



C_AⁱS_iA_L

INNOVAZIONE & SVILUPPO
DELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

bobcat Fondazione
CARIPLO



Università degli Studi di Napoli Federico II

Produzione di cellule vegetali su scala industriale. Strategie per l'aumento della sostenibilità

Antonio Luca Langellotti

PRODOTTI COSMETICI,
NUTRACEUTICI E
BIOPLASTICHE DAL CARDO

Zoom Webinar
27 GENNAIO 2021
10,30 - 12,00



PRODUZIONE DI CELLULE DI PIANTE DAL LABORATORIO ALL'INDUSTRIA

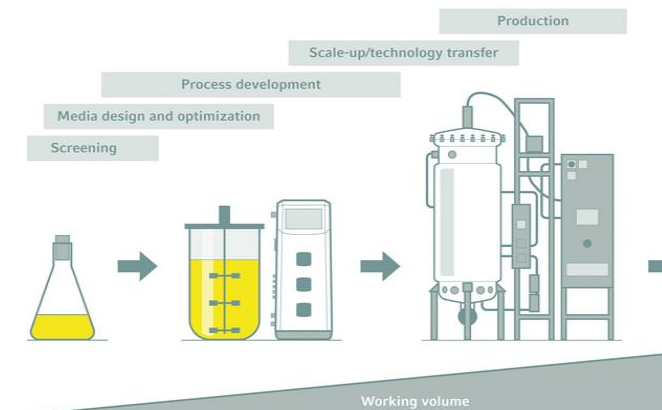
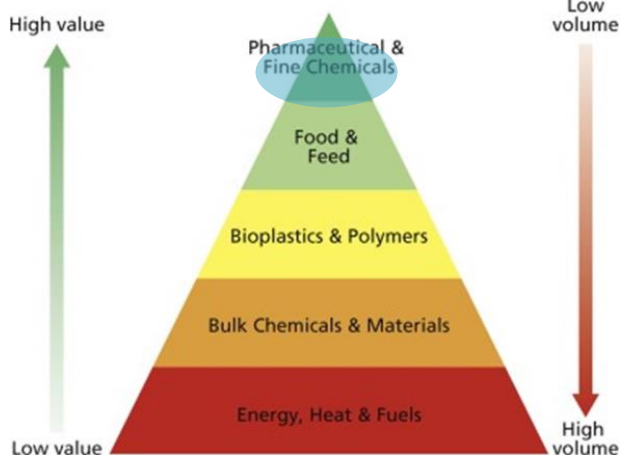


Image credit: Eppendorf Handling Solution



Ambiente di produzione su scala commerciale drasticamente differente da quello di laboratorio dove la configurazione tipo è una beuta chiusa su un orbital shaker.

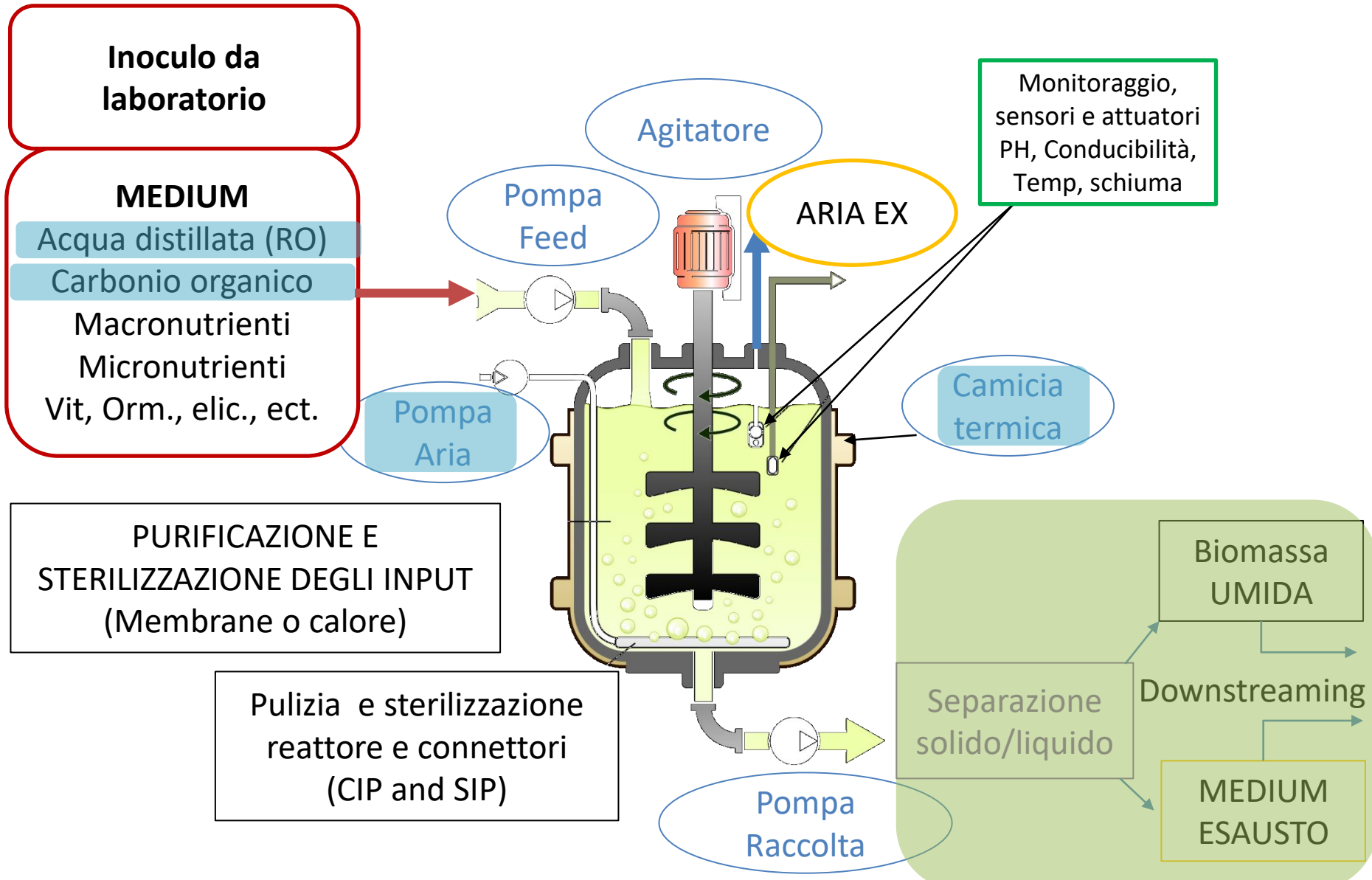
E' ampiamente riconosciuto che moltissime piattaforme di produzione cellulare non rispettano le performances qualitative e quantitative di laboratorio nello scale-up.

Il costo stimato di scale-up per gradi volumi di un nuovo bulk chemical di interesse è stimato da 100 a 1000 M\$*.

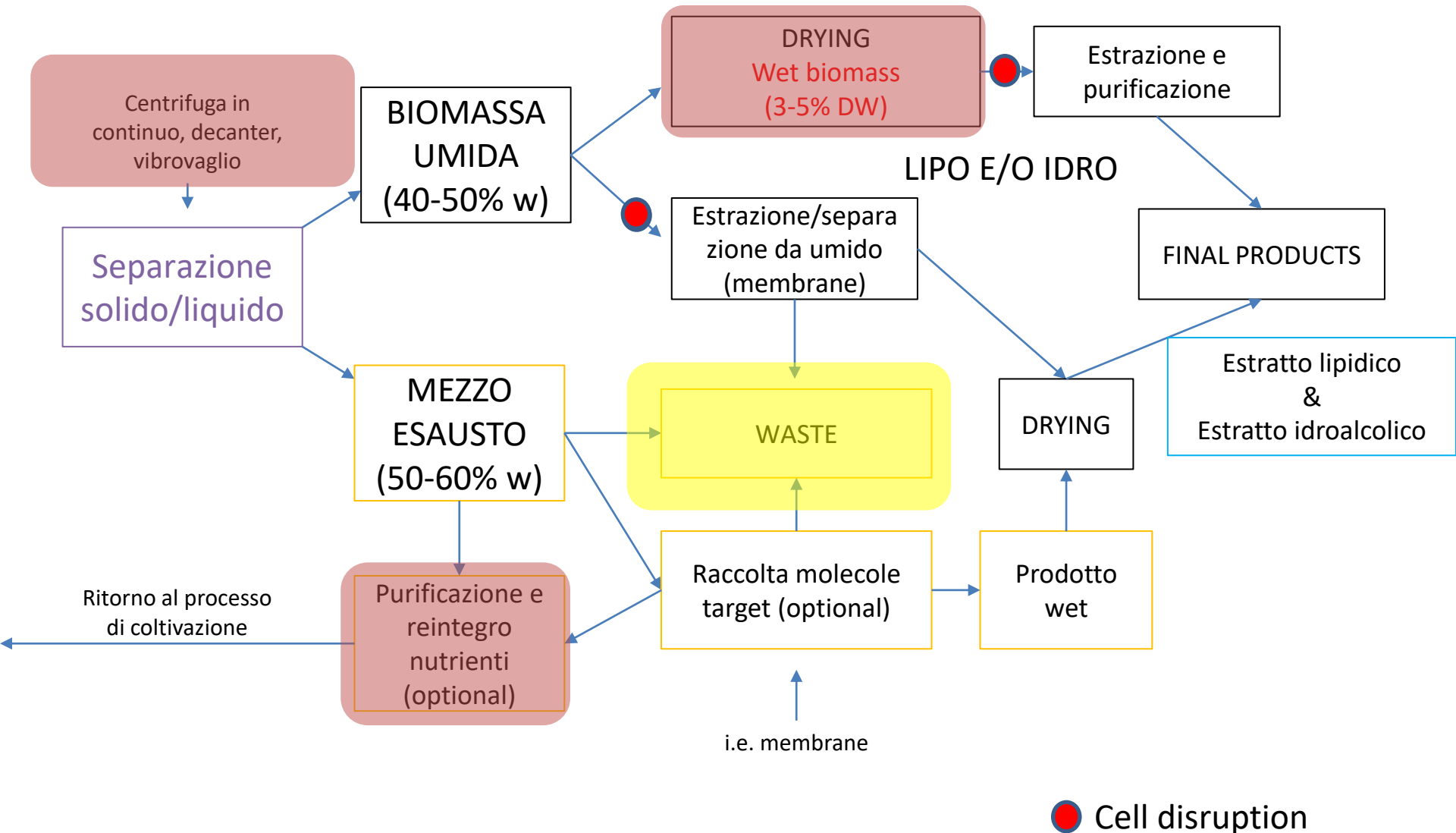
Le cellule vegetali per le loro caratteristiche peculiari presentano aggiuntive problematiche da affrontare nello scale-up rispetto a produzioni biotecnologiche più consolidate.

*Crater & Lievense, 2018

INPUT DI ENERGIA E MATERIA NEL PROCESSO DI PRODUZIONE - UPSTREAM



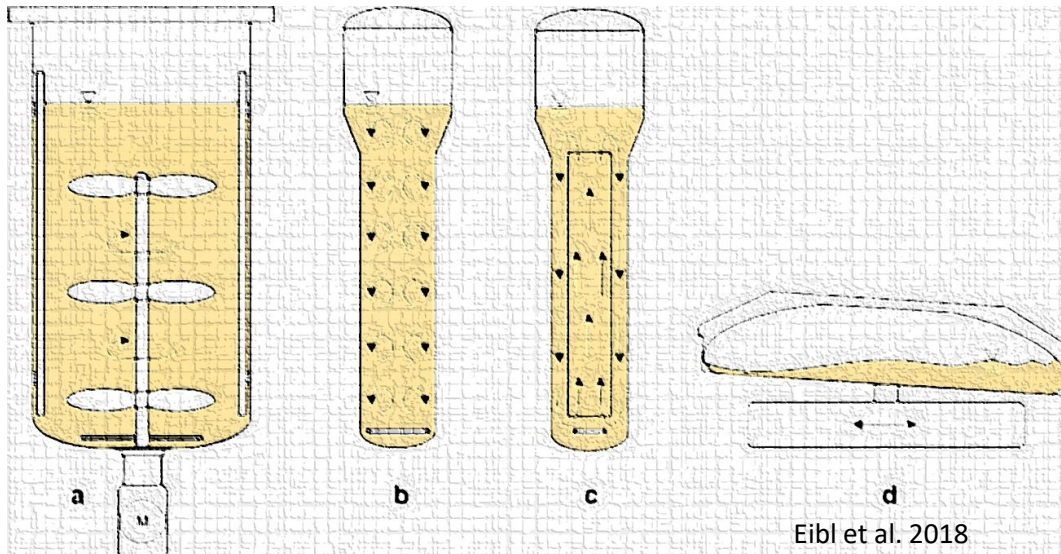
BOTTLENECKS IN DOWNSTREAM PLANT CELL SUSPENSION PROCESSING



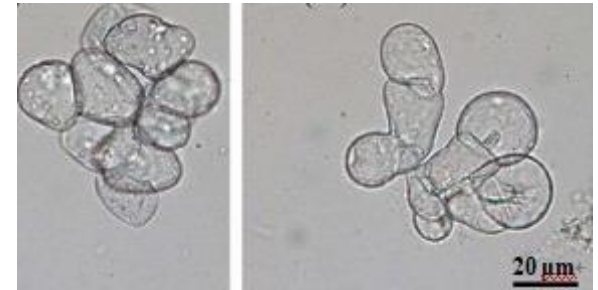
Particolarità delle sospensioni cellulari vegetali

- Le sospensioni cellulari vegetali si comportano come fluidi non-newtoniani
- Elevata variabilità della morfologia cellulare, della crescita e del pattern metabolico
- Caratteristiche reologiche della sospensione cellulare variabili in considerazione della progressiva crescita cellulare, del tipo cellulare del grado di aggregazione (cell adhesion) e progressivo accumulo di polisaccaridi nel mezzo.

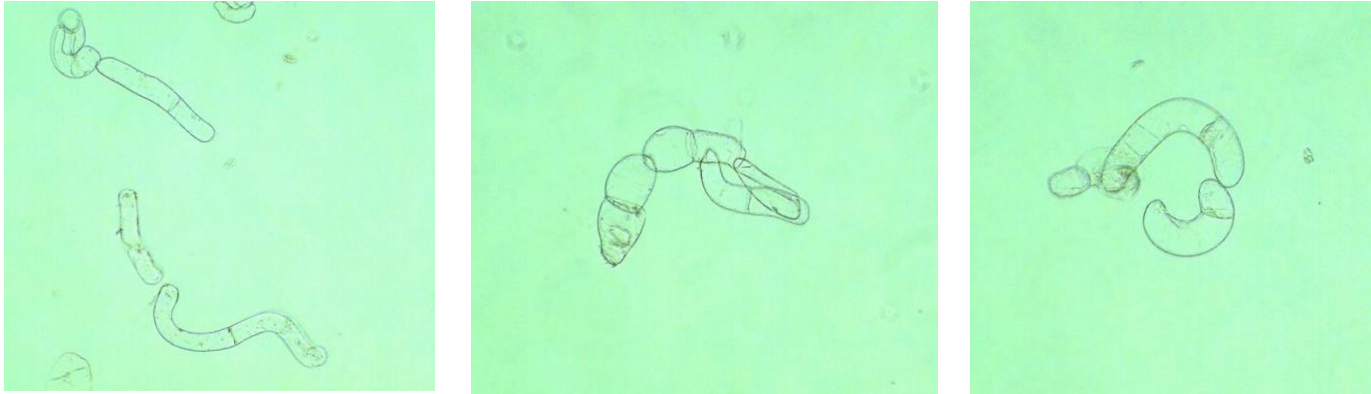
PRINCIPALI CONFIGURAZIONI DEI REATTORI INDUSTRIALI



A- stirred tank; B – Bubble column; C – Airlift; D – Wave mixing



Morfologia cellulare delle cellule di cardo



Nelle colture in sospensione durante le prime due settimane si osserva una prevalenza di cellule tonde e più piccole in piena fase di crescita (fino all'80%). Nella terza e quarta settimana il rapporto progressivamente si inverte e dopo quattro settimane quasi il 100% presenta forma fortemente allungata.

Il grado e la prevalenza di cellule allungate può essere utilizzato come indice grossolano di invecchiamento cellulare.

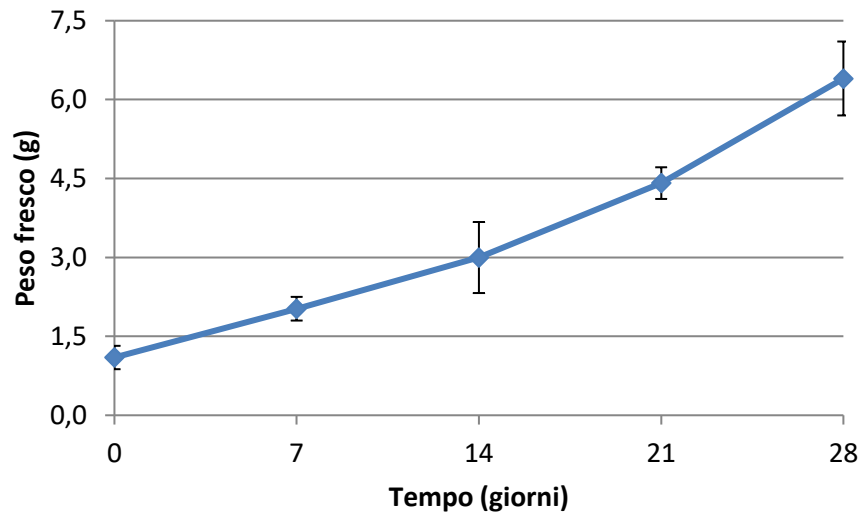
La biomassa cellulare presenta un grado di imbrunimento direttamente proporzionale al grado di allungamento cellulare.

Cellule allungate hanno una più alta probabilità di rottura in sistemi bubbling o a pale.

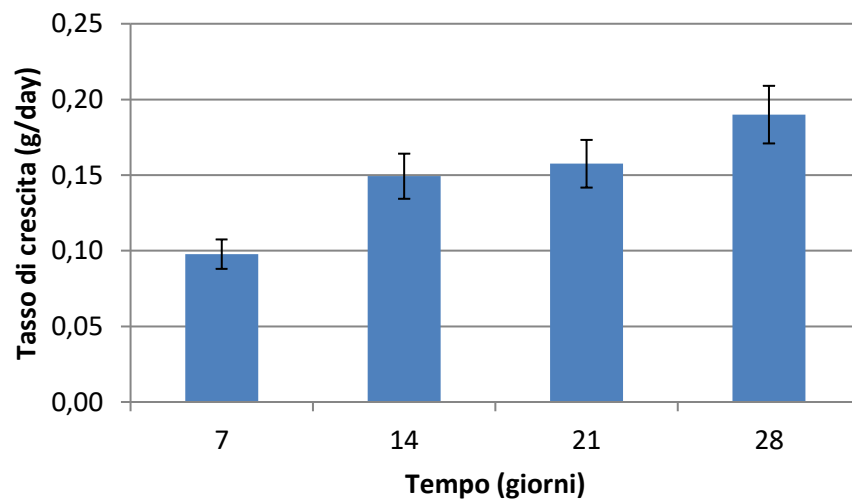
Crescita di colture di callo su GB5 in piastra 24±1°C



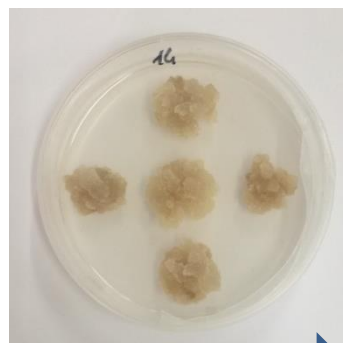
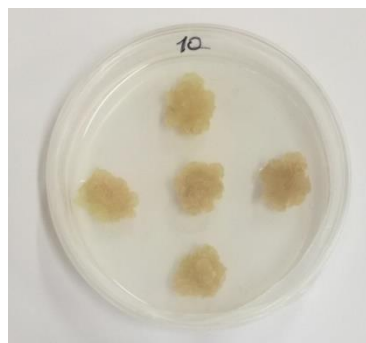
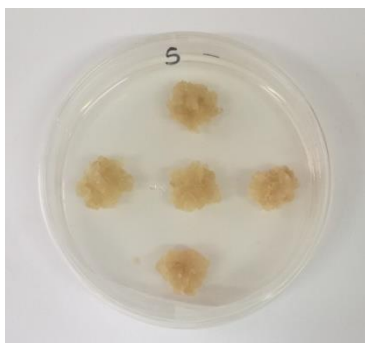
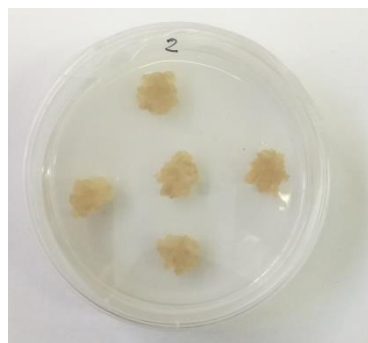
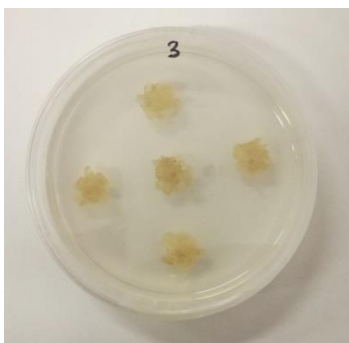
Curva di crescita



$$\text{Tasso di crescita} = \frac{\text{peso fresco } T_i \text{ (g)} - \text{peso fresco } T_0 \text{ (g)}}{T_i \text{ (d)}}$$



La percentuale di peso secco nei calli resta invariata nel tempo a $3.7 \pm 0.3\%$ se viene tenuta alta l'umidità ambiente
La produttività su solido è molto bassa $6,3 \text{ mg DW/d/63cm}^2$



INIZIO TEST

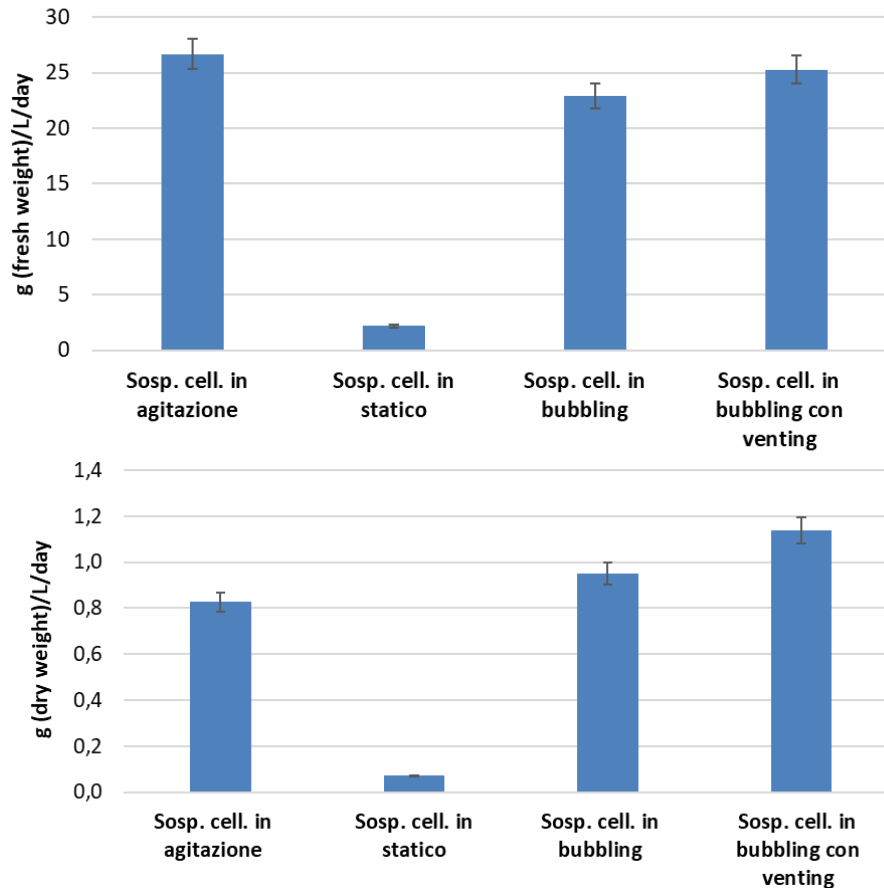
7 GIORNI

14 GIORNI

21 GIORNI

28 GIORNI

Ottimizzazione della crescita di sospensioni cellulari di cardo

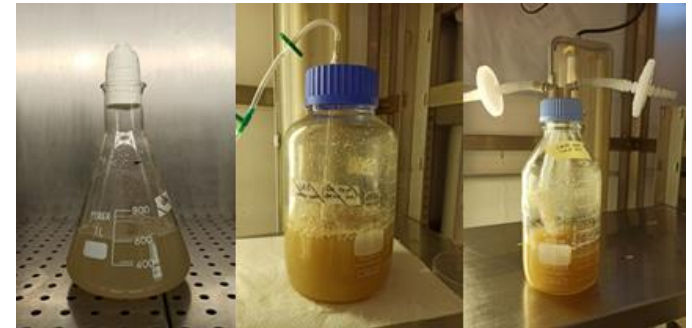


La temperatura di coltivazione nel range tra 23 e 27°C ha mostrato non rilevanti differenze in termini di produttività.

Temperatura fissata a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

ARIA filtrata a $0.45 \mu\text{m}$.

In termini di peso fresco i sistemi in bubbling presentano produttività sovrapponibili alle beute su orbital shaker



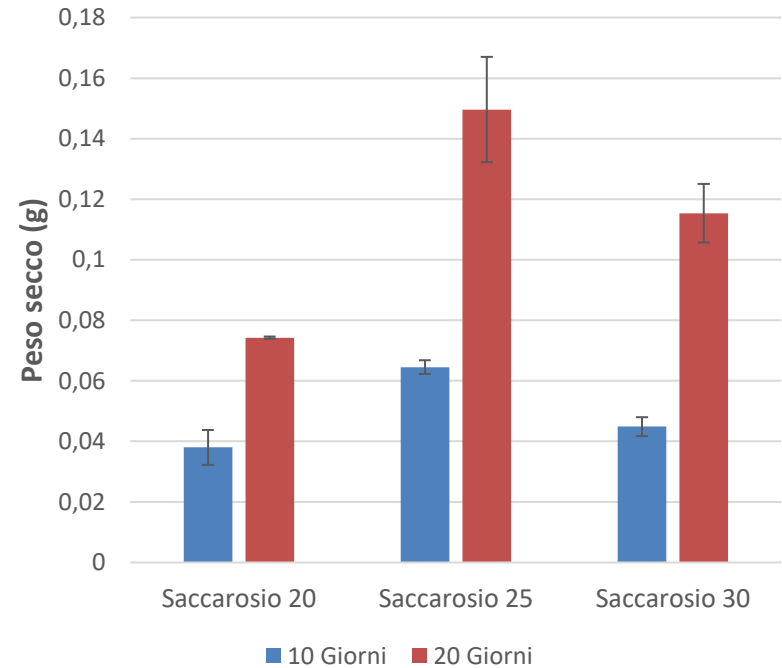
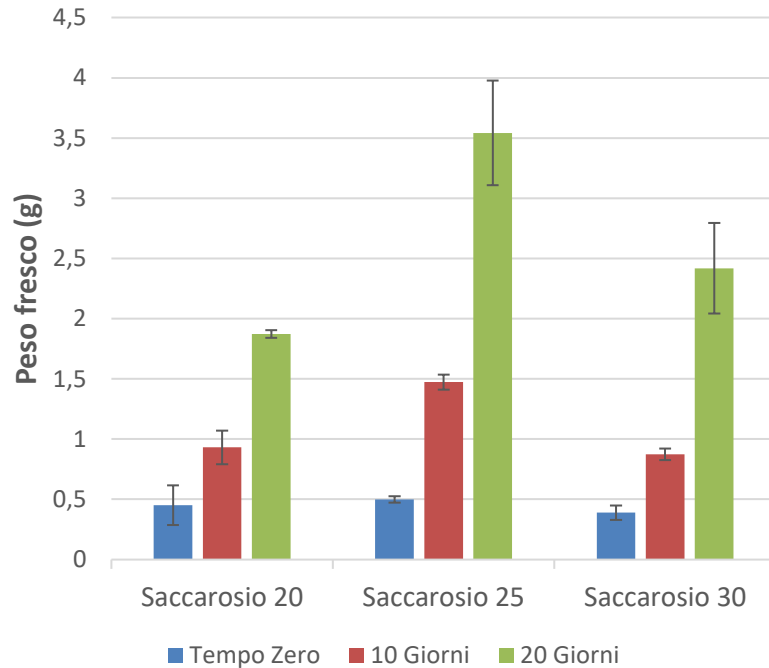
TEST PRELIMINARI DI INSUFFLAZIONE PER SISTEMI DA 1L e 2L HANNO MOSTRATO BUONI RISULTATI NELL'INTERVALLO tra 0.6 e 0.8 v/v min. PROBLEMA SCAMBIO GASSOSO/MOVIMENTAZIONE.

Orbital shaker 150 giri/min

Variazione nella quantità di acqua evaporata.
Necessità di installare un condensatore nell'air outlet.

I risultati espressi in termini di peso secco tuttavia mostrano che con il venting si ha un leggero incremento della produttività (maggiore peso secco delle cellule).

Valutazione della crescita cellulare con saccarosio a diversa concentrazione su piastra



La percentuale di peso secco a 30 g/l Saccarosio (4,7%) risulta leggermente più elevata in confronto a 20 e 25 g/L saccarosio (4,2 e 4,1%)

Utilizzo sottoprodotti e rifiuti alimentari

- Documentata utilizzazione di differenti fonti di carbonio organico (oltre il saccarosio) in numerose specie di sospensioni cellulari. Tra i principali zuccheri è riportato l'utilizzo di glucosio, fruttosio, galattosio, mannosio, arabinosio, ribosio, xylosio, maltosio, lattosio, cellobiosio, trealosio (Yeseen et al 2013).
- Fowler (1982) ha riportato che possono essere utilizzati alcuni sottoprodotti industriali e relative fonti di carbonio, quali lattosio, maltosio, amido, melassa e siero di latte opportunamente trattati.
- Kinnersley e Henderson (1988) hanno riportato la crescita di colture di *Nicotiana tabacum* e *Papaver somniferum* utilizzando sciroppo di mais.
- Attività β -galactosidasica esocellulare riportata in sospensioni cellulari di cetriolo ed efficiente utilizzazione di lattosio e siero di latte (A Callebaut & Motte, 1988).
- Sospensioni cellulari di *Rubus arcticus* e *Betula pendula* coltivate con siero di latte hanno mostrato produttività rispettivamente dell' 83% e del 75% rispetto al mezzo di controllo con saccarosio (Hakkinen et al. 2020).

Sottoprodotti selezionati nel progetto BOBCAT

- Sugar molasses
(sugar cane molasses)



- Spent osmotic sugar solution
(from candied berry and citrus processing)



NAPPI 2 srl



- Corn steep liquor



- Whey from cheese factory



Caseificio
Capurso

COMPOSIZIONE DELLA MELASSA DA ZUCCHERO DI CANNA

-composizione di riferimento-



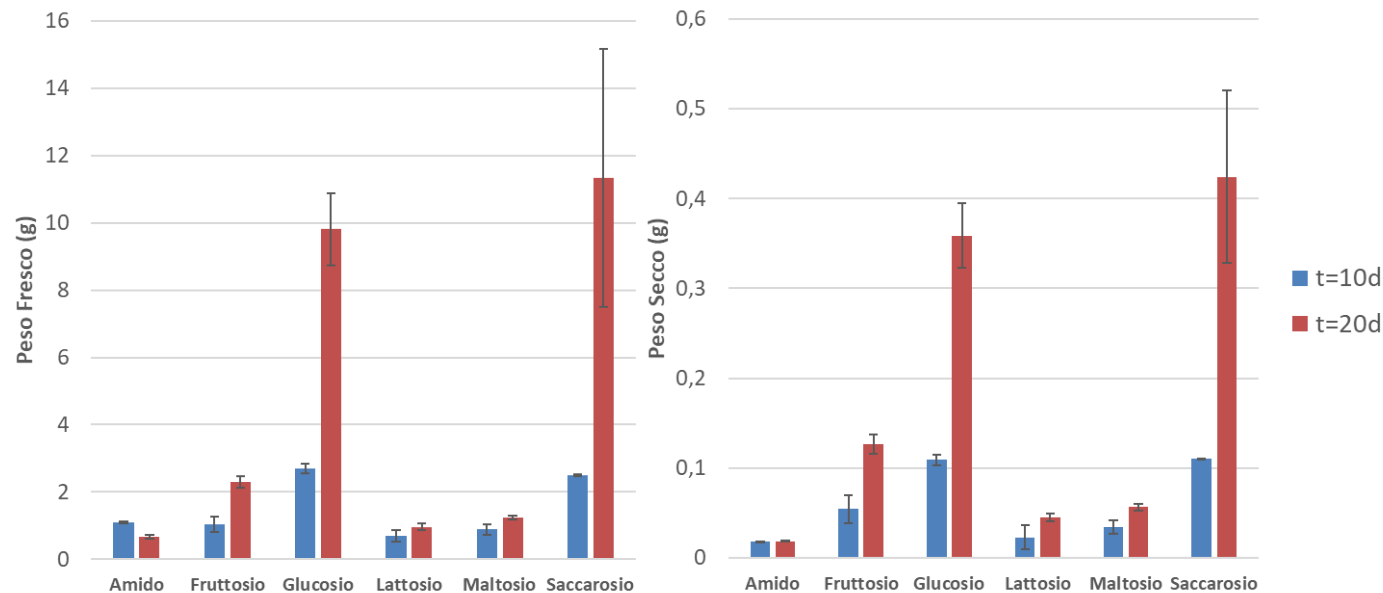
Melassa da zucchero di canna

	g/L
Azoto totale	7.211538462
Proteine	45
Zuccheri totali	430-460
Peso secco	20
Ceneri	95
Umidità	28%
Carbonio	180.6
Calcio	7
K	35
Na	1
S	5
Mg	5
P	1
Fe	30-500 ppm
Zn	tra 4 e 48 ppm
Mn	tra 40 e 50 ppm
Cu	tra 2 e 10 ppm
Cl	30

Main constituents	Components	Normal range
Water		17–25%
Sugars	Sucrose	30–40%
	Glucose (dextrose)	4–9%
	Fructose (levulose)	5–12%
	Other reducing substances (as invert)	1–4%
	Total reducing substances (as invert)	10–25%
Other carbohydrates	Gums, starch, pentosans, also traces of hexitols; myoinositol, d-mannitol, and uronic acids	2–5%
Ash	As carbonates ^a	7–15%
	Bases:	
	Potassium oxide (30–50%)	
	Calcium oxide (7–15%)	
	Magnesium oxide (2–14%)	
	Sodium oxide (0.3–9%)	
	Metal oxides (as ferric) (0.4–2.7%)	
	Acids:	
	Sulfur trioxide (7–27%)	
	Chloride (12–20%)	
	Phosphorus pentoxide (0.5–2.5%)	
	Silicates and insolubles (1–7%)	
	Nitrogenous compounds	
	Crude protein (as N × 6.25)	2.5–4.5%
	True protein	0.5–1.5%
Nonnitrogenous	Amino acids, principally aspartic and glutamic acids, including some pyrrolidine carboxylic acids	0.3–0.5%
	Unidentified nitrogenous compounds	1.5–3.0%
	Aconitic acid (1–5%), citric, malic, oxalic, glycolic	1.5–6.0%
	Mesaconic, succinic, fumaric, tartaric	0.5–1.5%
Wax, sterols, and phosphatides		0.1–1.0%
Vitamins	Thiamin (B ₁)	2–10 ppm
	Riboflavin (B ₂)	1–6 ppm
	Pyridoxine (B ₆)	1–10 ppm
	Nicotinamide	1–25 ppm
	Pantothenic acid	2–25 ppm
	Folic acid	10–50 ppm
	Biotin	0.1–2 ppm

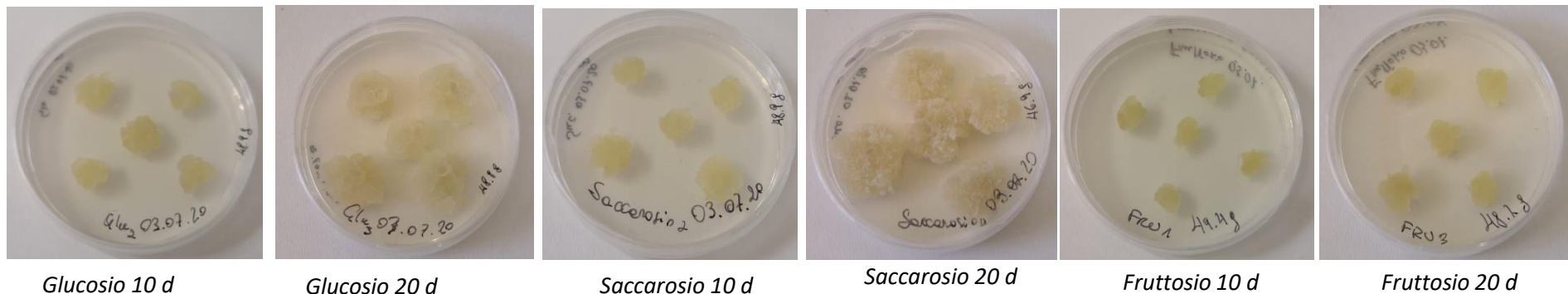
Source: United Molasses Company, USA.

Valutazione della crescita cellulare con fonti di carbonio alternative 30 g/L per ciascuna fonte di carbonio



Saccarosio e glucosio hanno mostrato tassi di utilizzazione sovrapponibili. Maltosio, amido e fruttosio hanno mostrato crescita pressoché nulla in solido.

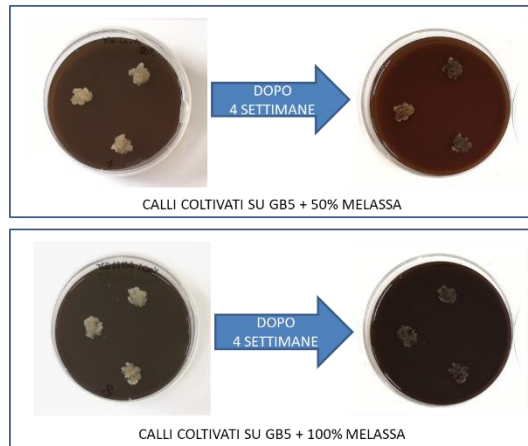
% peso secco non influenzata dalla fonte di carbonio



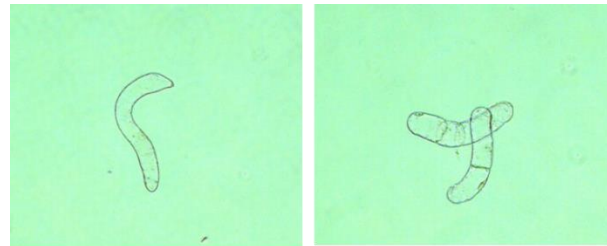
Prove di crescita di colture di callo su GB5 addizionato alla melassa come fonte di C.

-Screening Test-

- GB5 + 50% MELASSA: IL SACCAROSIO È STATO SOSTITUITO PER METÀ DAL SACCAROSIO E GLUCOSIO DELLA MELASSA
- GB5 + 100% MELASSA: IL SACCAROSIO È STATO SOSTITUITO TOTALMENTE DAGLI ZUCCHERI DELLA MELASSA

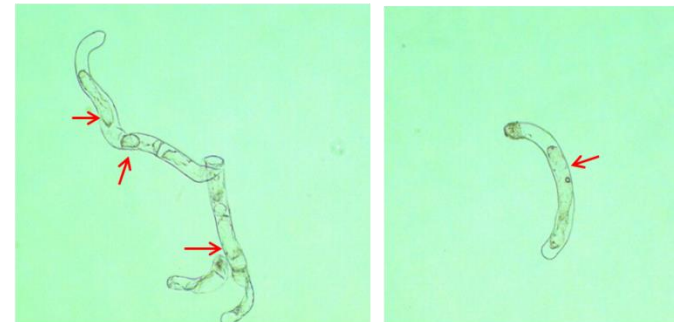


EVIDENTE INIBIZIONE DELLA CRESCITA



CELLULE DI CARDO OTTENUTE DA CALLO COLTIVATO SU MEZZO STANDARD GB5

CELLULE DI CARDO OTTENUTE DA CALLO COLTIVATO SU GB5 + 100% MELASSA



PROBLEMA DI OSMOLARITÀ

Disegno terreni con
aggiustamento pressione
osmotica e trattamento melassa
con idrolisi acida e carboni attivi

DISEGNO DI TEST DI
TOSSICITA' SU
SOSPENSIONE

RISULTATI NEGATIVI- EFFETTO INIBENTE DA
PROBABILI SOSTANZE TOSSICHE ED ECCESSO
METALLI DIVERGENTI (TRATTAMENTO CON
CHELANTI)

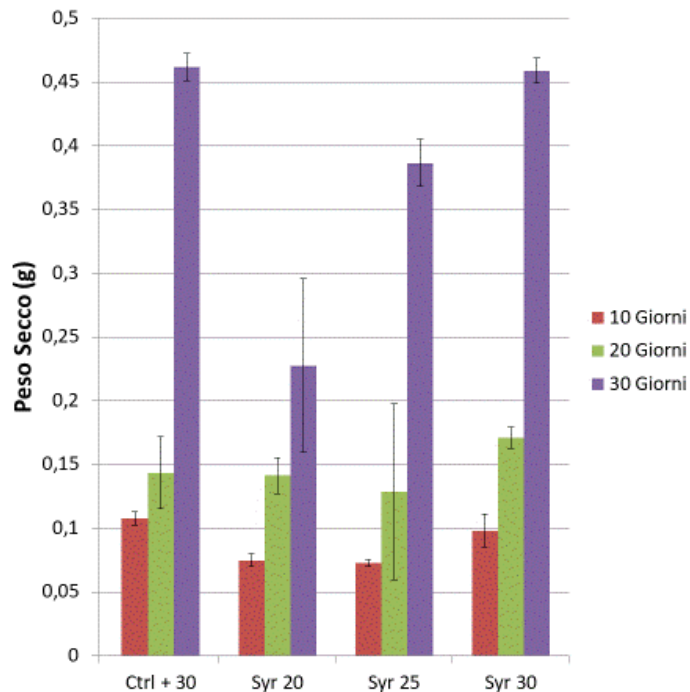


TEST SCIROPPO DI CANDITURA

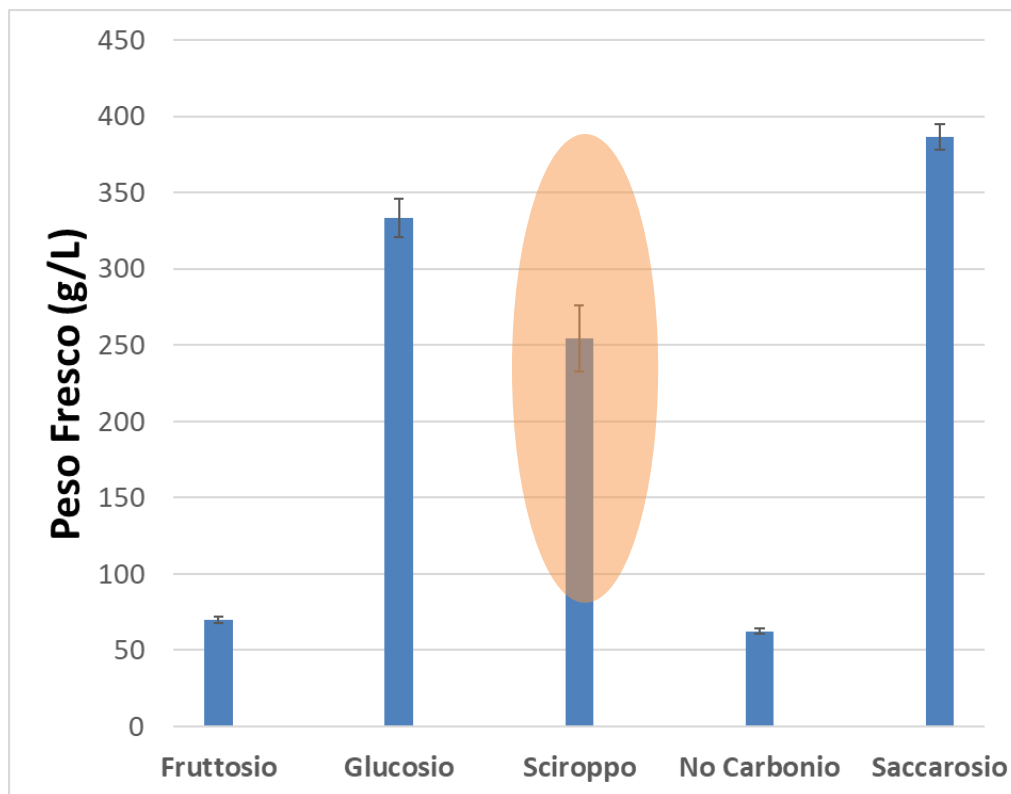
20, 25 e 30 g/L

Saccarosio
equivalente

IN SOLIDO



Sospensione cellulare ORB. SHAK. 30 g/L
saccarosio equiv.



PROVE DI SOSTITUZIONE REAGENTI ANALITICI CON REAGENTI DI GRADO TECNICO O FOOD GRADE

Sostituzione Saccarosio SIGMA con Saccarosio FOOD grade

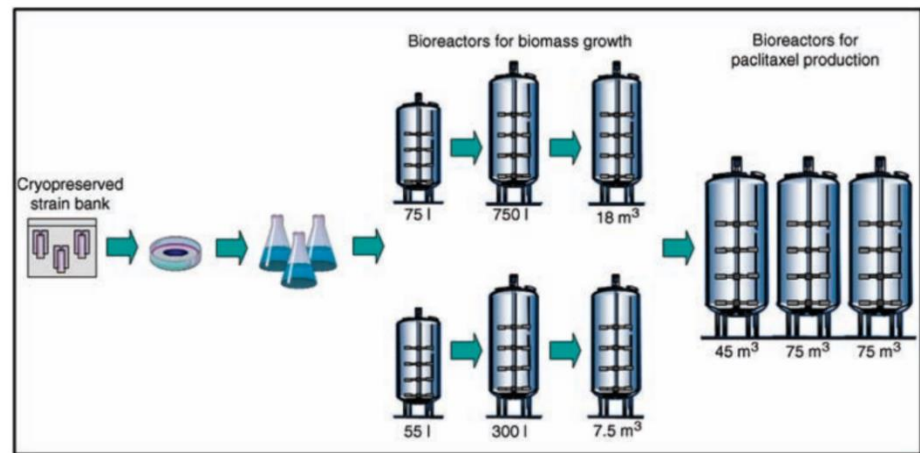
	GB5 – SUCR. SIGMA	GB5 SUCORSE ERIDANIA
PRODUTTIVITÀ (su peso FRESCO) g/L/day	17.7 ± 3.9	18.4 ± 2.7
PRODUTTIVITÀ (su peso SECCO) g/L/day	0.47± 0.07	0.51± 0.04

Sostituzione KNO₃ SIGMA con KNO₃ di grado tecnico

	GB5 CON KNO ₃ SIGMA	GB5 CON KNO ₃ HAIFA
PRODUTTIVITÀ (su peso FRESCO) g/L/day	19.4 ± 4.7	17.2 ± 4.0
PRODUTTIVITÀ (su peso SECCO) g/L/day	0.50± 0.06	0.48± 0.03

In corso test su fosfato

PRODUCTION UPSCALING



Phyton Biotech-Pacitaxel

Low-cost bioreactors

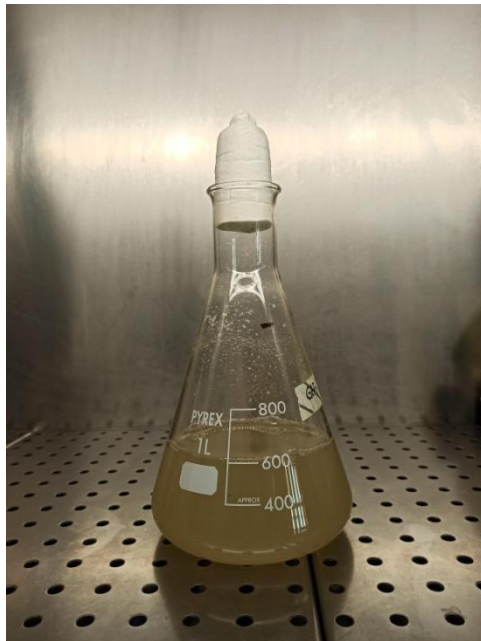
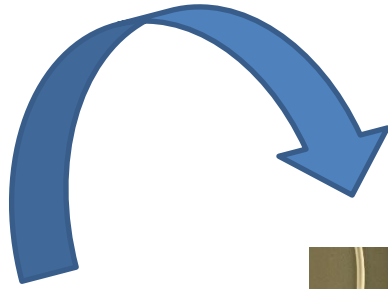
Protalix BioTherapeutics
taliglucerasi alfa - trattamento della malattia di
Gaucher.
FDA Approved



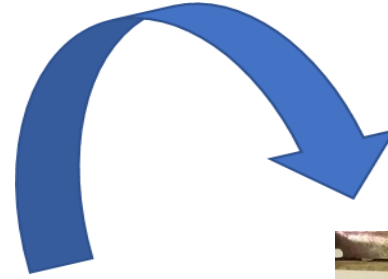
Protalix model

Scale-Up delle colture cellulari di cardo fino a 10 L

1 : 4



1 : 4



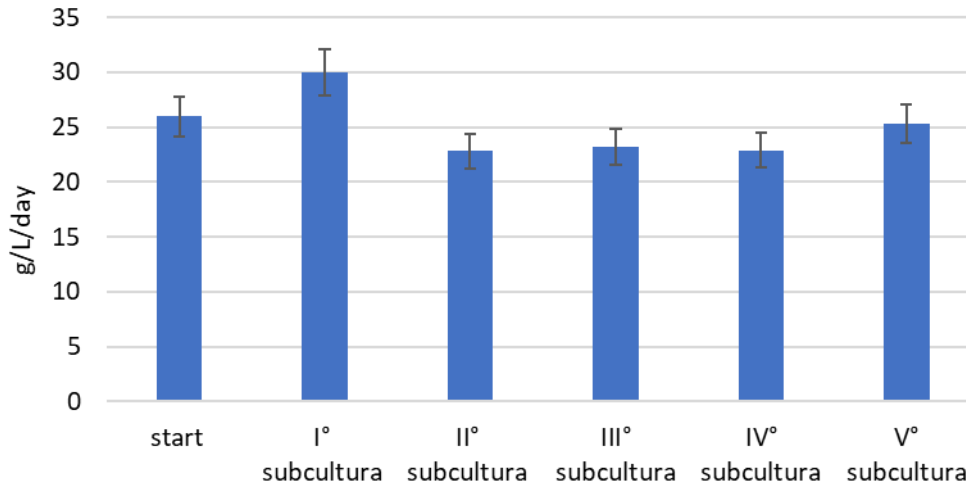
Sulla base di prove precedenti la diluizione 1 : 4 si è rivelata la migliore per la produttività delle colture e la gestione delle stesse.

Scale-Up delle colture cellulari di cardo

- Lo studio della produttività nelle subcolture -

Da 500 mL a 10 L

produttività su peso fresco



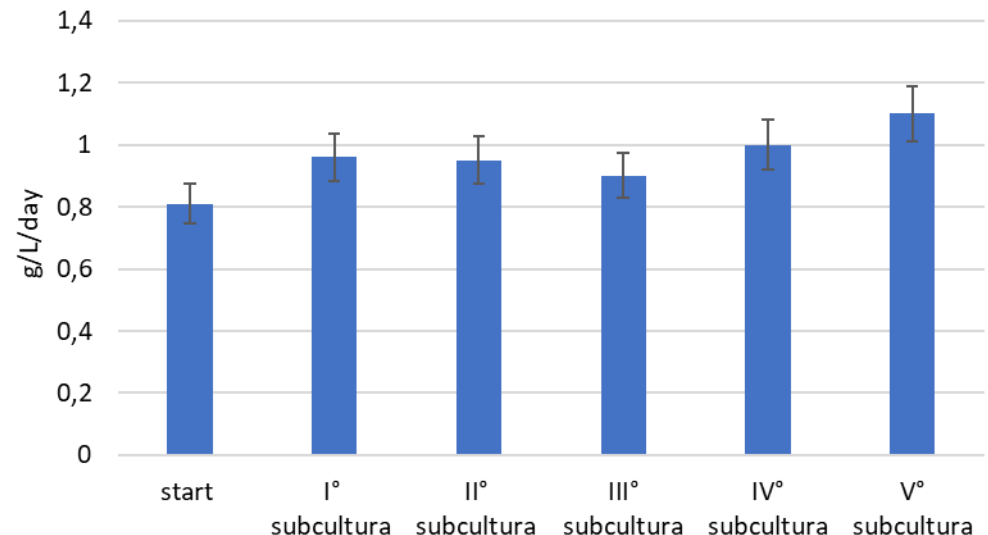
Nel corso del tempo, alla seconda subcultura, la produttività (in termini di peso fresco) tende a diminuire leggermente per sospensioni cellulari fatte crescere in un sistema bubbling.

Tuttavia, la % di sostanza secca aumenta nel corso delle diverse subculture raggiungendo valori $\geq$ al 4%.

In corso
approfondimento
variazioni chimiche
cellulari

In termini di peso secco la produttività si mantiene costante nel corso delle subculture successive (~1 g/L/day).

produttività su peso secco



Sterilizzazione chimica vs autoclave terreni di coltura

La sterilizzazione chimica è stata testata in alternativa a quella in autoclave, utile per i grandi volumi nelle fasi di scale-up.

In particolare, sono stati provati 2 metodi:

- a) Sterilizzazione con soluzione NaClO (15 ppm cloro attivo) over-night, aerazione 1 v/v/min per 5 h, inoculo
- b) Sterilizzazione con soluzione NaClO (15 ppm cloro attivo) over-night + Na₂S₂O₃ come neutralizzante 200 ppm, aerazione 1 v/v/min per 30 min, inoculo
- c) Controllo sterilizzazione – autoclave 121 °C per 20 min, raffreddamento, inoculo

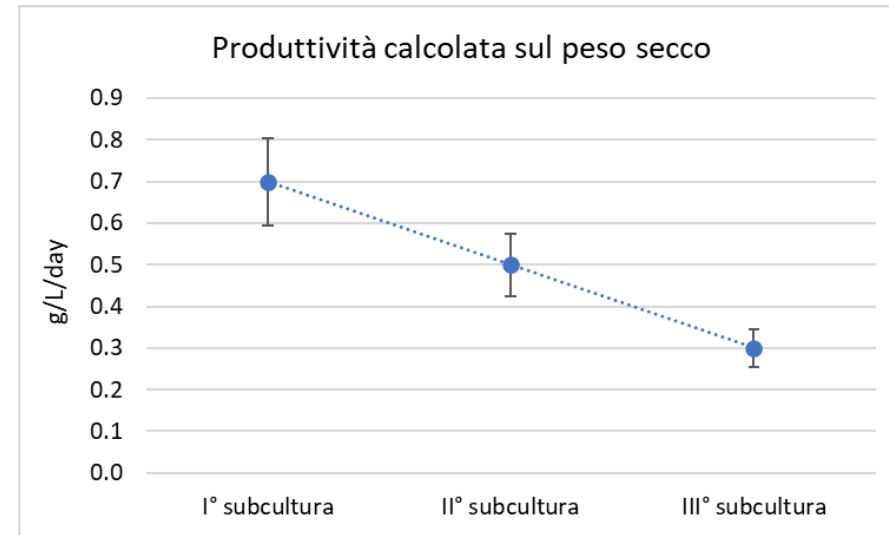
	Metodo “a”	Metodo “b”	Cntr
PRODUTTIVITÀ (FRESCO) g/L/day	19.1 ± 2.8	22.4 ± 6.0	27.3 ± 7.7
PRODUTTIVITÀ (SECCO) g/L/day	0.9 ± 0.03	1.0 ± 0.05	1.3 ± 0.05

Prove alla luce

Sono state fatte delle prove di crescita cellulare (in sospensione) alla luce ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR).

Le colture (in bubbling) sono state poste alla luce per 3 subculture successive (ogni subcultura dura 10 giorni), dopo di che la crescita inizia a diminuire.

In generale, le colture alla luce mostrano una più alta percentuale di peso secco rispetto alle colture al buio (media peso secco alla luce = $5.8 \pm 0.5 \%$; media peso secco al buio = $3.9 \pm 0.7 \%$).



Cellule di cardo al microscopio con presenza di pigmenti.

- Utilizzo acqua potabile (risparmi membrane RO ed economia dei Sali)

Analisi acqua potabile Portici (NA)

CONCENTRAZIONE IONI IDROGENO	pH	7,2
RESIDUO FISSO A 180°C	mg/l	531
DUREZZA	°F	38
CONDUCIBILITÀ ELETTRICA A 20°C	μS/cm	746
CALCIO	mg/l Ca	109
MAGNESIO	mg/l Mg	26
AMMONIO	mg/l NH ₄	<0,05
CLORURI	mg/l Cl	61
SOLFATI	mg/l SO ₄	31
POTASSIO	mg/l K	22
SODIO	mg/l Na	41
ARSENICO	μg/l As	1,8
BICARBONATO	mg/l HCO ₃	444
CLORO RESIDUO	mg/l	0,11
FLUORURI	mg/l F	0,79
NITRATI	mg/l NO ₃	16
NITRITI	mg/l NO ₂	<0,02
MANGANESE	μg/l Mn	<1,3

- Design terreno di coltura ottimizzato
- Utilizzazione siero di latte trattato enzimaticamente
- Trattamento spinto alla melassa di canna da zucchero
- Verifica della produttività di sospensioni cellulari WT vs trasformata (CNR Milano e Portici)
- Valutazione disidratazione convettiva vs liofilizzazione
- Upscale in sistemi bubble column da 150 L

Grazie per
l'attenzione....

Gruppo di ricerca UNINA – Subunità CAISIAL



Prof. Paolo Masi
Direttore CAISIAL
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Antonio Luca Langellotti
CAISIAL
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Prof. Antonino Pollio
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Maria Oliviero
CAISIAL
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Anna Martello
CAISIAL
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Andrea Donadio
CAISIAL
Università degli Studi di
Napoli Federico II