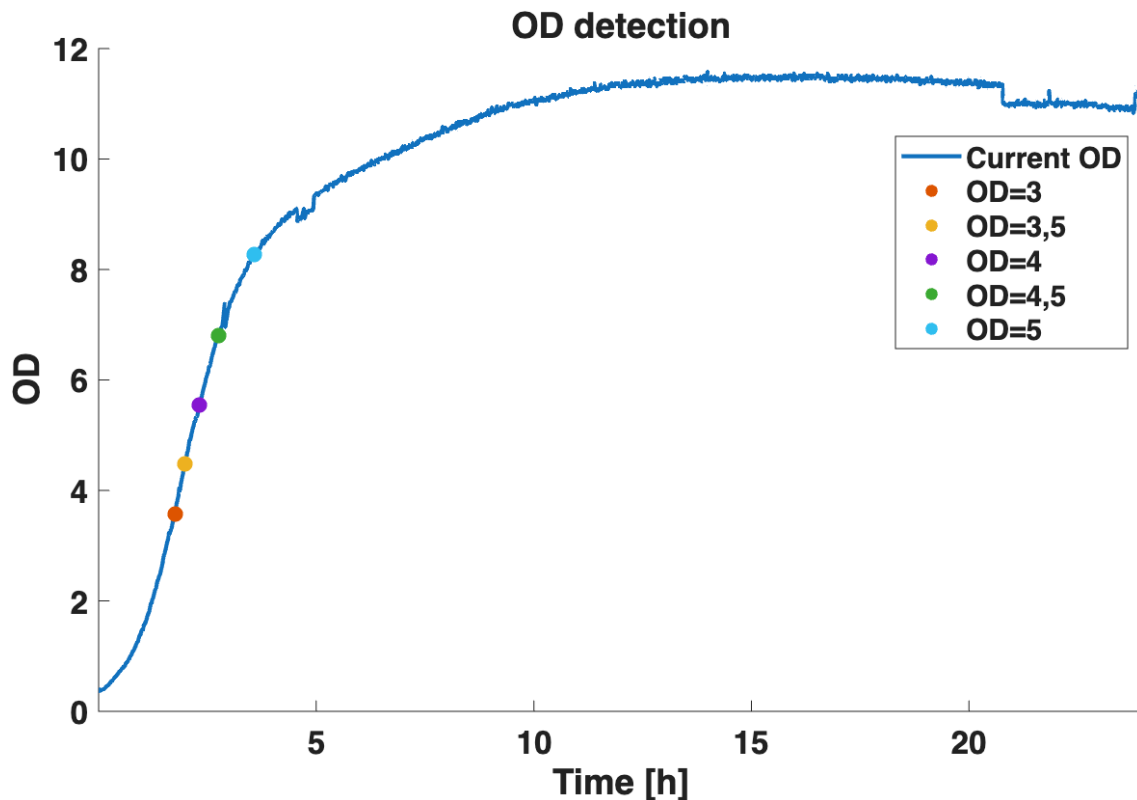


Figura 4.8: Crescita *batch* in Chi.Bio con evidenziati gli $OD_{target\ reali}$ a cui sono stati effettuati gli esperimenti con il ceppo non flocculante. In legenda sono riportati i *setpoint* degli $OD_{misurati}$.

La **Tabella 4.1** riporta i risultati degli esperimenti di fermentazione in continua del ceppo W105 che hanno dato esito positivo.

OD_{target}	$EtOH_{ss}$ $\left[\frac{g}{L}\right]$	Lac_0 $\left[\frac{g}{L}\right]$	Lac_{48} $\left[\frac{g}{L}\right]$	Dil_{rate} $\left[\frac{1}{h}\right]$	$Prod_{vol}$ $\left[\frac{g}{L \cdot h}\right]$	$Resa \%$
3	1,23	31,2	22,9	0,609	0,749	26,55
3	1,60	30,0	20,4	0,588	0,940	30,98
3,5	0,93	35,6	31,9	0,574	0,534	46,72
3,5	1,28	32,9	28,9	0,575	0,736	59,48
4	2,78	35,3	29,2	0,381	1,059	84,71
4	2,66	30,9	23,4	0,341	0,908	65,92
4,5	4,72	35,3	29,6	0,188	0,886	153,92
4,5	4,53	35,6	29,5	0,188	0,854	138,03
5	5,00	28,7	17,3	0,161	0,804	81,52
5	5,20	28,7	18,6	0,185	0,963	95,70

Tabella 4.1: Esperimenti di fermentazione in continua del ceppo W105 in Chi.Bio.

Come prima analisi, è stato valutato il *dilution rate* ottenuto sperimentalmente in funzione dell' OD_{target} a cui è stato condotto ciascun esperimento (**Figura 4.9**). Si osserva una diminuzione del *dilution rate* all'aumentare dell'OD di lavoro. Tale comportamento è coerente con la diversa fase di crescita cellulare associata ai valori di OD considerati: a valori di OD più elevati la coltura si trova in una fase di crescita più lenta e, di conseguenza, richiede un minor ricambio di terreno per mantenere la densità cellulare impostata. Il punto relativo alla fermentazione *batch* presenta un *dilution rate* pari a zero, in quanto in tale condizione non è previsto alcun ricambio di terreno.

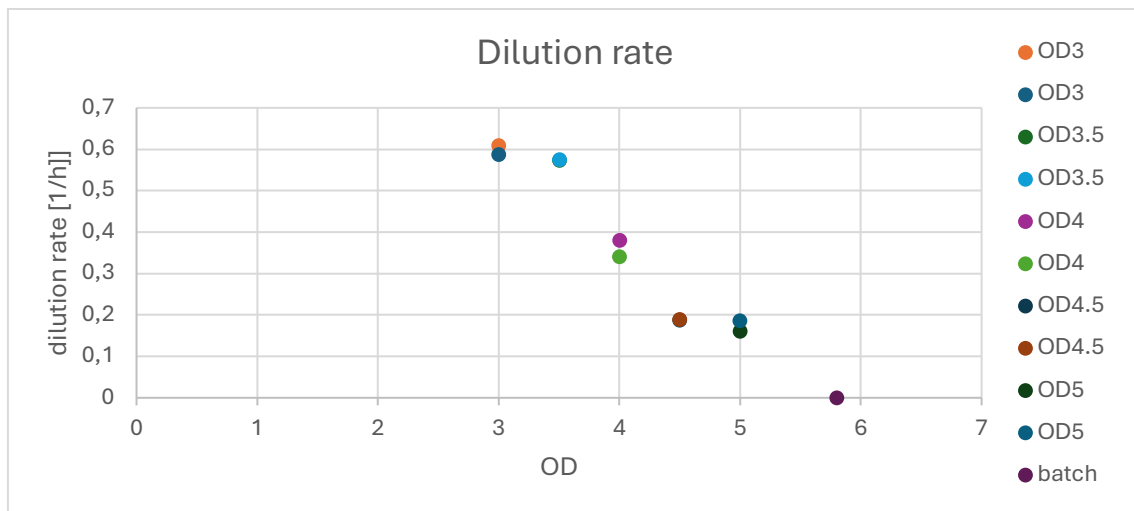


Figura 4.9: *Dilution rate* in funzione dell' OD_{target} a cui è impostato l'esperimento per il ceppo W105.

Successivamente è stata analizzata la concentrazione di etanolo allo *steady state* in funzione del *dilution rate* (**Figura 4.10**). La concentrazione riportata corrisponde alla media dei valori ottenuti nei due campionamenti effettuati. Si osserva una diminuzione della concentrazione di etanolo all'aumentare del *dilution rate*. Nella fermentazione *batch*, utilizzata come riferimento, la concentrazione massima di etanolo raggiunta dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione risulta superiore rispetto ai valori ottenuti nelle condizioni di coltura continua, raggiungendo circa 16g/L.

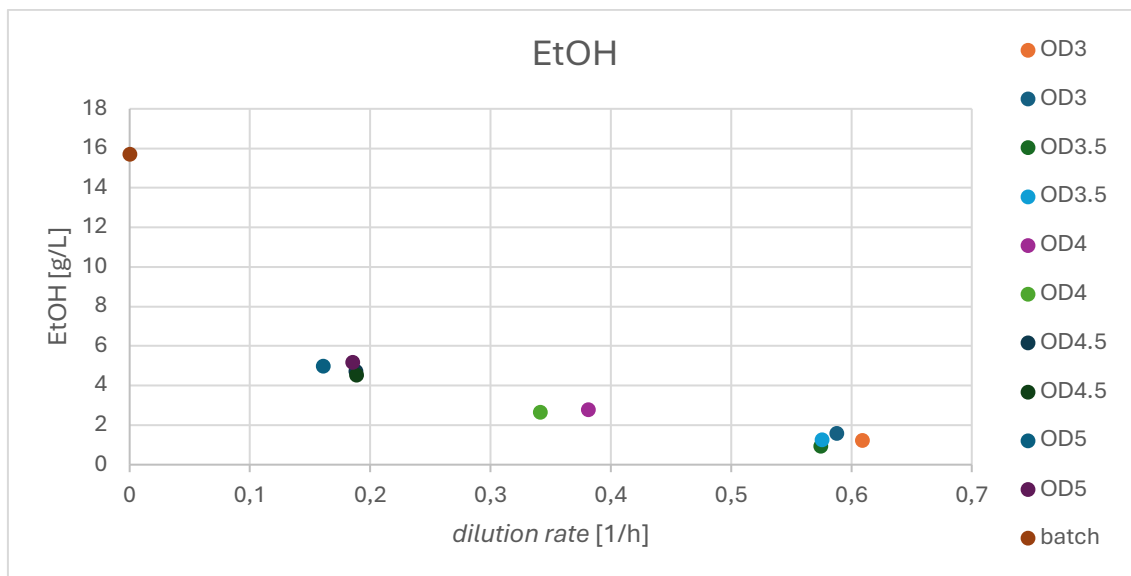


Figura 4.10: Concentrazione di etanolo in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105.

La sola concentrazione di etanolo, tuttavia, non consente di valutare direttamente la produttività del processo. Per questo motivo è stato analizzato il *production rate* o produttività volumetrica in funzione dell'OD di lavoro (**Figura 4.11**). L'andamento ottenuto mostra una distribuzione relativamente stabile con un *trend* a campana, in cui i valori più elevati di *production rate* si trovano in corrispondenza di valori intermedi di OD_{target} misurato, prossimi a 4.

Il confronto tra gli esperimenti evidenzia inoltre che, in corrispondenza delle condizioni intermedie di crescita, la coltura in continua raggiunge valori di produttività volumetrica superiori rispetto alla condizione *batch*. Questo risultato sottolinea come una maggiore concentrazione di etanolo non corrisponda necessariamente ad una maggior produttività volumetrica. Infatti, ad elevati valori di OD la coltura presenta una concentrazione di etanolo relativamente elevata, ma il ridotto *dilution rate* limita la quantità di prodotto ottenuta nell'unità di tempo.

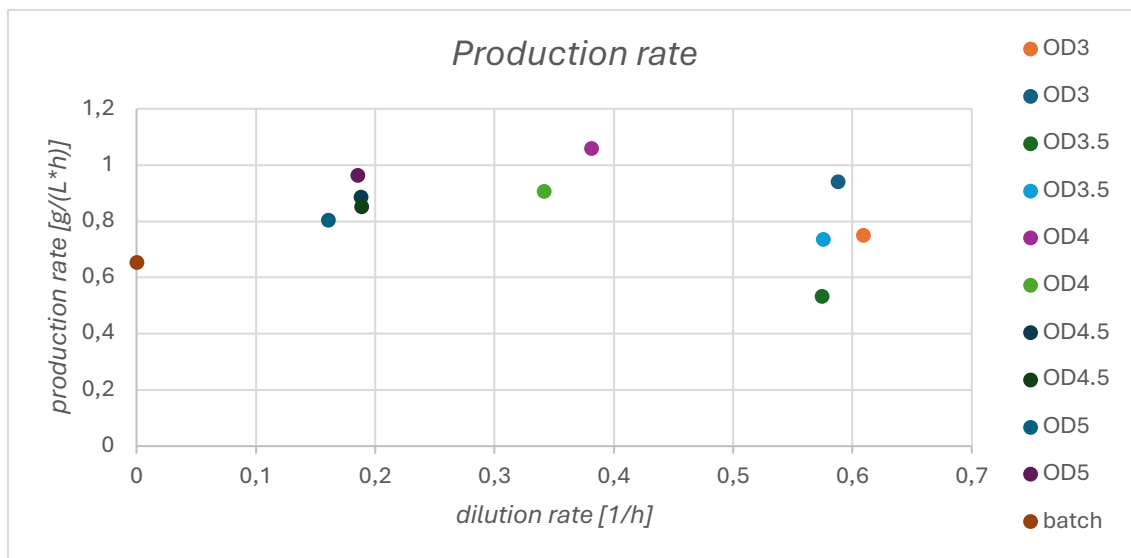


Figura 4.11: *Production rate* in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105.

Infine, è stata valutata la resa percentuale in funzione del *dilution rate* (**Figura 4.12**). I valori ottenuti mostrano una certa variabilità, riconducibile anche alla variabilità stessa della concentrazione di lattosio consumata nei diversi esperimenti. In generale, le rese più elevate si osservano per valori di OD compresi tra 4.5 e 5, con valori superiori rispetto a quelli ottenuti nella fermentazione *batch* di riferimento. È importante sottolineare, tuttavia, che il calcolo della resa in un terreno da laboratorio ricco come quello utilizzato in questo lavoro di tesi può essere influenzato dalla presenza di nutrienti complessi (es. estratto di lievito) e in alcuni esperimenti può inoltre risultare inaccurata a causa della bassa frazione di lattosio consumata. L'analisi dei risultati si basa quindi sugli indici di *performance* precedentemente discussi.

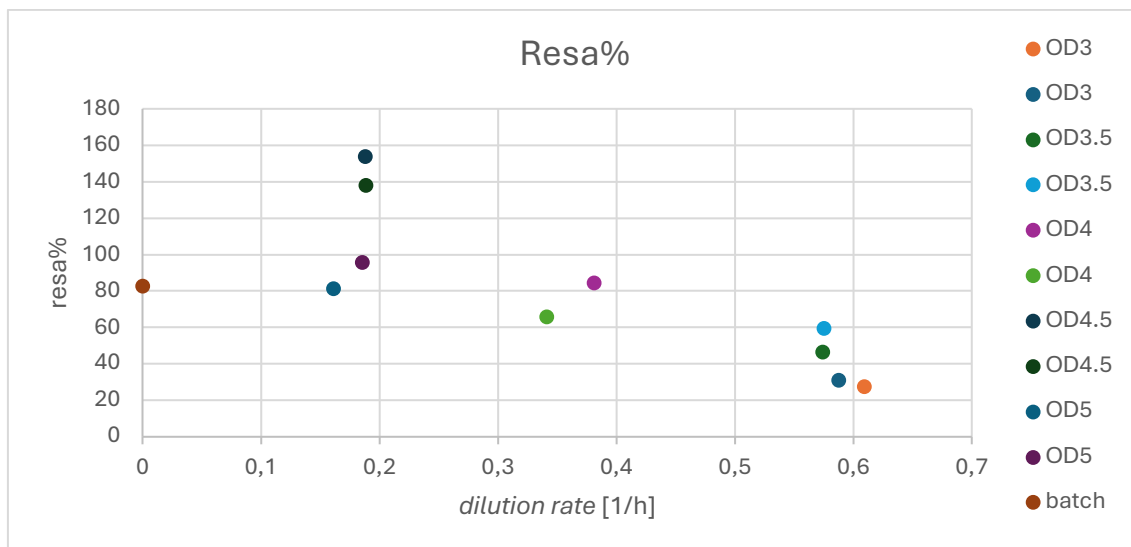


Figura 4.12: Resa percentuale in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105.

Nel complesso i risultati mostrano una relazione tra la fase di crescita della coltura e le prestazioni fermentative del processo. A valori di OD_{target} superiori a 4.5, corrispondenti ad una fase di crescita più lenta, si osservano *dilution rate* inferiori, poiché è sufficiente un minore ricambio di terreno per mantenere la densità cellulare impostata. Al contrario, a valori di *dilution rate* più elevati il ricambio di terreno è maggiore, ma la concentrazione di etanolo allo *steady state* tende a diminuire.

I valori intermedi di *dilution rate* rappresentano quindi una condizione in cui è possibile ottenere un compromesso tra concentrazione di etanolo e ricambio di terreno, determinando i valori più elevati di *production rate* osservati per il ceppo W105.

Questi risultati sono utilizzati come riferimento per il successivo studio del ceppo flocculante W105-Lys10.

4.4 Caratterizzazione del *production rate* del ceppo flocculante W105-Lys10 in bioreattore

Dopo aver caratterizzato il comportamento fermentativo del ceppo non flocculante W105, è stato studiato il ceppo flocculante W105-Lys10, con l'obiettivo di valutare l'effetto della ritenzione della biomassa sulle prestazioni del processo in continua. L'utilizzo del sistema

di flocculazione è stato infatti introdotto come strategia di immobilizzazione cellulare, con l'obiettivo di favorire il mantenimento di un'elevata densità batterica all'interno del bioreattore e limitare il *wash out* della biomassa durante il ricambio di terreno.

Come per il ceppo W105, sono state inizialmente effettuate fermentazioni *batch* del ceppo W105-Lys10, utilizzate come riferimento per il confronto con gli esperimenti in continua. I relativi risultati sono riportati in Appendice C.

Per studiare il comportamento di W105-Lys10 in condizioni di coltura continua, è stato implementato un programma *custom* per il funzionamento della piattaforma Chi.Bio in modalità chemostato, come descritto in Sezione 3.1.2. Una volta definita la modalità operativa, sono stati effettuati diversi esperimenti variando il *dilution rate* della coltura.

Gli esperimenti sono stati condotti seguendo due protocolli differenti. In una prima fase è stato utilizzato un protocollo caratterizzato da una crescita *batch* iniziale di circa 13 ore. Successivamente è stato introdotto un secondo protocollo, nel quale la fase di crescita *batch* è stata prolungata fino a 24 ore prima dell'avvio della coltura continua, ma con un alternarsi di 50 minuti di *stirring ON* e 10 di *stirring OFF*. Quest'ultima modifica è stata introdotta per favorire la formazione di *biofilm* e, conseguentemente, aumentare la quantità di biomassa trattenuta all'interno della *vial*.

Per impostare i diversi *dilution rate* è stata effettuata, per ciascun esperimento, una calibrazione della lunghezza del pescante e dei *rate* di attivazione delle pompe di *input* e *output*. Il *rate* di attivazione delle pompe varia nell'intervallo $[-1, 1]$. I valori compresi tra -1 e 1 indicano la frazione di minuto durante la quale la pompa rimane attiva, mentre il segno determina il senso di rotazione. I valori pari a ± 1 mantengono la pompa attiva in modo continuo, rispettivamente nei due sensi di rotazione. In particolare, la pompa di *output* è stata impostata ad un *rate* pari a 1 e la portata è stata regolata modificando la lunghezza del tubo in silicone utilizzato come pescante. In questo modo è stato possibile ottenere in *output* la quantità di terreno necessaria per ciascuna condizione sperimentale. Per ogni valore di *dilution rate* è stato quindi predisposto un differente tappo con pescante. Il *rate* della pompa in *input* è stato successivamente impostato in modo da compensare il volume rimosso dall'*output*, mantenendo il volume della coltura il più possibile costante, pari circa a 20mL.

La **Tabella 4.2** riporta i risultati degli esperimenti di fermentazione in continua del ceppo flocculante W105-Lys10.

Dil_{rate} $\frac{1}{[h]}$	$EtOH_{ss}$ $\frac{g}{[L]}$	Lac_0 $\frac{g}{[L]}$	Lac_{48} $\frac{g}{[L]}$	$Prod_{vol}$ $\frac{g}{[L \cdot h]}$	$Resa$ %
0,75	2,55	35,6	33,4	1,92	215,44
0,46	2,19	33,4	24,3	1,01	44,73
1,08	1,26	33,0	28,6	1,36	53,23
0,42	5,10	32,5	22,6	2,15	95,75
0,61	2,80	32,5	27,1	1,71	96,38
1,34	1,37	35,5	32,1	1,83	74,90

Tabella 4.2: Esperimenti di fermentazione in continua del ceppo W105-Lys10 in Chi.Bio.

È importante sottolineare che la seconda e la terza riga della Tabella 4.2 corrispondono agli esperimenti condotti seguendo il primo protocollo, caratterizzato da una crescita *batch* iniziale di circa 13 ore. In queste condizioni la formazione del *biofilm* è risultata quasi assente rispetto agli esperimenti condotti seguendo il secondo protocollo.

In primo luogo, è stata valutata la concentrazione di etanolo allo *steady state* in funzione del *dilution rate* dell'esperimento (**Figura 4.13**). Analogamente a quanto osservato per il ceppo W105, all'aumentare del *dilution rate* si osserva una diminuzione della concentrazione di etanolo. Il comportamento del ceppo W105-Lys10 risulta quindi qualitativamente analogo a quello osservato per il ceppo non flocculante. La fermentazione *batch* utilizzata come riferimento presenta una concentrazione di etanolo superiore, pari circa a 14g/L.

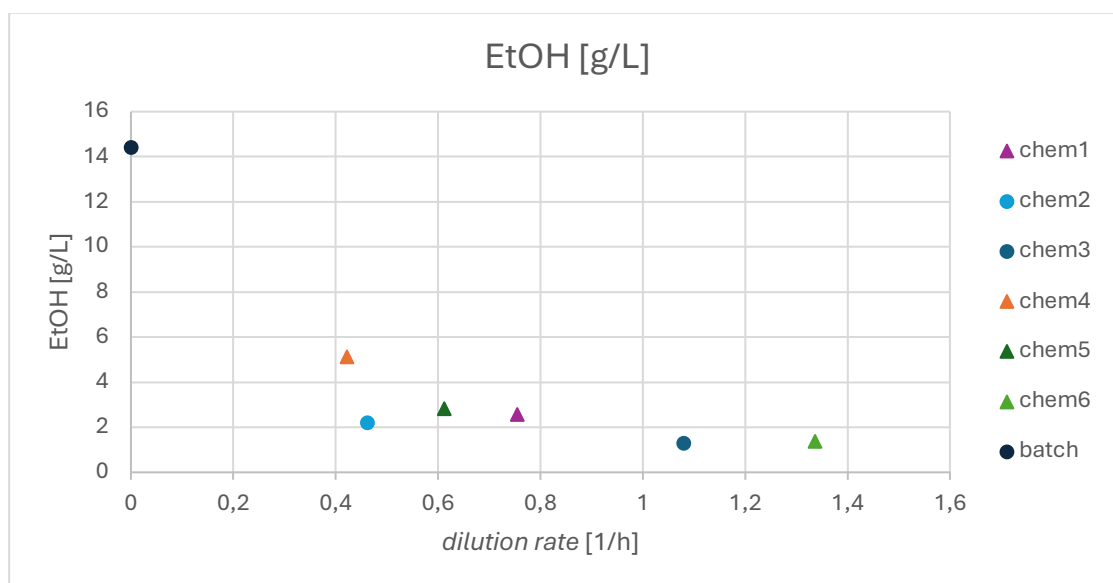


Figura 4.13: Concentrazione di etanolo in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.

Successivamente è stato analizzato il *production rate* in funzione del *dilution rate* (**Figura 4.14**), al fine di valutare la produttività volumetrica del processo. I valori ottenuti per il ceppo W105-Lys10 risultano complessivamente superiori rispetto ai valori massimi ottenuti con il ceppo W105 nelle condizioni sperimentali considerate. Mentre per W105

il *production rate* massimo si colloca intorno a $1\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, per W105-Lys10 i valori raggiungono circa $2\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$.

In particolare, i valori più elevati di *production rate* sono stati ottenuti negli esperimenti condotti seguendo il secondo protocollo, caratterizzato da 24 ore di crescita *batch* iniziale. Questi esperimenti coincidono con quelli nei quali è stata osservata una formazione di *biofilm* più significativa. La maggiore produttività osservata in queste condizioni può quindi essere associata alla maggior ritenzione di biomassa all'interno della *vial*.

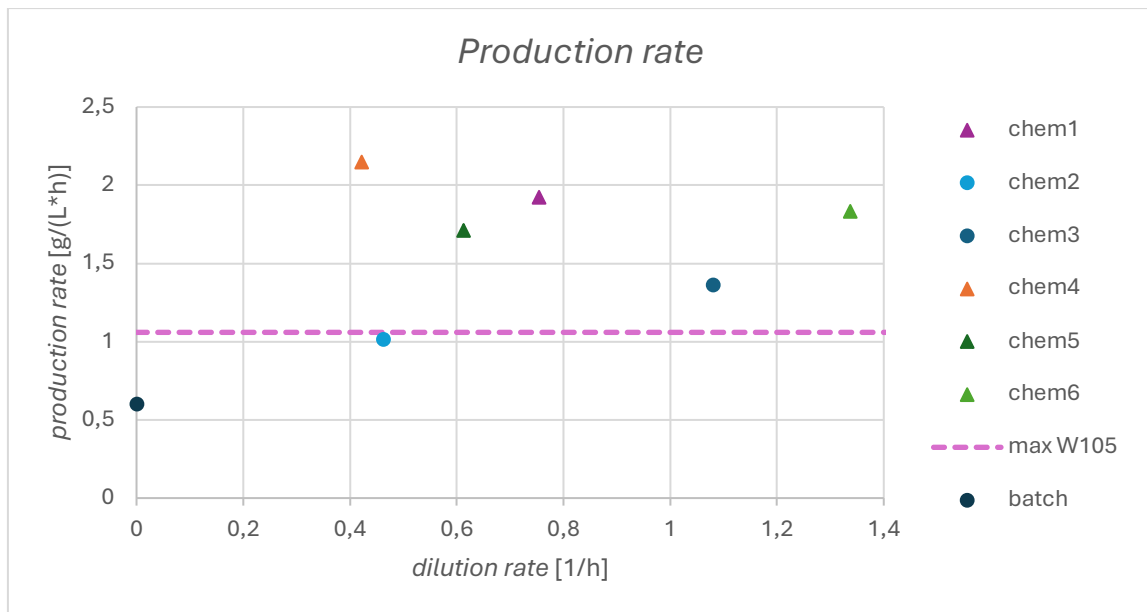


Figura 4.14: *Production rate* in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.

Infine, è stata analizzata la resa percentuale in funzione del *dilution rate* nei vari esperimenti (**Figura 4.15**). In questo caso non emerge un andamento sistematico della resa al variare del *dilution rate*. Tuttavia, i valori ottenuti negli esperimenti condotti con il secondo protocollo risultano complessivamente superiori rispetto a quelli ottenuti con il primo. Anche in questo caso, la differenza osservata coincide con le condizioni sperimentali caratterizzate da una maggior formazione di *biofilm*, nonostante l'elevata variabilità delle misure, anche per i motivi illustrati nella sezione precedente.

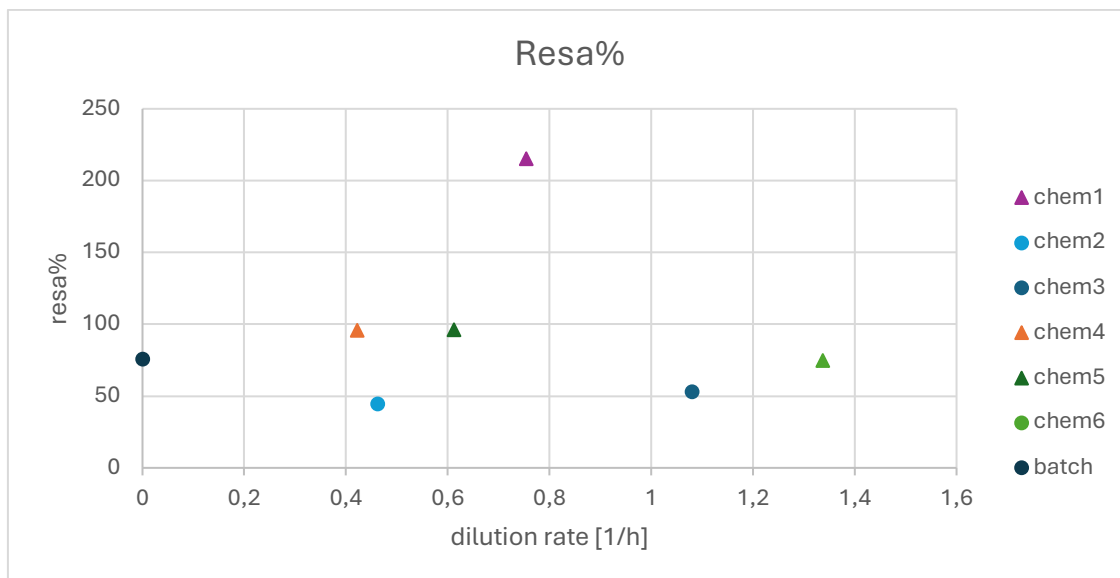


Figura 4.15: Resa percentuale in funzione del *dilution rate* dell'esperimento per il ceppo W105-Lys10.

L'osservazione diretta delle *vial* al termine degli effettuati con il ceppo flocculante W105-Lys10 ha permesso di notare una forte capacità adesiva dei batteri sia al silicone che costituisce il pescante sia al vetro della *vial*. In particolare, è stata osservata la formazione di un *biofilm* sulla superficie interna ed esterna del pescante in silicone collegato al tappo di Chi.Bio (**Figura 4.16**), oltre alla presenza di agglomerati cellulari sulle pareti della *vial* (**Figura 4.17**).



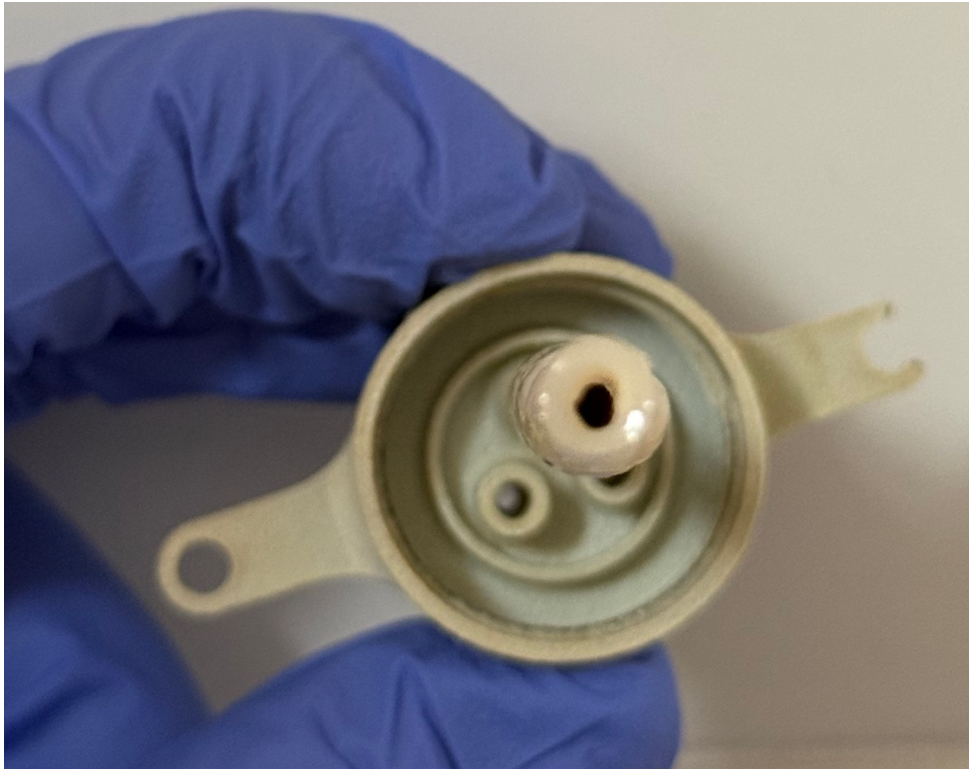


Figura 4.16: *Biofilm* adeso al pescante in silicone con cui è allungato il tappo di Chi.Bio, foto di differenti esperimenti.

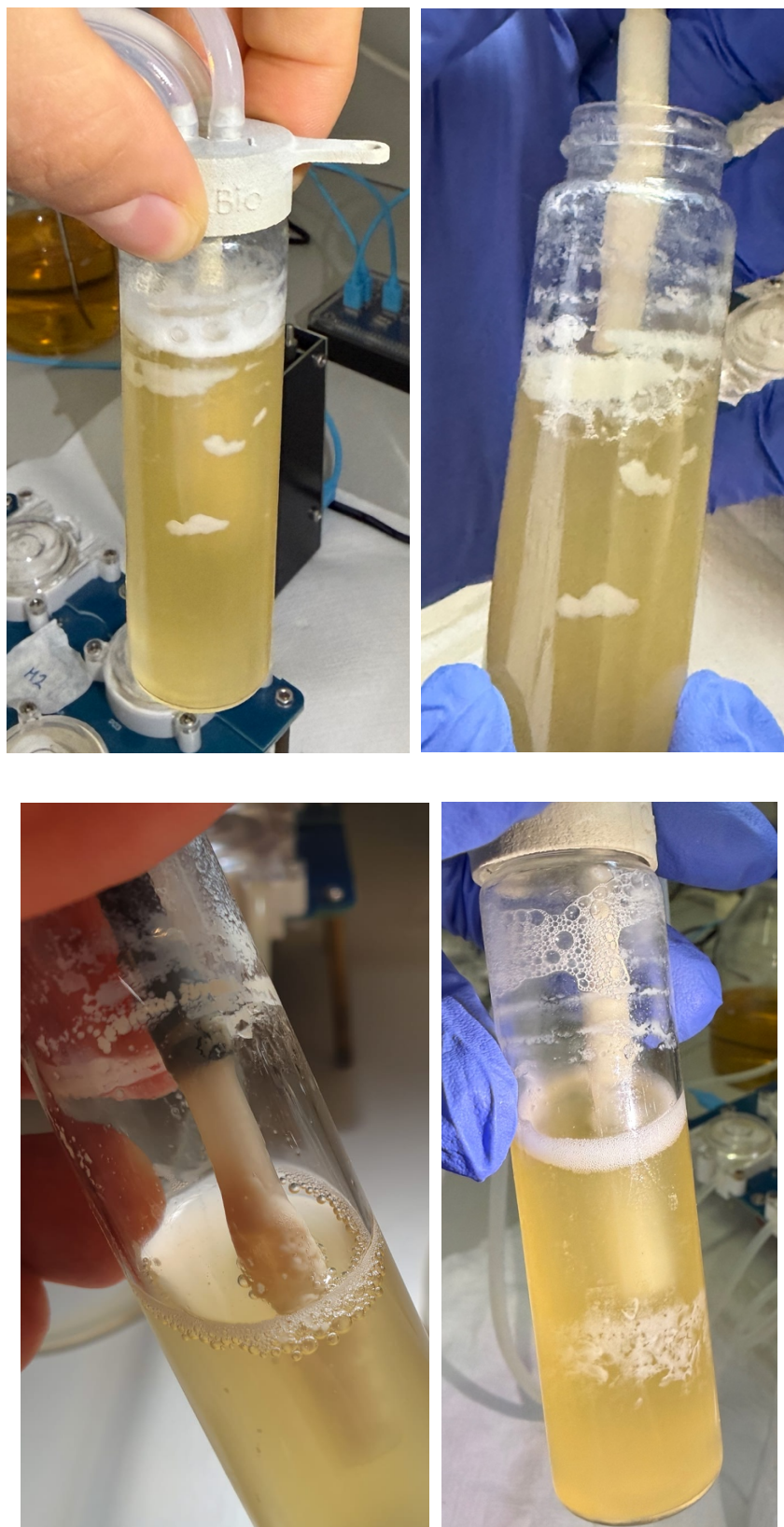


Figura 4.17: *Biofilm* adesivo alle pareti della *vial* in vetro di Chi.Bio, foto di differenti esperimenti.

La presenza di biomassa adesa alle superfici del sistema costituisce un'evidenza della ritenzione cellulare ottenuta durante gli esperimenti con W105-Lys10. Tale fenomeno è coerente con l'obiettivo di utilizzare la flocculazione come strategia di immobilizzazione per aumentare la densità di biomassa presente nel bioreattore. Inoltre, la maggior produttività volumetrica osservata negli esperimenti caratterizzati dalla formazione del *biofilm* suggerisce che la ritenzione della biomassa possa aver contribuito alle prestazioni fermentative ottenute con il ceppo W105-Lys10.

Capitolo 5

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione alcolica di un ceppo di *Escherichia coli* ingegnerizzato per la produzione di etanolo, con particolare attenzione all'implementazione di colture continue in una piattaforma di bioreattori parallelizzati su piccola scala. Sono state studiate le prestazioni fermentative del ceppo non flocculante W105 e del ceppo flocculante W105-Lys10, valutando la possibilità di aumentare la produttività volumetrica del processo attraverso il mantenimento di una maggiore quantità di biomassa all'interno del bioreattore limitandone in *wash out*.

La scelta di lavorare in coltura continua nasce dalla possibilità di mantenere le cellule in condizioni operative relativamente stabili, grazie all'apporto di terreno fresco durante la crescita, e di ottenere una produzione di metabolita *target* potenzialmente prolungata nel tempo, superando alcuni dei limiti propri delle fermentazioni *batch*. Nel caso della produzione di etanolo, tuttavia, l'utilizzo di una coltura continua presenta alcune criticità, tra cui la necessità di individuare un adeguato compromesso tra il ricambio del terreno, la crescita cellulare e la produzione del metabolita. Un ulteriore limite è rappresentato dal *wash out* della biomassa, che può diventare particolarmente rilevante quando il *dilution rate* supera la capacità della coltura di mantenere la propria densità cellulare. In questo contesto, il presente lavoro ha valutato dapprima il comportamento del ceppo non flocculante e successivamente l'introduzione di una strategia di ritenzione della biomassa mediante il ceppo W105-Lys10.

Un primo risultato significativo del lavoro riguarda la caratterizzazione e l'ottimizzazione della piattaforma Chi.Bio. Le prime prove sperimentali hanno evidenziato alcune criticità associate al protocollo di utilizzo riportato nelle linee guida della piattaforma, in particolare relativamente alla stabilità del terreno di coltura in *input* ed al funzionamento delle pompe. L'introduzione di modifiche al *setup* sperimentale, tra cui l'utilizzo di soluzioni tamponate e una più accurata calibrazione delle portate delle pompe, ha permesso di ottenere condizioni operative maggiormente stabili. Questo passaggio è

risultato fondamentale per poter utilizzare la piattaforma per l'implementazione di esperimenti di fermentazione continua.

La possibilità di utilizzare una piattaforma di bioreattori su piccola scala ha inoltre consentito di condurre più esperimenti in condizioni differenti, riducendo il consumo di terreno rispetto a sistemi di coltura di volume maggiore. La caratterizzazione delle portate delle pompe e la valutazione dei diversi metodi di calcolo del *dilution rate* hanno rappresentato un ulteriore passaggio necessario per rendere quantitativamente interpretabili gli esperimenti. La corretta determinazione del *dilution rate* è infatti essenziale per correlare il ricambio di terreno con le prestazioni fermentative della coltura e per confrontare esperimenti condotti a differenti condizioni operative.

In via preliminare, è stato necessario caratterizzare il comportamento dei due ceppi mediante saggi di sedimentazione e fermentazioni in *batch*. Il confronto tra W105 e W105-Lys10 ha evidenziato una differenza significativa nella capacità di sedimentazione della biomassa. In particolare, il rapporto di arricchimento della frazione sedimentata è risultato progressivamente maggiore per il ceppo flocculante all'aumentare del tempo trascorso in condizioni statiche, mentre per W105 il rapporto è rimasto complessivamente prossimo all'unità. Questi risultati hanno fornito una prima evidenza sperimentale della capacità del sistema flocculante di favorire la separazione e la ritenzione della biomassa.

Le fermentazioni *batch* hanno costituito il riferimento necessario per interpretare i risultati ottenuti in coltura continua. Per entrambi i ceppi è stato osservato il consumo del lattosio già nelle prime 24 ore di fermentazione, accompagnato da un aumento della concentrazione di etanolo fino al raggiungimento di un valore massimo, seguito da una successiva diminuzione. Il comportamento complessivo dei due ceppi in *batch* è risultato comparabile sia in termini di resa sia di produzione di etanolo. Gli esperimenti *batch* condotti direttamente in Chi.Bio hanno inoltre permesso di verificare la compatibilità delle condizioni di coltura nella *vial* della piattaforma con quelle delle *falcon*, utilizzate nelle fermentazioni *batch* tradizionali.

La caratterizzazione del ceppo W105 in coltura continua ha permesso di evidenziare una relazione tra l'OD di lavoro, il *dilution rate* e le prestazioni fermentative. Gli esperimenti sono stati condotti a differenti valori di OD_{target} , corrispondenti a diverse fasi della crescita cellulare. All'aumentare dell'OD di lavoro è stata osservata una diminuzione del

dilution rate necessario per mantenere la coltura nella condizione impostata. I valori di OD più elevati corrispondono infatti a condizioni di crescita più lenta e, di conseguenza, ad un minore ricambio di terreno necessario per mantenere la densità cellulare.

L'analisi della concentrazione di etanolo ha mostrato una diminuzione della concentrazione allo *steady state* all'aumentare del *dilution rate*. Questo risultato evidenzia come il semplice raggiungimento di elevate concentrazioni di prodotto non sia sufficiente per identificare la condizione di processo più produttiva. Per questo motivo, il parametro maggiormente significativo per l'ottimizzazione della fermentazione continua è stato individuato nella produttività volumetrica, o *production rate*, calcolata come prodotto tra *dilution rate* e concentrazione di etanolo allo *steady state*.

L'andamento del *production rate* ottenuto per W105 ha mostrato una distribuzione a campana, con i valori più elevati in corrispondenza di condizioni intermedie di *dilution rate*, prossime ad OD 4. Questo risultato evidenzia la presenza di un compromesso tra due fenomeni contrapposti: a bassi *dilution rate* il ricambio di terreno è ridotto e, sebbene la concentrazione di etanolo possa risultare maggiore, la quantità di prodotto generata nell'unità di tempo rimane limitata; al contrario, a *dilution rate* elevati il ricambio di terreno è maggiore, ma la concentrazione di etanolo allo *steady state* diminuisce. La condizione intermedia permette quindi di combinare un'adeguata concentrazione di prodotto con un sufficiente ricambio di terreno, determinando il massimo *production rate* osservato per il ceppo W105.

Nel complesso, la caratterizzazione di W105 ha quindi permesso di individuare un intervallo di condizioni operative nel quale la coltura presenta le prestazioni fermentative più favorevoli e ha costituito il riferimento per lo studio successivo del ceppo W105-Lys10.

La seconda parte del lavoro è stata dedicata all'introduzione del ceppo flocculante W105-Lys10, con l'obiettivo di valutare se una maggiore ritenzione della biomassa potesse migliorare le prestazioni fermentative in coltura continua. Per caratterizzare questo costruito, la piattaforma è stata utilizzata in modalità chemostato, impostando diversi valori di *dilution rate* nei differenti esperimenti. Particolare attenzione è stata dedicata alla calibrazione delle pompe e alla definizione del *setup* sperimentale, in modo da garantire un volume della coltura il più possibile costante durante l'esperimento.

Durante le prove sperimentali sono stati confrontati due protocolli caratterizzati da differenti tempi di crescita iniziale. Il primo prevedeva circa 13 ore di crescita *batch* con *stirring ON* prima dell'avvio della coltura continua, mentre il secondo prevedeva 24 ore in cui si alternavano 50 minuti di *stirring ON* e 10 di *stirring OFF*. Questa modifica ha determinato una differenza evidente nelle condizioni della coltura, poiché nel secondo caso è stata osservata una maggiore formazione di *biofilm*.

I risultati ottenuti con W105-Lys10 hanno evidenziato un comportamento della concentrazione di etanolo simile a quello osservato per W105. Anche in questo caso, all'aumentare del *dilution rate* la concentrazione di etanolo allo *steady state* tende a diminuire. La sola concentrazione di prodotto non rappresenta quindi un parametro sufficiente per valutare il vantaggio derivante dall'utilizzo del ceppo flocculante. L'analisi del *production rate* ha invece evidenziato una differenza più marcata tra i due sistemi.

Il ceppo W105-Lys10 ha infatti raggiunto valori di *production rate* superiori rispetto a quelli ottenuti con W105 nelle condizioni sperimentali analizzate. In particolare, i valori massimi ottenuti con W105-Lys10 sono risultati dell'ordine di 2 g/(L·h), mentre il valore massimo osservato per W105 è risultato dell'ordine di 1 g/(L·h). I valori più elevati per W105-Lys10 sono stati osservati negli esperimenti caratterizzati dalla crescita iniziale di 24 ore e dalla conseguente formazione di *biofilm*. Questo risultato è particolarmente rilevante nell'ottica dello sviluppo di una coltura continua ad alta densità cellulare, poiché suggerisce che il mantenimento della biomassa all'interno del bioreattore possa consentire di ottenere una maggiore produttività rispetto a una coltura nella quale la biomassa è prevalentemente sospesa.

L'osservazione diretta delle *vial* ha fornito un'ulteriore evidenza della ritenzione della biomassa. Durante gli esperimenti con W105-Lys10 è stata infatti osservata una marcata adesione cellulare sia al pescante in silicone sia alle pareti in vetro della *vial*, con la formazione di *biofilm*.

Nel complesso, il confronto tra W105 e W105-Lys10 mostra un aumento della produttività volumetrica associato all'utilizzo del ceppo flocculante nelle condizioni sperimentali considerate.

Un ulteriore elemento emerso dal lavoro riguarda quindi l'importanza del *setup* sperimentale nella progettazione di una fermentazione continua. Nel caso di W105-Lys10, la presenza del *biofilm* modifica, infatti, la distribuzione della biomassa all'interno del bioreattore e può influenzare sia la misura dell'OD sia il comportamento apparente della coltura rispetto al ricambio di terreno. Una parte della biomassa può infatti trovarsi al di fuori della zona di misura del *detector* ottico e non essere quindi rappresentata direttamente dal valore di OD registrato. Questo aspetto deve essere considerato nell'interpretazione dei dati e rappresenta uno dei principali limiti della caratterizzazione effettuata.

Nonostante queste limitazioni, i risultati ottenuti dimostrano la possibilità di utilizzare una piattaforma di bioreattori su piccola scala per sviluppare e confrontare differenti condizioni di fermentazione continua e per studiare strategie di ritenzione della biomassa. Il lavoro ha permesso di passare da una prima fase di caratterizzazione del sistema e di ottimizzazione del *setup* a una successiva fase di caratterizzazione delle prestazioni fermentative dei due ceppi.

I risultati ottenuti permettono inoltre di individuare alcune possibili direzioni per lo sviluppo futuro del processo. Una prima prospettiva consiste nell'approfondire lo studio del ceppo W105-Lys10 in condizioni di coltura continua: è di interesse effettuare esperimenti più duraturi nel tempo, al fine di verificare la stabilità della formazione del *biofilm* e della produttività raggiunta. Un processo continuo destinato a un'applicazione produttiva deve infatti mantenere prestazioni sufficientemente stabili per periodi significativamente più lunghi rispetto alla durata degli esperimenti condotti nel presente lavoro.

Un secondo sviluppo potrebbe riguardare l'ottimizzazione del ruolo della fase di crescita iniziale. I risultati ottenuti suggeriscono infatti che il prolungamento della crescita prima dell'avvio della coltura continua favorisca la formazione del *biofilm* e sia associato a valori maggiori di *production rate*. Sarebbe quindi interessante valutare sistematicamente differenti tempi di crescita iniziale, individuando la condizione che consenta di ottenere la maggiore quantità di biomassa trattenuta senza compromettere la stabilità del processo.

Un'ulteriore prospettiva riguarda il possibile riutilizzo del sistema di *biofilm* formato sul pescante in silicone. Il pescante colonizzato potrebbe infatti costituire una sorgente di

biomassa che potrebbe essere utilizzata come inoculo per una successiva fermentazione. Questa strategia permetterebbe di ridurre il tempo necessario per raggiungere elevate densità cellulari e potrebbe favorire l'implementazione di processi caratterizzati da una fase di avviamento più rapida.

Infine, un ulteriore sviluppo potrebbe riguardare la modalità di agitazione della coltura. Nel caso del ceppo W105-Lys10, la presenza di biomassa aggregata e adesa alle superfici potrebbe rendere possibile una revisione del protocollo di sedimentazione utilizzato per favorire la ritenzione cellulare. In particolare, si può valutare la possibilità di ridurre o eliminare i periodi di spegnimento dell'agitazione, verificando se la biomassa trattenuta dal sistema rimanga sufficientemente stabile anche in condizioni di *stirring* continuo. Tale modifica potrebbe permettere di semplificare ulteriormente il funzionamento del processo. Una volta definiti protocolli stabili e riproducibili per questo tipo di coltura, sarà interessante valutare le prestazioni del ceppo flocculante non più in terreno di laboratorio, ma utilizzando matrici di scarto provenienti dall'industria casearia. Questo permetterebbe di estendere i risultati già ottenuti dal laboratorio in questo ambito, valutando al contempo il potenziale impiego del ceppo in un contesto più vicino a una reale applicazione industriale.

In conclusione, il lavoro svolto ha permesso di caratterizzare le prestazioni di un ceppo di *E. coli* etanologeno in coltura continua e di valutarne il miglioramento mediante l'introduzione di una strategia di ritenzione della biomassa. La caratterizzazione del ceppo W105 ha consentito di individuare condizioni intermedie di crescita associate ai maggiori valori di *production rate*, fornendo un riferimento quantitativo per il confronto con il ceppo W105-Lys10. L'utilizzo di quest'ultimo ha evidenziato una maggiore capacità di mantenere la biomassa all'interno del bioreattore, attraverso la formazione di *biofilm*, e valori di produttività volumetrica superiori rispetto al ceppo non flocculante.

Nel complesso, i risultati ottenuti supportano l'interesse verso l'utilizzo di strategie di ritenzione della biomassa per l'ottimizzazione di processi fermentativi continui ad alta densità cellulare. Il lavoro costituisce quindi una base sperimentale per successive attività di ottimizzazione della coltura continua e per lo sviluppo di sistemi di fermentazione maggiormente efficienti e stabili.

Bibliografia

- [1] K. L. Garner. Principles of synthetic biology. Essays Biochem (2021), <https://doi.org/10.1042/EBC20200059>.
- [2] M. A. J. Roberts et al. Synthetic biology: biology by design, Microbiology (2013), <https://doi.org/10.1099/mic.0.069724-0>.
- [3] Ana R. Prazeres, Fátima Carvalho, Javier Rivas, Cheese whey management: A review, Journal of Environmental Management, Volume 110, (2012), Pages 48-68, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.
- [4] Macwan SR et al. Whey and its utilization, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 5.8, (2016), 134–155, <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016>.
- [5] Pedro MR Guimarães, José A Teixeira, and Lucília Domingues. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey, Biotechnology Advances 28.3, (2010), pp. 375–384, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>.
- [6] Siti Hajar Mohd Azhar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik, Kenneth Francis Rodrigues, Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, Biochemistry and Biophysics Reports, Volume 10, (2017), Pages 52-61, ISSN 2405-5808, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.
- [7] F.W. Bai, W.A. Anderson, M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, Biotechnology Advances, Volume 26, Issue 1, (2008), Pages 89-105, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>.

- [8] Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M. G., & Magni, P. (2017), Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli*, *BMC biotechnology*, 17(1), 48, <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0369-y>.
- [9] Pasotti, L., De Marchi, D., Casanova, M., Massaiu, I., Bellato, M., Cusella De Angelis, M. G., Calvio, C., & Magni, P. (2020), Engineering endogenous fermentative routes in ethanologenic *Escherichia coli* W for bioethanol production from concentrated whey permeate, *New biotechnology*, 57, 55–66, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.02.004>.
- [10] Pasotti et al., (2023), Design of a stable ethanologenic bacterial strain without heterologous plasmids and antibiotic resistance genes for efficient ethanol production from concentrated dairy waste, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16:57, <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02298-z>.
- [11] Dong, Y., Zhang, Y., Liu, D. et al. Strain and process engineering toward continuous industrial fermentation, *Front. Chem. Sci. Eng.* 17, 1336–1353 (2023), <https://doi.org/10.1007/s11705-022-2284-6>.
- [12] R.J. Kadner and K. Rogers, *Bacteria*, Encyclopedia Britannica, (2024), <https://www.britannica.com/science/bacteria>.
- [13] Y. Yang., A Beginner’s Guide to Bioprocess Modes – Batch, Fed- Batch, and Continuous Fermentation”. In: Eppendorf’s Application Note, no. 408, pp. 1-16 (2019), <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:199553116>.
- [14] A.K. Srivastava and S. Gupta, 2.38 - Fed-Batch Fermentation – Design Strategies, *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition), (2011), <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00112-4>.

- [15] J.G. Kuenen and O.J. Johnson, Continuous Cultures (Chemostats), Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), (2009), <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00112-7>.
- [16] Datta S, Christena LR, Rajaram YR, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, 3 Biotech, (2013) Feb;3(1):1-9, <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- [17] de Carvalho C. C. (2017), Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry, Microbial biotechnology, 10(2), 250–263, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12363>.
- [18] Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013), Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, Chemical Society reviews, 42(15), 6223–6235, <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- [19] Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016), Biofilms: an emergent form of bacterial life, Nature reviews, Microbiology, 14(9), 563–575, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- [20] Gilbert, C., & Ellis, T. (2019), Biological engineered living materials: growing functional materials with genetically programmable properties, ACS Synthetic Biology, 8(1), 1–15, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00423>.
- [21] Nguyen, P. Q., & D. J. et al. (2018), Engineered living materials: prospects and challenges for using biological systems to create functional materials, Advanced Materials, 30(19), 1704847, <https://doi.org/10.1002/adma.201704847>.
- [22] Sarah B. Browning, Davide Prati, Luca Mascia, Paolo Magni, Lorenzo Pasotti, Sara Molinari; De Novo Engineered Living Materials via Elastin-Like Polypeptide-Mediated Self-Assembly, ACS Synth. Biol. 19 June 2026; 15 (6): 2424–2434, <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6c00073>.

- [23] Ojima, Y., Azuma, M. & Taya, M., Inducing flocculation of non-floc-forming *Escherichia coli* cells. *World J Microbiol Biotechnol* 34, 185 (2018), <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2563-z>.
- [24] Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2009), Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production, *Biotechnology advances*, 27(6), 849–856, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.006>.
- [25] Dugan PR, Stoner DL. Some factors affecting floc formation by *Zoogloea ramigera*, strain I-16-M, *Water Research* (1977), [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(77\)90181-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(77)90181-6).
- [26] Giri, S. S., Harshiny, M., Sen, S. S., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2015), Production and characterization of a thermostable bioflocculant from *Bacillus subtilis* F9, isolated from wastewater sludge, *Ecotoxicology and environmental safety*, 121, 45–50, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.010>.
- [27] Soares E. V. (2011), Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review, *Journal of applied microbiology*, 110(1), 1–18, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>
- [28] Li Y. et al. Flocculation mechanism of *Aspergillus niger* on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass, *Algal Research* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.001>.
- [29] Lee, J., Cho, D. H., Ramanan, R., Kim, B. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2013), Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*, *Bioresource technology*, 131, 195–201, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.130>.
- [30] Supplementary Information, Chi.Bio: An open-source automated experimental platform for biological science research. Harrison Steel, Robert Habgood, Ciarán Kelly, and Antonis Papachristodoulou.

[31] Ohstrom AM, Buck AE, Du X and Wee J (2023), Evaluation of *Kluyveromyces* spp. for conversion of lactose in different types of whey from dairy processing waste into ethanol, *Front. Microbiol.* 14:1208284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1208284>.

Appendice

A. Colture *overnight* per inoculo in Chi.Bio

Di seguito è riportato come vengono preparate le colture cresciute *overnight* necessarie per la successiva diluizione in Chi.Bio. In sterilità si prepara una *falcon* da 50mL contenente 8mL di LB POV e 2mL di lattosio 200g/L entrambi come da ricetta in Sezione 2.2. Nel brodo di coltura viene stemperata una colonia di W105 da piastra, precedentemente strisciata da *stock* in glicerolo (conservato a -80°C).

Quando si fa uso di ceppi contenenti plasmidi con resistenza antibiotica, al brodo prima descritto si aggiunge l'antibiotico necessario. Nel caso di questo elaborato si utilizza W105-Lys10 contenente resistenza all'antibiotico Kanamicina e quindi se ne aggiungono 10 μ L per una coltura di 10mL.

B. Calibrazione del *detector* di OD di Chi.Bio e Tecan e conversione in OD reale

Per effettuare un preciso lavoro di analisi è stato necessario calibrare i *detector* di *optical density* (OD) degli strumenti utilizzati: Tecan (Sezione 2.4) e Chi.Bio (Sezione 2.5).

Il protocollo utilizzato per la calibrazione del Tecan consiste nel procedere con cinque diluizioni seriali 1:3 di una coltura cresciuta *overnight* e misurarne l'OD, a questa misura viene poi sottratto il *blank* (OD del terreno senza inoculo). Di seguito viene riportato un grafico di OD sulle diluizioni, nella zona di linearità dello strumento, ed è generata una retta di regressione da cui se ne ricava il coefficiente angolare (**Figura B.1**). Grazie a questo dato si riesce a risalire alla misura di OD_{reale} effettuata dallo strumento.

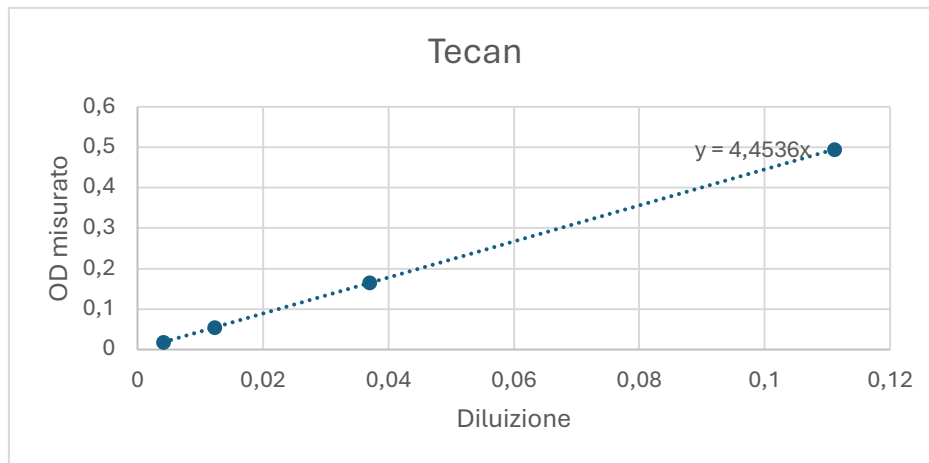


Figura B.1: Retta di regressione per $OD_{misurato}$ in Tecan.

Il procedimento per la calibrazione del *detector* di Chi.Bio è lo stesso: anche in questo caso viene generata la retta di regressione (**Figura B.2**) che permette di trovare i valori di OD_{reale} .

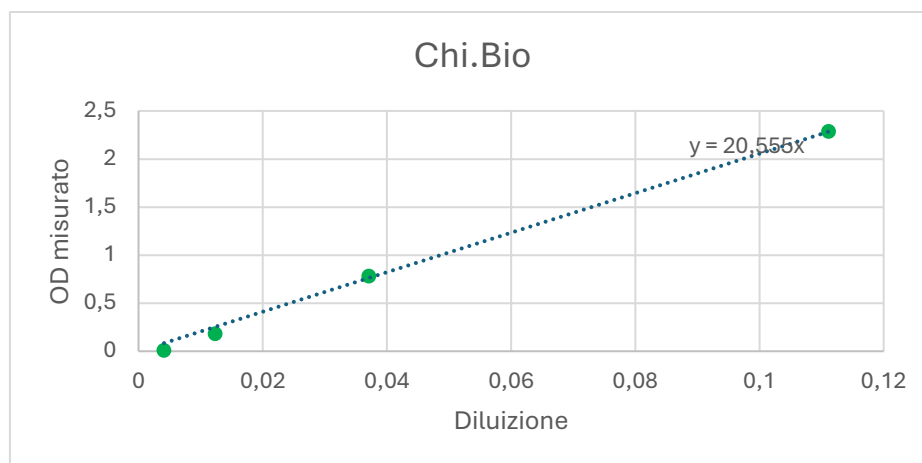
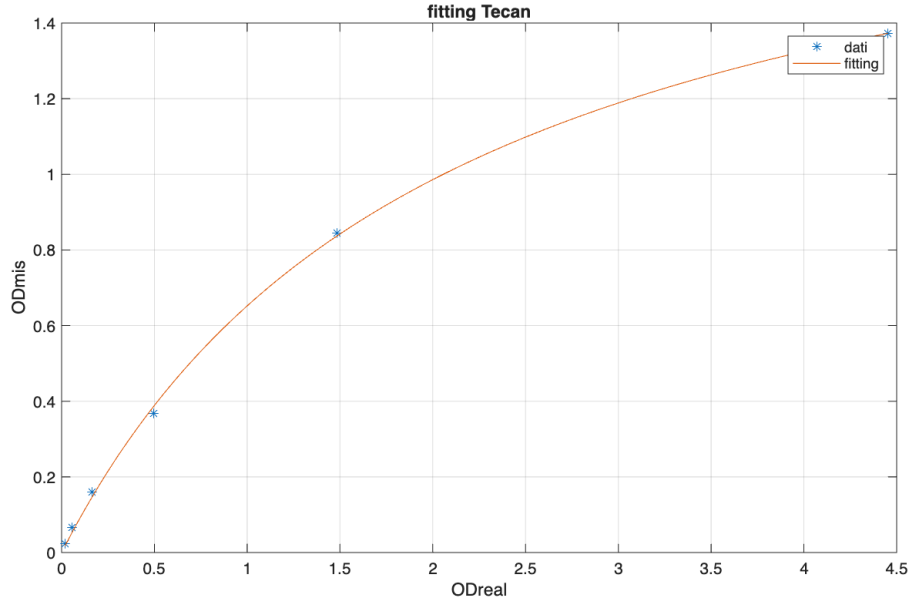


Figura B.2: Retta di regressione per $OD_{misurato}$ in Chi.Bio.

È opportuno trovare il fattore che permette di trasformare le misure effettuate in Chi.Bio in unità Tecan e viceversa. Si effettua, quindi, il rapporto tra le misure eseguite dai due strumenti e il fattore di conversione $OD_{reale\ Chi.Bio} - OD_{reale\ Tecan}$ risulta 4,615.

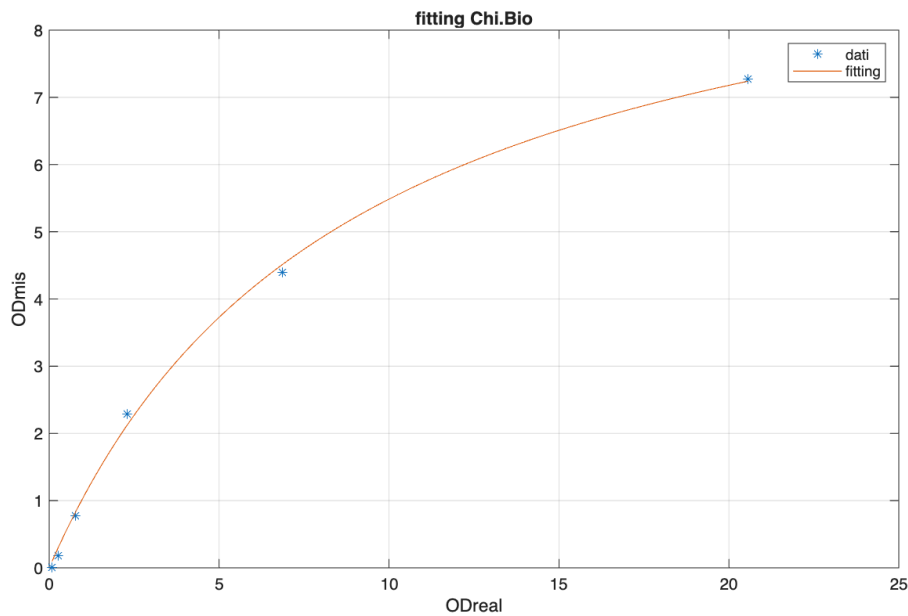
È stato effettuato un *fitting* dei dati di $OD_{misurato}$ e OD_{reale} con entrambi gli strumenti al fine di ricavare i parametri che permettono la conversione in valori di OD_{reale} data la misura. È stato scritto un codice MATLAB che, una volta scelto un modello di tipo *Michaelis-Menten* e utilizzando i dati di $OD_{misurato}$ e OD_{reale} , attraverso la funzione

lsqnonlin, ricava i parametri del modello. Di seguito sono riportati i grafici ottenuti per Chi.Bio (**Figura B.3**) e per Tecan (**Figura B.4**) e le rispettive formule di conversione di $OD_{misurato}$ in OD_{reale} .



$$OD_{real} = \frac{OD_{mis} \cdot 2,0965}{2,0194 - OD_{mis}}$$

Figura B.3: Fitting dei dati sul modello per Tecan.



$$OD_{real} = \frac{OD_{mis} \cdot 8,9286}{10,3839 - OD_{mis}}$$

Figura B.4: Fitting dei dati sul modello per Chi.Bio.

C. Fermentazioni *batch* di W105 e W105-Lys10

Al fine di avere dati da cui partire per operare un confronto consapevole con quanto restituito dalle fermentazioni in continua in Chi.Bio, sono state implementate fermentazioni tradizionali *batch* sia del ceppo non flocculante W105 sia di quello flocculante W105-Lys10.

Le fermentazioni sono state effettuate in *falcon* da 50mL con 15mL di terreno di coltura (12mL LB POV + 3mL Lac 200g/L). Nel caso di W105-Lys10 è stato aggiunto anche antibiotico Kanamicina (15 μ L). Gli esperimenti per entrambi i ceppi sono realizzati in triplicato al fine di valutarne la ripetibilità, per un totale di 6 *falcon* con fermentazione *batch*. Sono operati campionamenti equispaziati nel tempo a distanza di 24 ore l'uno dall'altro, risultando, quindi, 3 campionamenti per *falcon* ($T_0 = 0h$, $T_1 = 24h$ e $T_2 = 48h$). I campioni prelevati e filtrati sono stati poi analizzati con HPLC.

Di seguito si riportano i grafici della concentrazione di lattosio nel tempo (**Figura C.1**) e di etanolo nel tempo (**Figura C.2**) per il ceppo etanologeno non flocculante W105. Il lattosio si esaurisce già dopo 24 ore, mentre l'etanolo raggiunge un picco per poi tendere a diminuire col passare del tempo.

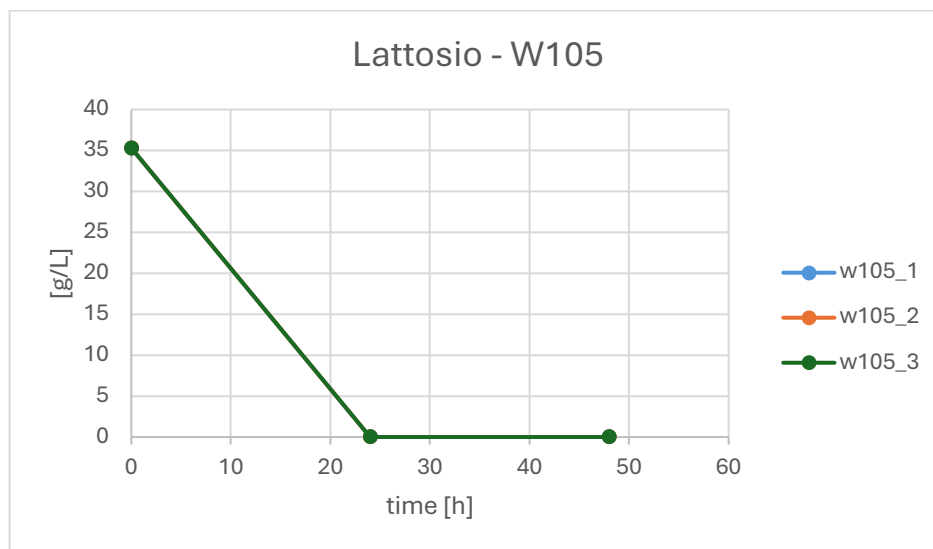


Figura C.1: Concentrazione di lattosio nel tempo per fermentazioni *batch* di W105.

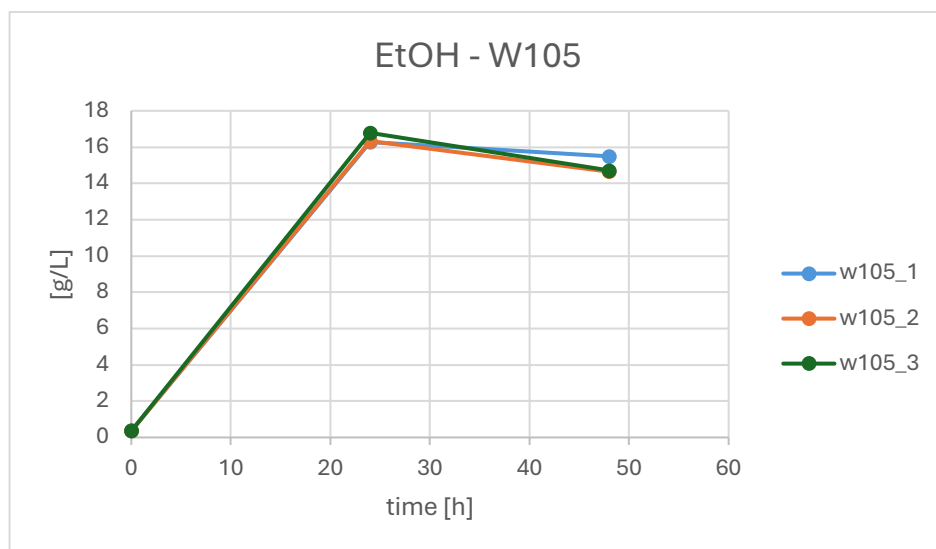


Figura C.2: Concentrazione di etanolo nel tempo per fermentazioni *batch* di W105.

A seguire i grafici della concentrazione di etanolo nel tempo (**Figura C.3**) e di lattosio nel tempo (**Figura C.4**) per il ceppo etanogenico flocculante W105-Lys10. Anche in questo caso il lattosio si esaurisce già dopo 24 ore, mentre l'etanolo cresce fino ad un picco e poi tende a decrescere nel tempo.

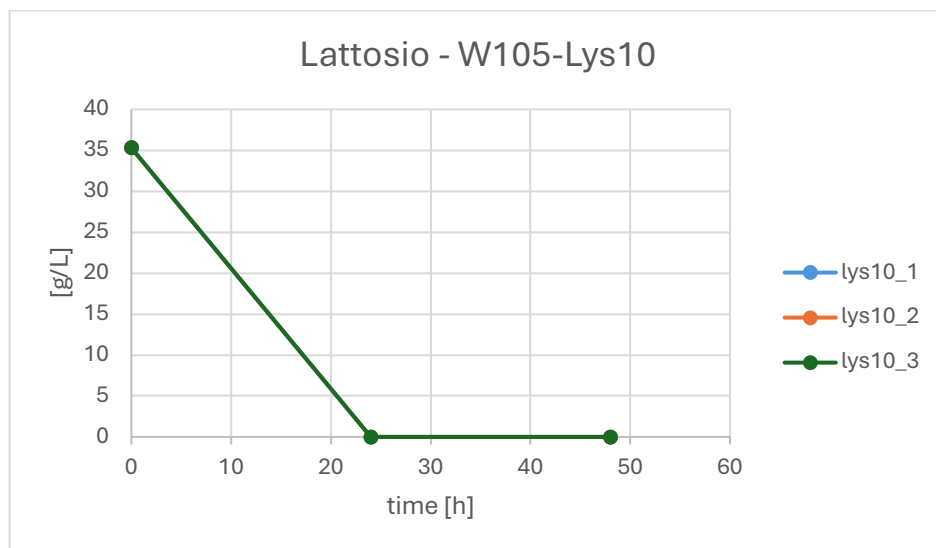


Figura C.3: Concentrazione di lattosio nel tempo per fermentazioni *batch* di W105-Lys10.

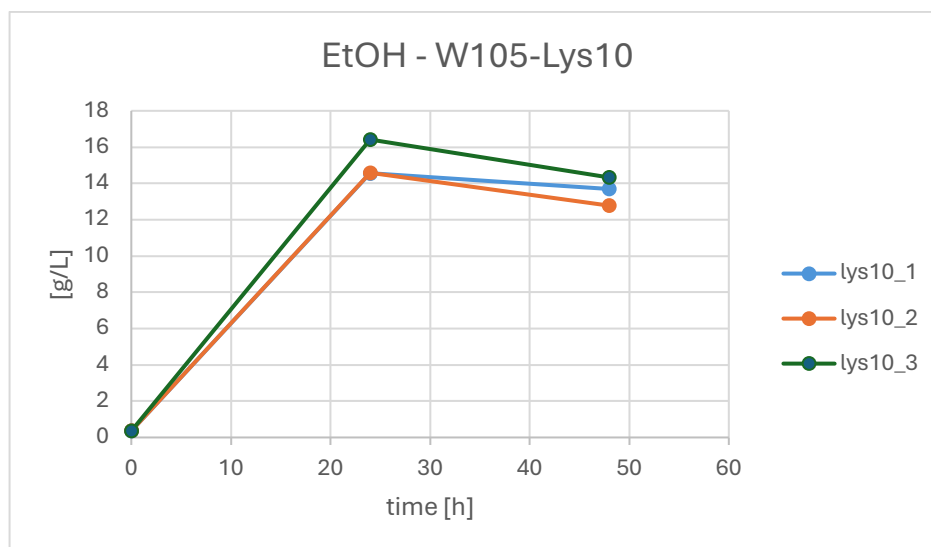


Figura C.4: Concentrazione di etanolo nel tempo per fermentazioni *batch* di W105-Lys10.

Dai grafici sopra riportati si può notare che i due ceppi sono del tutto paragonabili per quanto riguarda la resa in etanolo.

Gli stessi esperimenti sono stati effettuati anche in Chi.Bio in modalità *batch* e hanno restituito risultati concordi, al fine di poter affermare che una *vial* da 20mL in Chi.Bio garantisce le stesse proprietà di agitazione e aereazione di una *falcon* da 50mL in incubatore dinamico a 37°C a 220rpm.

D. Protocollo per test di sedimentazione di W105-Lys10

Per effettuare un test di sedimentazione efficiente del ceppo flocculante W105-Lys10 si è scritto un accurato protocollo sperimentale. Gli *step* che lo compongono sono riportati di seguito:

1. Crescita di una coltura *overnight* in 15mL, indotta con HSL 2nM.
2. Agitare bene la coltura e misurare OD in Tecan diluendo il campione 1:4 con LB POV per evitare di raggiungere la zona di saturazione dello strumento. Questa rappresenta la misura all'istante T_0 .

3. Suddividere la coltura in quattro provette di cui tre contenenti 4,5mL e l'ultima contenente 1,5mL.
4. Posizionare le provette in un *rack* in incubatore statico a 37°C con cronometro acceso.
5. Dopo $T_1 = 5min$, misurare l'OD del surnatante della prima provetta, campionando 50μL e aggiungendo 150μL di terreno direttamente in micropiastra (diluizione 1:4).
6. Rimuovere con cautela tutto il surnatante lasciando 50μL di *pellet*.
7. Fotografare il fondo della provetta contenente i 50μL rimanenti e lasciarla sul bancone.
8. Ripetere step 5., 6., 7. per le altre due provette a $T_2 = 10min$ e $T_3 = 15min$.
9. Dopo i tre campionamenti agitare i 50μL restanti nel fondo delle provette, fotografarli vicini per individuare torbidità differenti e misurare l'OD di queste colture sature. Per restare nella zona di linearità dello strumento utilizzato è necessario fare una diluizione 1:16.
10. Campionare anche la coltura da 1,5mL, come controllo per verificarne la saturazione e quindi la mancata crescita nel tempo necessario per il test di sedimentazione.

Grazie a questo protocollo si hanno misure a diversi istanti di campionamento delle densità ottiche di una coltura satura e dell'arricchimento del sedimento.

E. Portata delle pompe di *input* e *output* dei reattori Chi.Bio

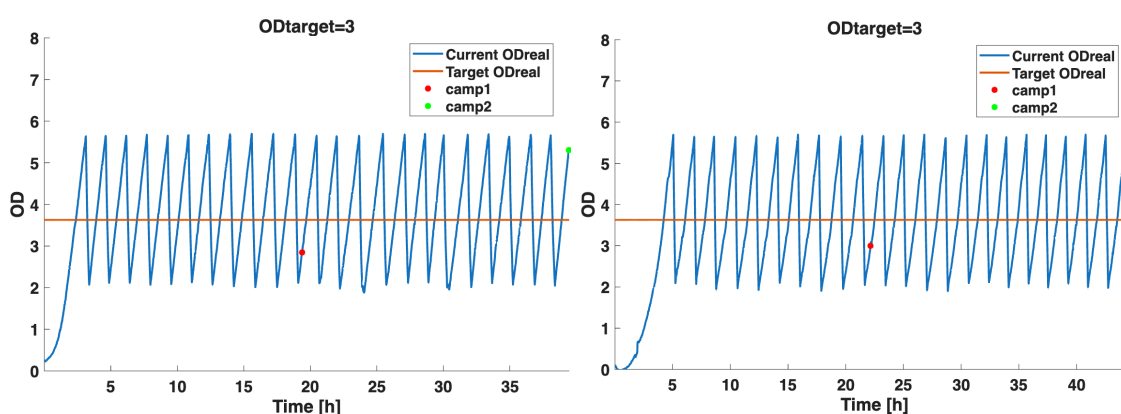
Al fine di riuscire ad implementare un chemostato efficiente è necessario impostare correttamente i *rate* di attivazione delle pompe in *input* ed in *output* al bioreattore. Per questo scopo è stato fondamentale valutare la portata di ogni pompa in quanto sono soggette ad una grande variabilità dettata da vari fattori intrinseci al *setup*, tra cui l'inspessimento tra il tubo e l'allocazione della pompa. Di seguito viene riportata una tabella contenente le portate delle pompe associate ai tre bioreattori utilizzati (**Tabella E.1**).

<i>Reattore</i>	<i>Pompa</i>	<i>Portata [mL/s]</i>
M1	Input	1,6667
	Output	1,6042
M2	Input	1,9271
	Output	1,9271
M3	Input	2,2137
	Output	1,8518

Tabella E.1: Portata delle pompe in *input* e *output* dei reattori Chi.Bio.

F. Tracciati di OD del ceppo non flocculante rilevati dal *detector* di Chi.Bio

Di seguito vengono riportati per completezza i tracciati di OD rilevati dal *detector* di Chi.Bio durante gli esperimenti con il ceppo non flocculante W105 (**Figura F.1**). I valori sono convertiti in densità ottica reale grazie alla calibrazione del *detector* come da Appendice B. In ogni grafico sono riportati anche gli istanti di campionamento, che ricadono sempre in una fase di crescita dell'OD, successiva alla diluizione.



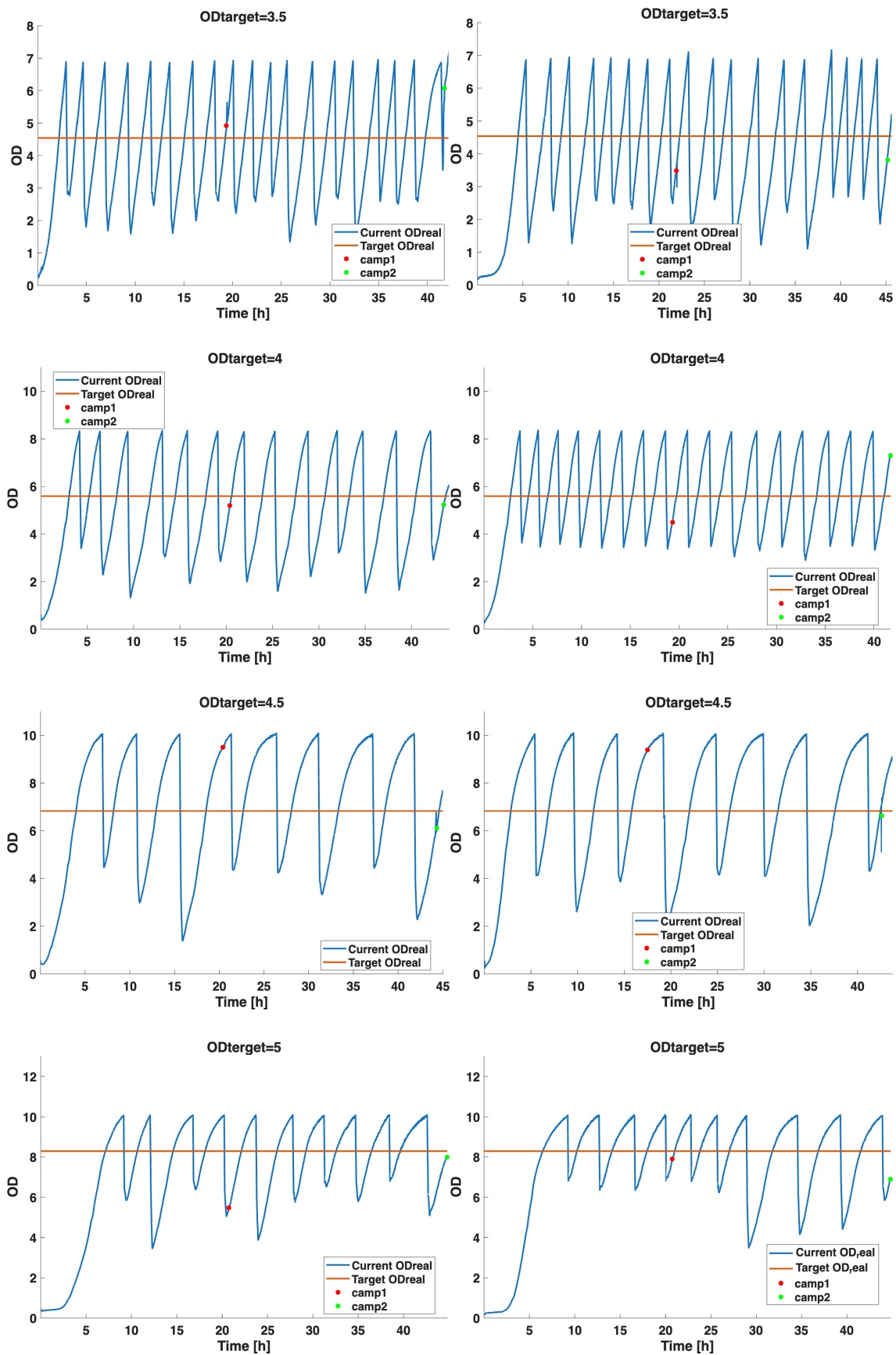
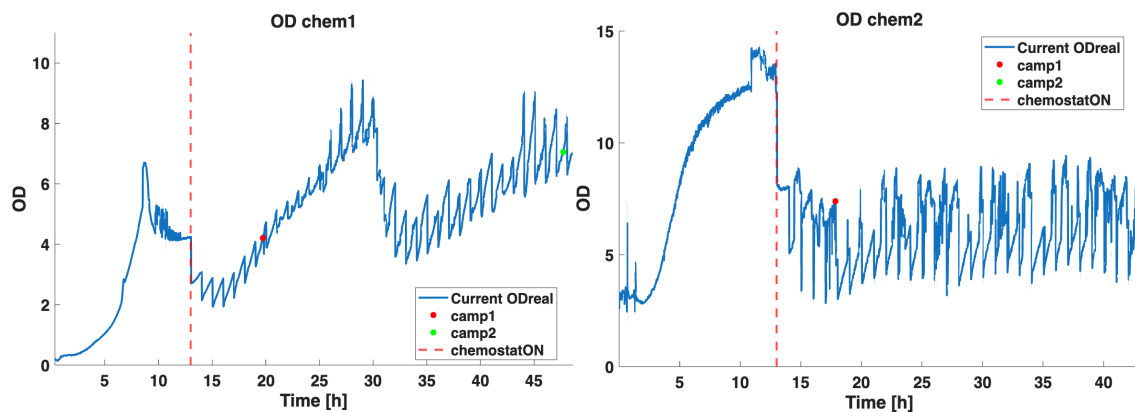


Figura F.1: Tracciati di densità ottica rilevati dal *detector* di Chi.Bio per il ceppo non flocculante. I grafici presentano i punti di campionamento. A sinistra le prime repliche a destra le seconde.

G. Tracciati di OD del ceppo flocculante rilevati dal *detector* di Chi.Bio

Di seguito vengono riportati i tracciati di OD rilevati dal *detector* di Chi.Bio durante gli esperimenti con il ceppo flocculante W105-Lys10. I valori sono convertiti in densità ottica reale grazie alla calibrazione del *detector* come da Appendice B. In ogni grafico sono riportati anche gli istanti di campionamento, che ricadono sempre in una fase di crescita dell'OD, successiva alla diluizione.

Questi grafici, rispetto a quelli in Appendice G, risultano meno chiari in quanto il pescante del tappo di Chi.Bio è stato allungato con un tubo in silicone, il quale influisce sulle rilevazioni del *detector*. Si nota comunque, dopo le 24 ore di batch, un accumulo all'interno della *vial* e quindi un parziale aumento dell'OD dopo varie diluizioni, indice dell'aumento della densità ottica della coltura. L'accumulo non sempre è evidente in quanto la formazione di *biofilm* non è omogenea e quindi non viene sempre sul raggio di rilevazione del *detector*.



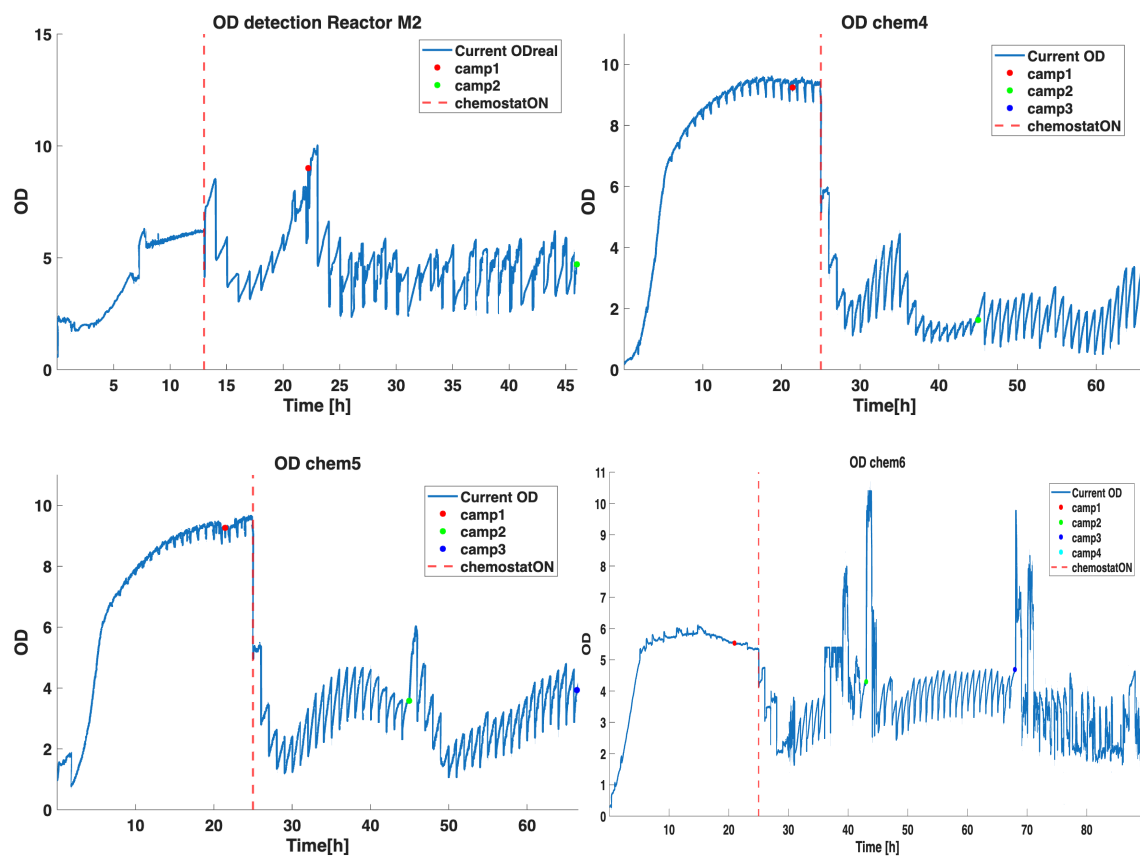


Figura G1. Tracciati di densità ottica rilevati dal *detector* di Chi.Bio per il ceppo flocculante. I grafici presentano i punti di campionamento.