

104. S. PALADINO, F. UGOLINI e E. B. CHAIN. — Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.

**Riassunto.** — Sono descritti fermentatori della capacità di 90 e 300 litri per lavorazioni in impianto pilota, riferendone tutti i particolari di costruzione e di manutenzione. I fermentatori, in acciaio inossidabile, sono adatti per fermentazioni con microorganismi non patogeni. L'aerazione può essere effettuata sia con il « sistema a vortice » che con distributore d'aria in presenza o meno di antivortici. E' descritto nei suoi particolari, un « impianto tipo » per fermentazioni a tre stadi, comprendente un « fermentatore di semina », uno « intermedio » ed uno « di produzione » e ne è illustrata la tecnica d'uso. Dell'« impianto tipo » è riportato lo schema di montaggio. Sono discusse le possibili cause di inquinamento.

**Résumé.** — La description de la station pilote en échelles de laboratoire et semi-industrielle, expose les détails de construction et d'entretien des fermentateurs de 10, 90 et 300 litres de capacité. Ces fermentateurs, en acier inoxydable, sont destinés à des fermentations aérobiques avec des micro-organismes non-pathogènes. Ils ont été particulièrement conçus pour l'aération par vortex en fonction d'une forte agitation mais sont aisément convertibles au système d'aération par dispersion d'air, avec ou sans panneaux de turbulence. Les opérations, tout au long d'un cycle de fermentations, sont exposées en détail et décomposées selon les unités mises en oeuvre: fermentateur à semence, fermentateur intermédiaire et fermentateur proprement dit. On démontre que les fermentateurs sont susceptibles de taux d'aération élevés et capables de fonctionner sans défaut même en travail de routine de longue durée.

En discutant les possibilités de contamination, on insiste sur l'importance des valves et des organes d'agitation.

**Summary.** — Small scale pilot plant fermenters of 10, 90 and 300 l total capacity are described with full details for their construction and maintenance. The fermenters (of stainless steel) are suitable for aerobic fermentations with non-pathogenic micro-organisms. They have been specially designed for aeration by the vortex system using fast agitation but can quickly be converted for aeration by means of an air sparger in the presence or absence of baffles. The operation through a complete fermentation cycle, of a working unit comprising a seed fermenter,

intermediate and fermenter proper, is described in detail. The fermenters are shown to be capable of high aeration rates and of giving trouble free service when in routine use over a long period. Sources of contamination are discussed and the necessity for reliable valves and agitation units is emphasised.

**Zusammenfassung.** — Beschrieben werden Gärungsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 90 und 300 l und die dazugehörigen Zwischenfermenter für Versuchsanlagen experimentellen Charakters. Einzelheiten der Konstruktion und der Routineunterhaltung werden angegeben. Die Gärungsgefäße, die aus rostfreiem Stahl hergestellt sind, eignen sich für aerobe Gärungen mit nicht-pathogenen Mikroorganismen. Die besonders für Vortexbelüftung mit schneller Rührung ohne Luftverteiler entwickelten Gefäße können sehr rasch mit Belüftungssystemen durch Luftverteiler in Gegenwart oder Abwesenheit von Prallblechen versehen werden. Die Technik eines vollständigen Fermentationscyklus, von Zwischen- zu Hauptfermenter, wird beschrieben.

Mit den verwandten Belüftungssystemen können in den Gärgefäßen hohe Sauerstoffdiffusionsgeschwindigkeiten erreicht werden. Die Gärgefäßen arbeiten mechanisch einwandfrei bei ununterbrochener Benützung über lange Zeitperioden. Quellen von Verunreinigungen durch fremde Mikroorganismen werden besprochen. Für ihre Vermeidung ist die Verwendung von zuverlässigen Ventilen und mit geeigneten Lagerungen und Stoffbüchsen versehener Rührvorrichtungen eine Hauptbedingung.

---

#### INTRODUZIONE

In questo lavoro gli AA. descrivono alcuni fermentatori per impianto pilota con capacità totale di 90 e 300 litri, i quali sono adatti anche per sistemi di agitazione veloce; essi sono dotati di serbatoi di semina, di dispositivo per misurare il volume dell'inoculo da trasferire in fermentazione e di recipienti per immettere soluzioni sterili durante la fermentazione.

Saranno illustrati sommariamente alcuni particolari, che riguardano i fermentatori da laboratorio da 10 litri, già illustrati in dettaglio [CHAIN, PALADINO, UGOLINI, CALLOW, VAN DER SLUIS <sup>(1)</sup>], importanti in relazione a quanto sarà esposto in seguito. Inoltre sarà illustrata in

---

<sup>(1)</sup> CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J. - Rend. Ist. Sup. Sanità 17, 1164 (1954).

tutti i particolari, la tecnica di lavorazione per un ciclo fermentativo composto da tre stadii: fermentatore di semina, intermediario e fermentatore di produzione.

In un prossimo lavoro [CHAIN, PALADINO, UGOLINI e CALLOW (2)] sarà illustrato l'impianto pilota per microbiologia chimica, nel quale sono installati i fermentatori oggetto del presente lavoro.

#### FERMENTATORE DA 90 LITRI

Esso è costituito (fig. 1) da una testata e da un corpo cilindrico, entrambi di acciaio inossidabile 18/8 - 0,06 C.; per la termoregolazione, al corpo cilindrico è saldata una camicia di ferro, rivestita all'esterno di materiale coibente (tav. I<sup>a</sup>).

Tutte le dimensioni sono indicate in generale nei disegni riportati nelle tavole allegate; nel testo verranno ripetute solo quelle dimensioni che, dai disegni non possono essere rilevate chiaramente e con facilità.

#### *Testata del fermentatore*

La testata è costituita da una lastra circolare, bombata, in acciaio inossidabile, 18% Cr, 18% Ni e - 0,06% C. dello spessore di mm. 4, cerchiata da una flangia di ferro (9 tav. II), munita di dodici fori equidistanti fra di loro per il fissaggio al corpo del fermentatore mediante bulloni; per i particolari vedi (9 tav. II a).

Sulla testata sono ricavati nove fori, riportati nella tav. II, destinati ai seguenti servizi:

entrata dell'aria (1); introduzione dell'inoculo e aggiunta occasionale di liquidi durante la fermentazione (2); uscita dell'aria (3); misura e registrazione della temperatura (4a) e (4b); elettrodo rivelatore di schiuma (5); oblò per l'osservazione nell'interno del fermentatore e per l'introduzione del mezzo di cultura (6); oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore (7); alloggiamento della scatola di guida e di tenuta dell'agitatore (8).

#### *Raccorderia e valvolame*

Per i vari collegamenti fra le tubazioni, in acciaio inossidabile, dell'impianto e i fermentatori è stata adoperata raccorderia dello stesso materiale. Per il valvolame è stato adottato universalmente un tipo di val-

---

(2) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F. e CALLOW D. S. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17. 1246 (1954).

vola a pistone che, in seguito all'esperienza, è risultata essere la più idonea a tutti i servizi; essa è costituita da un corpo in bronzo, nel quale è ricavato un foro cilindrico, che alloggia una camicia di acciaio inossidabile, nella quale scorre verticalmente un pistone, egualmente in acciaio inossidabile. La tenuta è garantita da due guarnizioni anulari del tipo Klingerite, fissate alla canna cilindrica.

Le caratteristiche di funzionamento che hanno portato gli AA. a preferire tale tipo di valvola rispetto ad altri (diaframma, a sfera ecc.) esistenti in commercio, possono così riassumersi:

- 1) facilità di apertura e di chiusura;
- 2) bassa resistenza al passaggio dei fluidi;
- 3) resistenza meccanica all'uso e manutenzione minima;
- 4) ottime caratteristiche di funzionamento al passaggio di vapore, olio, acido, aria, acqua calda e fredda e liquidi di cultura.

#### *Entrata dell'aria*

Quando si impiega il sistema di aerazione con distributore a vortice, l'aria entra nel fermentatore passando attraverso un filtro, costituito da un tubo di acciaio inossidabile (10 tav. II); per i particolari vedi (10 tav. II b). La costruzione di esso è molto simile a quella descritta per il filtro, illustrato in un lavoro precedente [CHAIN ed altri (1)].

Il filtro è collegato alla testata del fermentatore mediante una valvola a pistone in acciaio inossidabile, come è indicato nella tav. II. Per il paccaggio del filtro si è usata una miscela composta dal 30% di fibra di amianto e dal 70% di lana di vetro sottile (fine Corning fiber glass), mediamente compressa, in ragione di 90 grammi per ogni filtro.

Se per l'aerazione del liquido di cultura si impiega il distributore d'aria, il filtro per la sterilizzazione di essa è simile al precedente, ma di maggiori dimensioni (10 b tav. X b) e la quantità di miscela adoperata per il paccaggio è di 350 grammi. Il distributore di aria, che porta alla estremità d'innesto un mezzo bocchettone, in questo caso viene collegato al prolungamento dell'ingresso dell'aria che attraversa la testata del fermentatore. Tale prolungamento è costituito da un tronchetto di tubo in acciaio inossidabile, saldato opportunamente al relativo foro praticato nella testata del fermentatore; il prolungamento è filettato dalla parte esterna del fermentatore e porta una semi-chiavarda di bloccaggio dalla parte interna al fermentatore stesso.

Volendo, si possono adoperare anche gli antivortici, costituiti da

lame di acciaio inossidabile, larghe mm. 40 e lunghe mm. 490, munite di ganci a sezione quadrata, mediante i quali esse possono essere incastrate nelle apposite sedi, che sono saldate sulla parte interna del fermentatore (tav. V). Praticamente si utilizzano solo tre di questi antivortici, in quanto il tubo di alimentazione del distributore di aria funziona da quarto.

#### *Uscita dell'aria*

I vari particolari sono illustrati nella tav. I. Il tubo flangiato per l'uscita dell'aria (3 tav. I) porta un raccordo a T su cui è fissato un manometro per la misura della pressione interna del fermentatore; l'aria attraversa l'altro braccio del raccordo a T, collegato tramite una valvola di regolazione a pistone con il filtro d'uscita dell'aria (11 tav. I); per i particolari vedi (11 tav. II b). Il filtro di uscita dell'aria può essere collegato con un flussometro per mezzo di un tubo di gomma.

#### *Organi di guida e di tenuta dell'asse ruotante dell'agitatore*

Poichè l'organo di guida e di tenuta dell'asse ruotante dell'agitatore nel fermentatore da 90 litri (tav. III) si trova nelle stesse condizioni di funzionamento dell'organo di guida e di tenuta del fermentatore da 10 litri, già illustrato [CHAIN ed altri (<sup>1</sup>)], [PALADINO e UGOLINI (<sup>3</sup>)], le due realizzazioni sono simili.

Il corpo della scatola di guida e di tenuta è stato ricavato da una barra di acciaio inossidabile; esso è di forma simile a quella dei fermentatori da 10 litri, ma con dimensioni maggiori; (1 tav. III), per i dettagli (1 tav. III a). Sulla superficie tronco-conica esterna sono fresate verticalmente quattro sedi a 60° (1 tav. III a), per poter fare lavorare una chiave tubolare a denti al fine di bloccare il corpo della scatola di guida e di tenuta alla flangia (3 tav. III), saldata al foro centrale della testata del fermentatore; sulla stessa superficie tronco-conica si trova un ingrassatore destinato alla lubrificazione del cuscinetto a sfere inferiore di guida.

Alla filettatura superiore esterna del corpo si avvita il cappellotto godronato, « premistoppa », (5 tav. III), per i particolari vedi (5 tav. III a), mediante il quale si comprimono in piano ed uniformemente gli anelli di tenuta; il bloccaggio del premistoppa nella posizione voluta è ottenuto mediante il controanello (4 tav. III).

Gli anelli di tenuta, a sezione quadrata, uguali per qualità a quelli adoperati per i fermentatori da 10 litri sono alloggiati in una scatola

---

(<sup>3</sup>) PALADINO S. e UGOLINI F. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, 1234 (1954).

cilindrica (2 tav. III), per i particolari vedi (2 tav. III a), ricavata da una barra di acciaio inossidabile. Essa è filettata esternamente verso l'alto in modo da poter essere avvitata all'interno della scatola di tenuta e di guida, (1 tav. III), e bloccare col suo spallamento, l'anello esterno del cuscinetto di guida (tav. III). Detta scatola cilindrica viene bloccata mediante chiave a compasso, i cui perni vanno ad infilarsi in due sedi cilindriche, ricavate sulla superficie anulare superiore (2 tav. III).

Il canotto filettato della scatola di raccolta del grasso di lubrificazione (11 tav. III), per i particolari vedi (11 tav. III b), del cuscinetto inferiore di guida blocca l'anello interno di quest'ultimo contro lo spallamento interno dell'asse (tav. III).

Il grasso per la lubrificazione del cuscinetto inferiore di guida, passa dall'ingrassatore, avvitato alla scatola (1 tav. III), alla camera anulare, creata fra l'elemento (1 tav. III) e la scatola porta-anelli (2 tav. I) e da questa attraverso quattro fori equidistanti arriva all'apposita camera a grasso del sopradetto cuscinetto.

Il cuscinetto superiore di guida, a differenza della sistemazione adottata per i fermentatori da 10 litri, è alloggiato in un supporto circolare di alluminio, munito di scatola di chiusura e di bloccaggio del suo anello esterno (6 e 8 tav. III), per i particolari (6 e 7 tav. III a), (8 tav. III b). Sul supporto sono stati praticati perifericamente quattro fori equidistanti per il passaggio della parte terminale liscia di altrettante colonnine (9 tav. III), per i particolari vedi (9 tav. III b). Queste ultime sono bloccate a vite prigioniera sulla flangia porta-scatola-di-guida-e-di-tenuta, (3 tav. III), per i particolari (3 tav. III a), che è saldata al centro della cupola del fermentatore; esse sono strette all'altra estremità al supporto circolare di alluminio (8 tav. III), mediante quattro dadi e altrettante rondelle.

Con questa soluzione, le forze normali dell'asse ruotante, applicate alla sua estremità superiore, generate dal tiro della cinghia sulla puleggia di trasmissione, si ripartiscono attraverso le colonnine direttamente sulla piastra (3 tav. III), escludendo così le parti essenziali del complesso vero e proprio di tenuta. In assenza di sforzi normali all'asse di rotazione, nel caso di trasmissione di moto verticale, può essere adottata la stessa soluzione costruttiva dei fermentatori da 10 litri.

#### *Albero ruotante dell'agitatore*

L'albero ruotante dell'agitatore (10 tav. III b) è costruito in acciaio inossidabile ricavato da barra. Esso nella parte inferiore è simile all'albero ruotante dei fermentatori da 10 litri, mentre nella parte superiore manca della fresatura verticale per lo scorrimento assiale della boccola.

porta-cuscinetto. La parte superiore dell'albero è formata: — da un primo tratto filettato per il bloccaggio tramite una rondella e da un dado (1 e 13 tav. III) della puleggia di trasmissione; — da un secondo tratto liscio per l'imbocco della puleggia di trasmissione; — da un terzo tratto, il cui diametro della misura corrispondente a quella dell'anello del cuscinetto superiore di guida è lavorato con tolleranza « *grado preciso libero* » per garantire gli scorrimenti dovuti alle dilatazioni dell'asse ruotante; — ed infine da un quarto tratto sul quale aderiscono gli anelli di tenuta. La parte centrale dell'albero di rotazione all'altezza del cuscinetto inferiore di guida è tornita per permettere l'alloggiamento dell'anello interno di detto cuscinetto e subito dopo è filettata a passo fine per avvitarvi il canotto interno della coppa-raccogli-olio (11 tav. III) e bloccare con esso il cuscinetto inferiore di guida al relativo spallamento dell'asse.

Per la pulizia periodica della coppa, questa porta un foro filettato (18 tav. II) nel quale, durante l'uso è avvitato un tappo munito di guarnizione (vedi: manutenzione). La rimanente parte dell'albero dell'agitatore è di forma cilindrica e termina con un risalto filettato, sul quale viene bloccata l'elica di agitazione per mezzo di un dado munito di rondelle (16 e 17 tav. III).

#### *Montaggio del complesso di guida e di tenuta sulla testata del fermentatore*

Il complesso di guida e di tenuta, completo dell'asse di rotazione dell'agitatore, viene avvitato stretto, mediante apposita chiave, sulla flangia (3 tav. III) saldata, come dianzi detto, elettricamente sul foro centrale della testata del fermentatore. La tenuta è assicurata mediante guarnizione di grafite amianto del tipo « *Klingerite* ». Successivamente sull'estremità superiore dell'asse di rotazione si infila il supporto di guida superiore (6 e 8 tav. III), già completo di cuscinetto e di coperchio (6 tav. III), fissato mediante quattro viti (7 tav. III), facendo coincidere i ferri periferici del supporto con l'estremità delle quattro colonnine di sostegno. Infine si avvitano i dadi (14 e 15 tav. III) per il bloccaggio di tutto il sistema.

#### *Eliche agitatrici*

Le eliche adoperate, in acciaio inossidabile, sono quelle del tipo a turbina; esse hanno diametri vari a seconda delle esigenze e nella (19 tav. III b) sono riportate le dimensioni di un tipo di essa. Il montaggio,

a seconda del diametro, può essere effettuato attraverso l'oblò di ispezione o sollevando la testata del fermentatore.

#### *Oblò di osservazione*

Sulla testata del fermentatore per l'osservazione dell'interno di esso è stato ricavato un oblò (6 tav. II) costituito da un grosso tubo di acciaio inossidabile, saldato da una parte al coperchio del fermentatore e terminante dall'altra con una flangia di acciaio al carbonio; questa ultima è saldata ad esso elettricamente e porta quattro bulloni prigionieri; per i particolari vedi (6 tav. II a). Sul diametro interno di detta flangia è stato ricavato uno spallamento per l'alloggiamento di una guarnizione piana di gomma e di un disco di vetro temperato, dello spessore di mm. 14. Sul disco viene poggiata a sua volta un'altra guarnizione piana di gomma, alloggiata in apposita sede ricavata in un'altra flangia di acciaio dolce, nichelata e forata in corrispondenza dei quattro prigionieri della flangia inferiore. La tenuta viene effettuata stringendo, quanto basta, le due flangie mediante quattro galletti. L'oblò ha un diametro tale da permettere la pulizia dell'interno del fermentatore.

Il piano del disco di vetro è stato tenuto più alto della testata del fermentatore per poter garantire la visibilità dell'interno di esso anche in presenza di un'eccessiva produzione di schiuma.

#### *Oblò per la illuminazione dell'interno del fermentatore*

Nella (7 tav. II a) sono riportati i particolari costruttivi dell'oblò di illuminazione (7 tav. II), la cui costruzione è molto simile a quella dell'oblò di osservazione e differisce da esso solo per le dimensioni.

#### *Introduzione dell'inoculo e aggiunta di liquidi sterili durante la fermentazione*

Al foro (2 tav. II) della testata del fermentatore è saldato un corto tubo di acciaio inossidabile, che termina con una flangia pure di acciaio inossidabile; a questa è fissata una contro-flangia, che porta una valvola a pistone, la cui entrata è tagliata dal vapore. La tav. I illustra il modo in cui i recipienti contenenti liquidi sterili, da aggiungere durante la fermentazione, vengono collegati alla sopra accennata valvola attraverso la quale essi entrano nel fermentatore.

### *Elettrodo rivelatore di schiuma*

Il dispositivo rivelatore di schiuma è simile a quello descritto nel lavoro precedente, [CHAIN ed altri (<sup>1</sup>)]; anche qui come elettrodo è impiegata una candela di accensione del tipo usato nei motori a scoppio, al cui elettrodo centrale è saldato un filo di acciaio inossidabile, lungo 15 cm. La candela porta-elettrodo è avvitata in un breve tubo di acciaio inossidabile, saldato nel foro apposito sulla testata del fermentatore (5 tav. II), per i particolari vedi (5 tav. II a). Il circuito elettrico comprendente il relais elettronico, l'esploratore automatico ed il segnale di allarme, è quello adoperato per i fermentatori da 10 litri.

### *Sonde per la misura e la registrazione della temperatura*

In numero di due per ogni fermentatore, esse sono costituite da tubi di acciaio inossidabile di diametro e di lunghezza adatti alle caratteristiche degli elementi termosensibili disponibili; esse sono chiuse ad una estremità e saldate all'altra ai fori (4 a) (4 b) della tav. II, praticati sulla testata del fermentatore, vedi anche (4 tav. IV).

### *Corpo del fermentatore*

Esso è costituito (tav. I e V) da un cilindro di acciaio inossidabile dello spessore di mm. 3 alle cui estremità sono saldati rispettivamente un fondo bombato e una flangia di acciaio dolce. Quest'ultima porta dodici fori equidistanti per il passaggio dei bulloni, che la serrano ad una identica flangia, saldata al coperchio del fermentatore. Tra le due flangie è interposta una guarnizione quadra di tenuta, in gomma, alloggiata in apposita sede; per i particolari vedi (9 tav. II a).

Il corpo del fermentatore per un'altezza di circa 8/10 ed il suo fondo sono rivestiti da una camicia di refrigerazione (15 tav. I) di acciaio al carbonio dello spessore di mm. 5, saldata elettricamente al corpo. Detta camicia è dotata di uno scarico flangiato di fondo (15 tav. I), di un ingresso (16 tav. I) e di un'uscita (17 tav. I) per il fluido usato per la termoregolazione; questi ultimi, entrambi flangiati sono diametralmente opposti e sfalsati per un'altezza uguale all'incirca a quella verticale della camicia.

Al centro del fondo bombato del fermentatore è saldato il tubo di scarico da 3/4" di acciaio inossidabile, flangiato (12 tav. I), al quale viene fissata una contro-flangia che porta la saracinesca di scarico a

pistone (14 tav. I), la cui uscita è isolata mediante taglio di vapore. Una apparecchiatura simile (13 tav. I) è saldata ad un foro praticato nel corpo del fermentatore a circa  $1/3$  dal fondo per il prelievo dei campioni. La camicia per la termoregolazione è isolata termicamente con uno spessore di circa 5 cm. di lana di vetro contenuta in un'apposita intercapedine, costruita con lamierino di ferro sull'esterno della camicia. La parte superiore è chiusa con un adeguato coperchio di alluminio, fissato alla sua parete esterna mediante viti Parker.

#### *Appoggio del fermentatore e testata di chiusura*

Il fermentatore è sostenuto su tre gambe di ferro a sezione a U, fissate mediante dadi a tre bulloni, saldate sul fondo della lamiera che forma la camicia per termoregolazione e ciò allo scopo di avere i tubi di scarico e di presa di campioni ad un'altezza comoda. La testata di chiusura è fissata al corpo del fermentatore con dodici bulloni passanti in acciaio.

#### *Trasmissioni del moto all'agitatore*

Un motore da 300 watt, portato da una mensola a bandiera regolabile, resa solidale con la flangia della testata del fermentatore mediante due dei bulloni di fissaggio, trasmette il moto all'agitatore per mezzo di un adatto accoppiamento del tipo trapezoidale (9 tav. II).

### FERMENTATORE DA 300 LITRI

Esso è illustrato nella fig. 2 e le tavole VI e VII ne rappresentano rispettivamente una sezione parziale e una verticale.

#### *Testata del fermentatore*

La testata del fermentatore (12 tav. VII) è costituita da una lastra circolare bombata, di acciaio inossidabile 18/8 - 0,06 C., dello spessore di mm. 4 e cerchiata da una flangia di ferro, che porta 24 fori equidistanti per il passaggio dei bulloni al fine di fissarla al corpo del fermentatore, particolare (12 tav. VIII a). Sulla testata sono praticati nove fori, come per il fermentatore da 90 litri, che servono per lo stesso scopo avanti specificato: la loro ubicazione risulta evidente dalla tav. VIII.

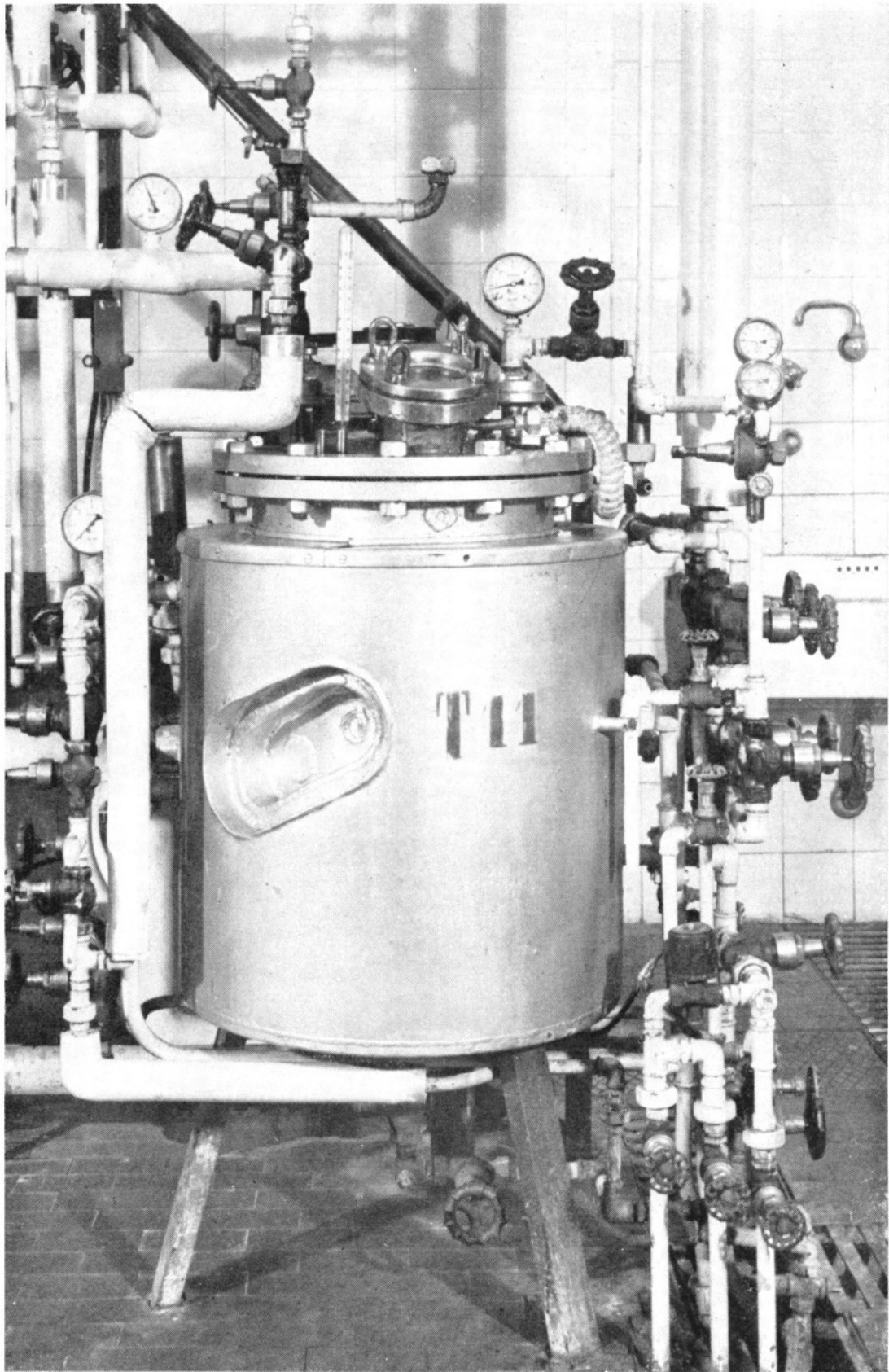
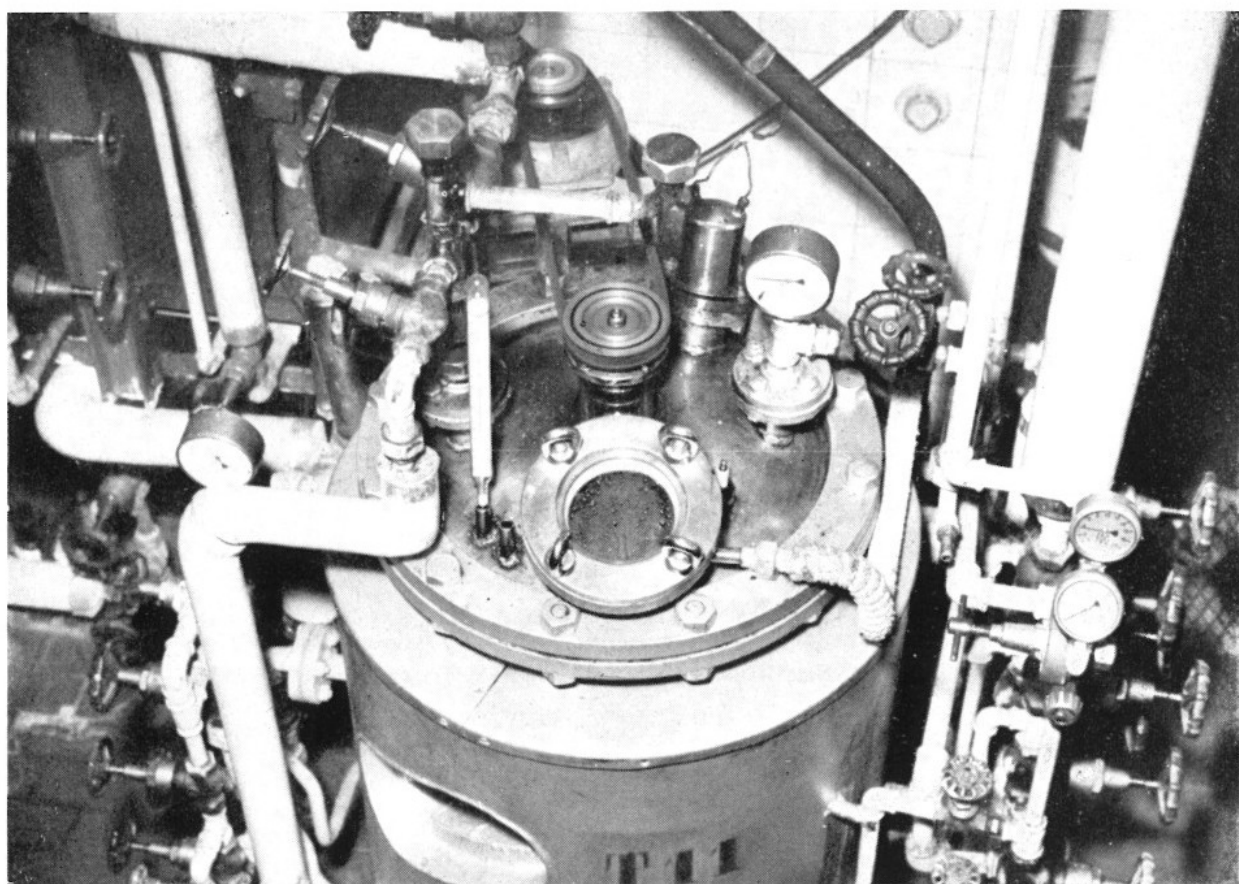


Fig 1. - Fermentatore da 90 litri con il complesso di guida e di tenuta dell'agitatore alloggiato sulla cupola.



*Fig. 1a.* - Fermentatore da 90 litri. La testata vista dall'alto.

S. PALADINO, F. UGOLINI e E. B. CHAIN - Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.

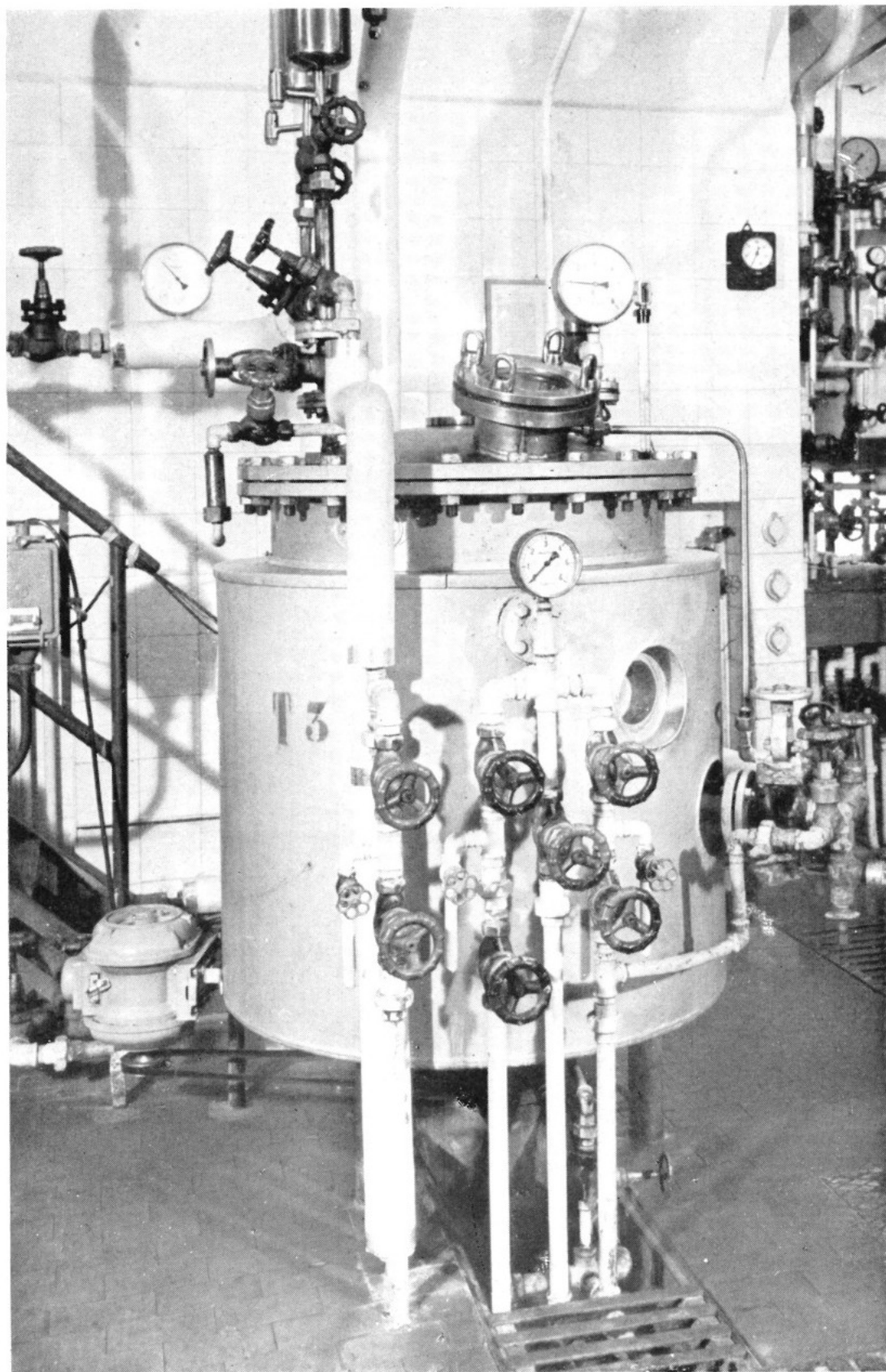
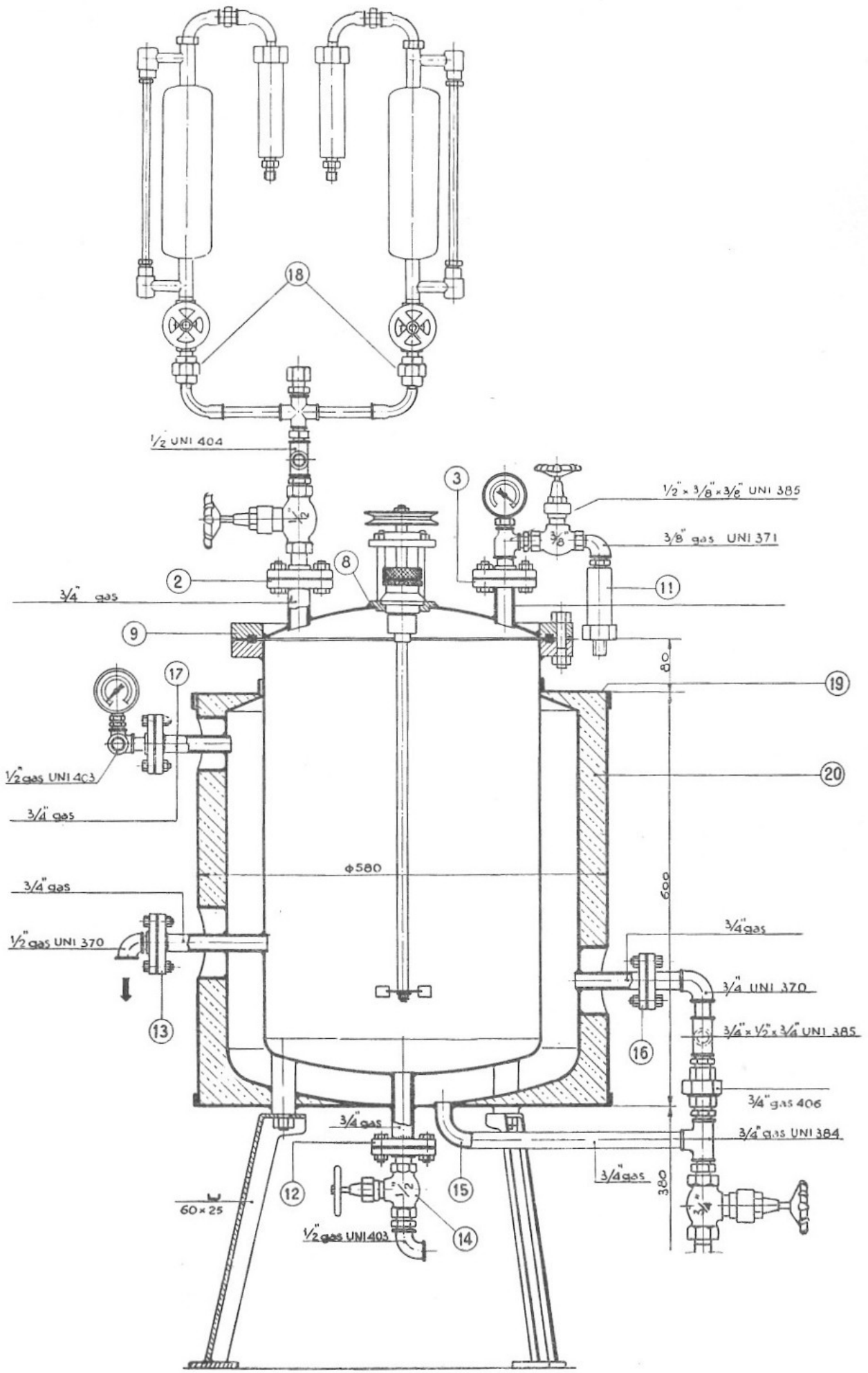


Fig. 2. - Fermentatore da 300 litri con il complesso di guida e di tenuta dell'agitatore alloggiato sul fondo.

*Tav. I* - Sezione del fermentatore da l 90 completo degli accessori.

- 2) Flangia per l'attacco del complesso per la introduzione nel fermentatore di liquidi sterili durante la fermentazione.
- 3) Flangia per l'attacco del complesso comandante la uscita dell'aria dal fermentatore.
- 8) Flangia per l'alloggiamento del complesso di guida e di tenuta dell'asse dell'agitatore.
- 9) Flangia per l'alloggiamento della testata sul corpo del fermentatore.
- 11) Filtro sull'uscita dell'aria dal fermentatore.
- 12) Flangia dello scarico di fondo del fermentatore.
- 13) Flangia per l'allacciamento del complesso per la presa dei campioni.
- 14) Valvola per lo scarico di fondo del fermentatore.
- 15) Scarico della camicia del fermentatore.
- 16) Ingresso in camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 17) Uscita dalla camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 18) Innesti per i recipienti sussidiari.
- 19) Coperchio per la chiusura dell'intercapedine contenente il coibente necessario per l'isolamento termico della camicia del fermentatore.
- 20) Lana di vetro usata come coibente per l'isolamento termico della camicia del fermentatore.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



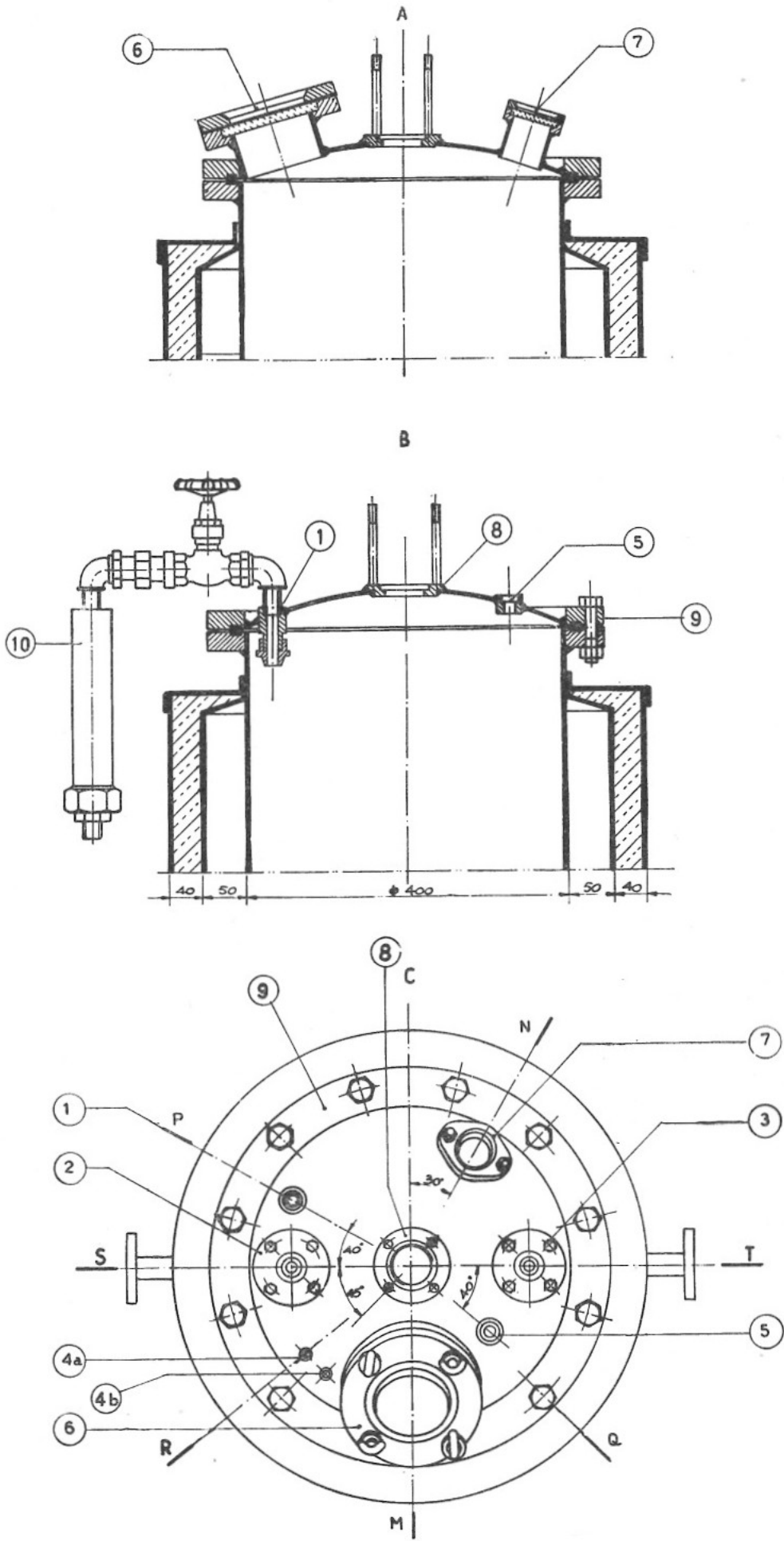
Tav. I

*Tav. II* - Pianta e due sezioni del fermentatore da l 90.

- (A) Sezione lungo MN.
- (B) Sezione lungo PQ.

- 1) Ingresso dell'aria.
- 2) Flangia per l'attacco del complesso per la introduzione nel fermentatore di liquidi sterili durante la fermentazione.
- 3) Flangia per l'attacco del complesso comandante la uscita dell'aria dal fermentatore.
- 4) 4-a) 4-b) Sonde termometriche.
- 5) Elettrodo rivelatore della schiuma.
- 6) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore.
- 7) Oblò per la illuminazione dell'interno del fermentatore
- 8) Flangia per l'alloggiamento del complesso di guida e di tenuta dell'asse dell'agitatore.
- 9) Flangia per l'alloggiamento della testata al corpo del fermentatore.
- 10) Filtro sull'ingresso dell'aria nel fermentatore.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

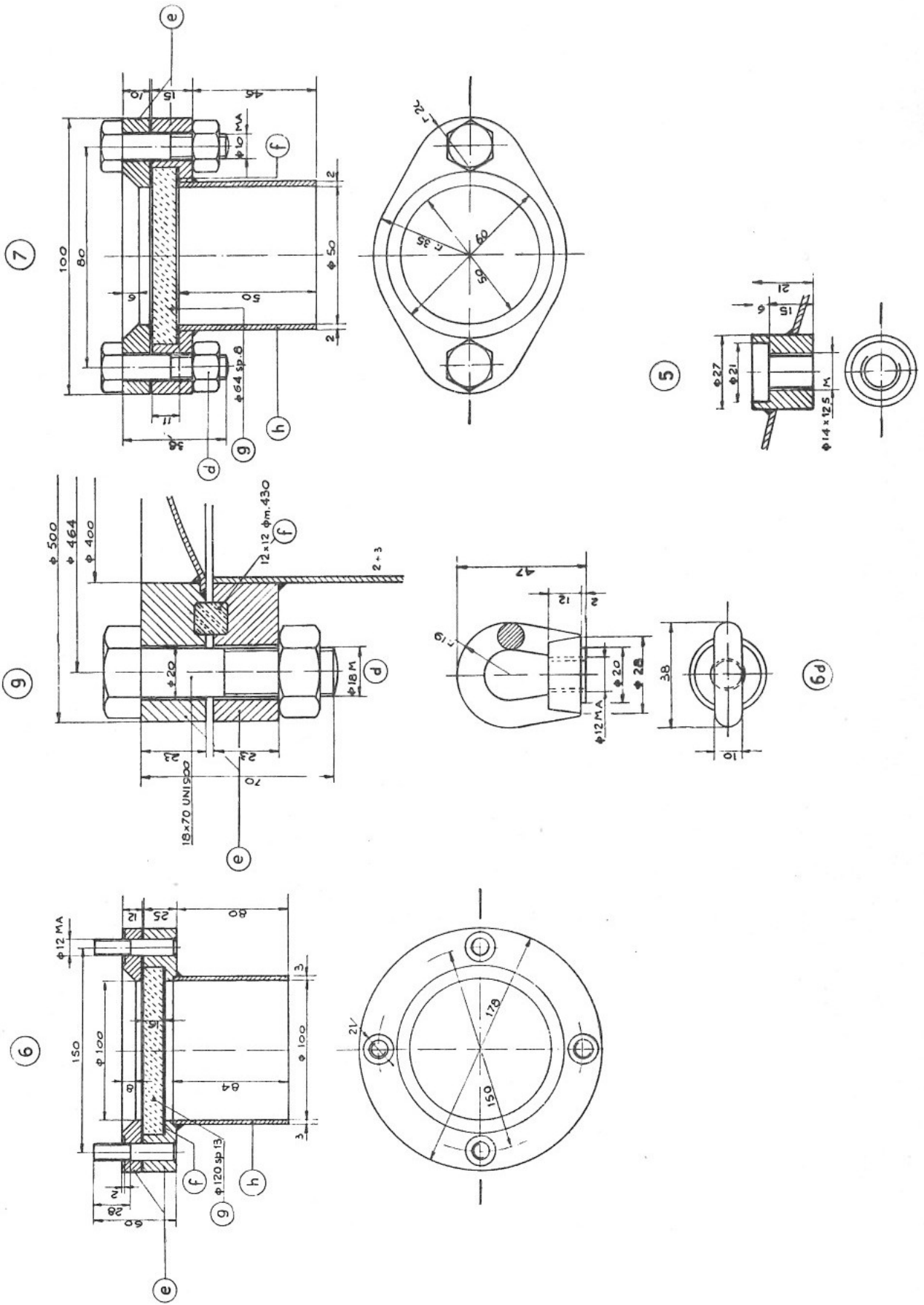


*Tav. II*

*Tav. II-a* - Dettagli costruttivi di 5, 6, 7 e 9 della Tav. II

- 5) Sede per l'alloggiamento dell'elettrodo rivelatore della schiuma (acciaio inox).
- 5) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore:
  - e) flangia in acciaio
  - f) guarnizione in gomma
  - g) coperchio in vetro pyrex
  - h) prolungamento in acciaio inox.
- 7) Sede di alloggiamento dell'oblò per la illuminazione dell'interno del fermentatore:
  - e) flangia in acciaio
  - f) guarnizione in gomma
  - g) coperchio in vetro pyrex
  - h) prolungamento in acciaio inox.
- 9) Flangie per il bloccaggio della testa al corpo del fermentatore:
  - d) bullone in acciaio inox
  - e) flangia in acciaio
  - f) guarnizione in gomma.

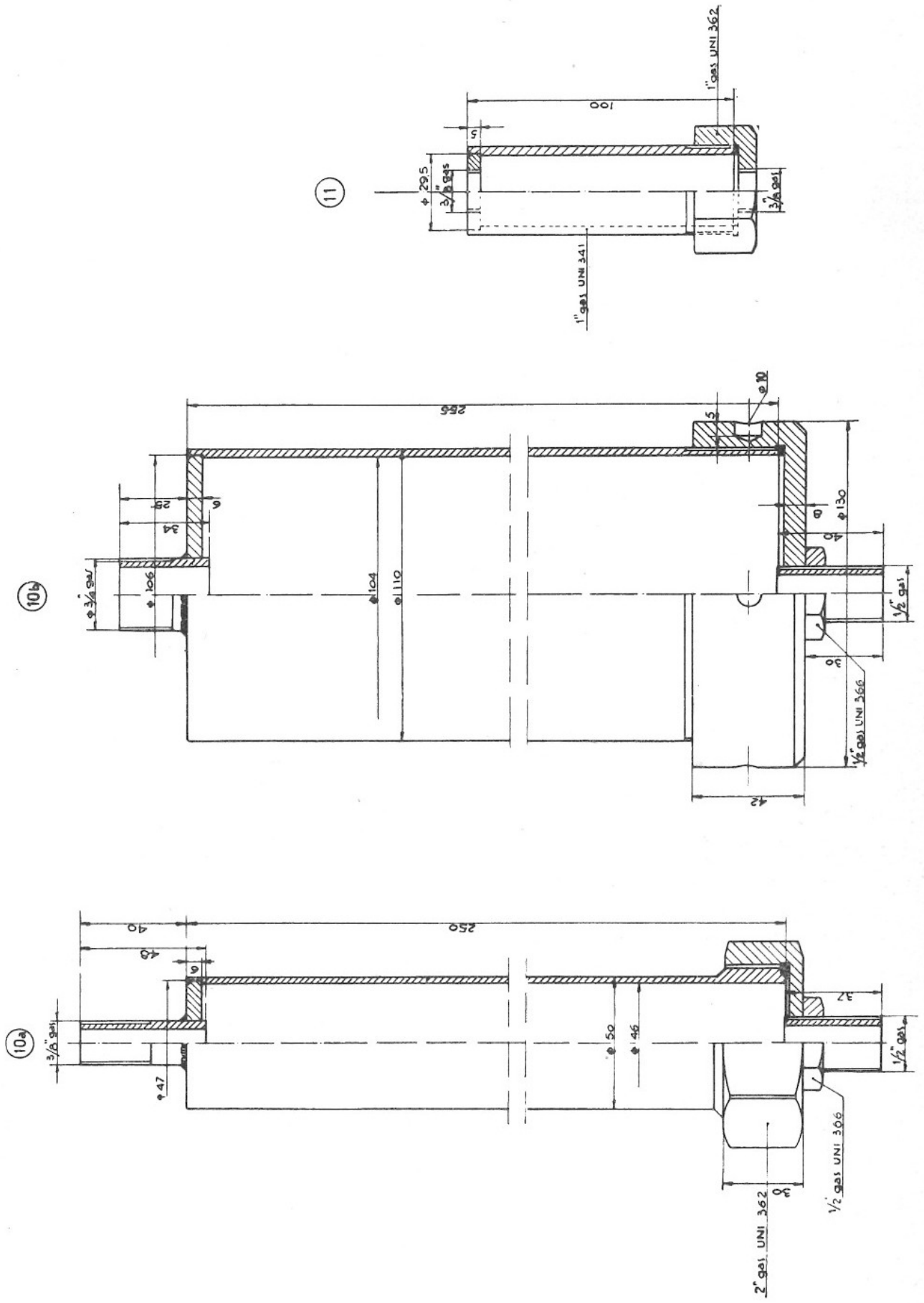
Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.



*Tav. II-b* - Dettagli costruttivi del filtro dell'aria del fermentatore da l 90.

- 10a) Ingresso dell'aria per la diffusione con il sistema « vortice ».
- 10b) Ingresso dell'aria per la diffusione con distributore dell'aria ed antivortici.
- 11) Uscita dell'aria dal fermentatore per entrambi i sistemi di diffusione.

Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.

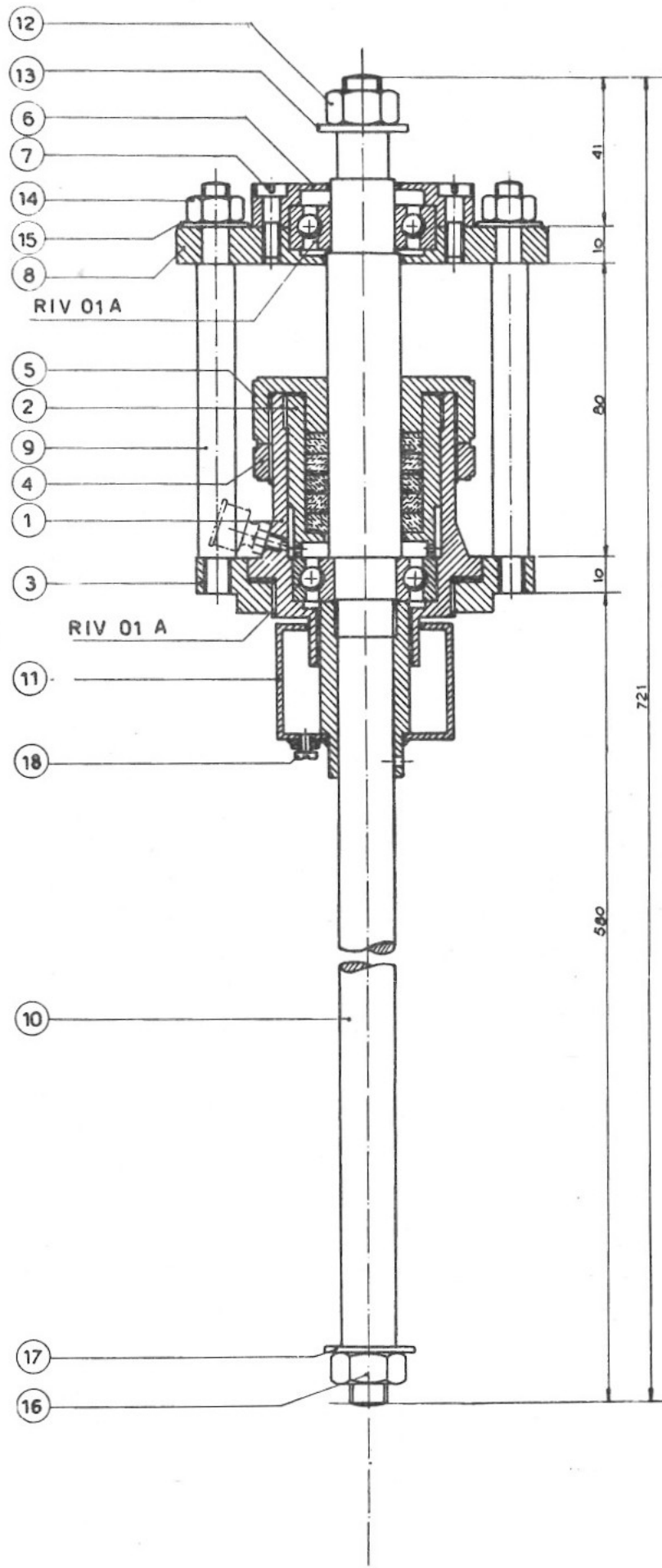


Tav. 11-b

*Tav. III* - Complesso di guida e di tenuta dell'albero dell'agitatore per il fermentatore da 1 90.

<i>Componenti</i>	<i>Materiale</i>
1) Scatola del complesso di tenuta e di guida.	Acciaio inox.
2) Porta treccia.	Acciaio inox.
3) Flangia sul fermentatore per l'alloggiamento del complesso di guida e di tenuta.	Acciaio inox.
4) Anello di bloccaggio.	Ottone.
5) Premistoppa.	Ottone.
6) Coperchio del cuscinetto superiore.	Alluminio.
7) Viti di fissaggio al pezzo (8) del pezzo (7).	Acciaio.
8) Alloggiamento del cuscinetto superiore.	Alluminio.
9) Montanti per il sostegno del cuscinetto superiore.	Acciaio.
10) Albero dell'agitatore.	Acciaio inox.
11) Coppa di raccolta del grasso di supero.	Acciaio inox.
12) Dato per il fissaggio della puleggia.	Acciaio inox.
13) Rondella di blocco.	Acciaio inox.
14) Dato per il fissaggio dell'alloggiamento del cuscinetto superiore.	Acciaio inox.
15) Rondella di blocco.	Acciaio inox.
16) Dato per il fissaggio della elica.	Acciaio inox.
17) Rondella di blocco.	Acciaio inox.
18) Foro per lo scarico del grasso di supero.	Acciaio inox.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

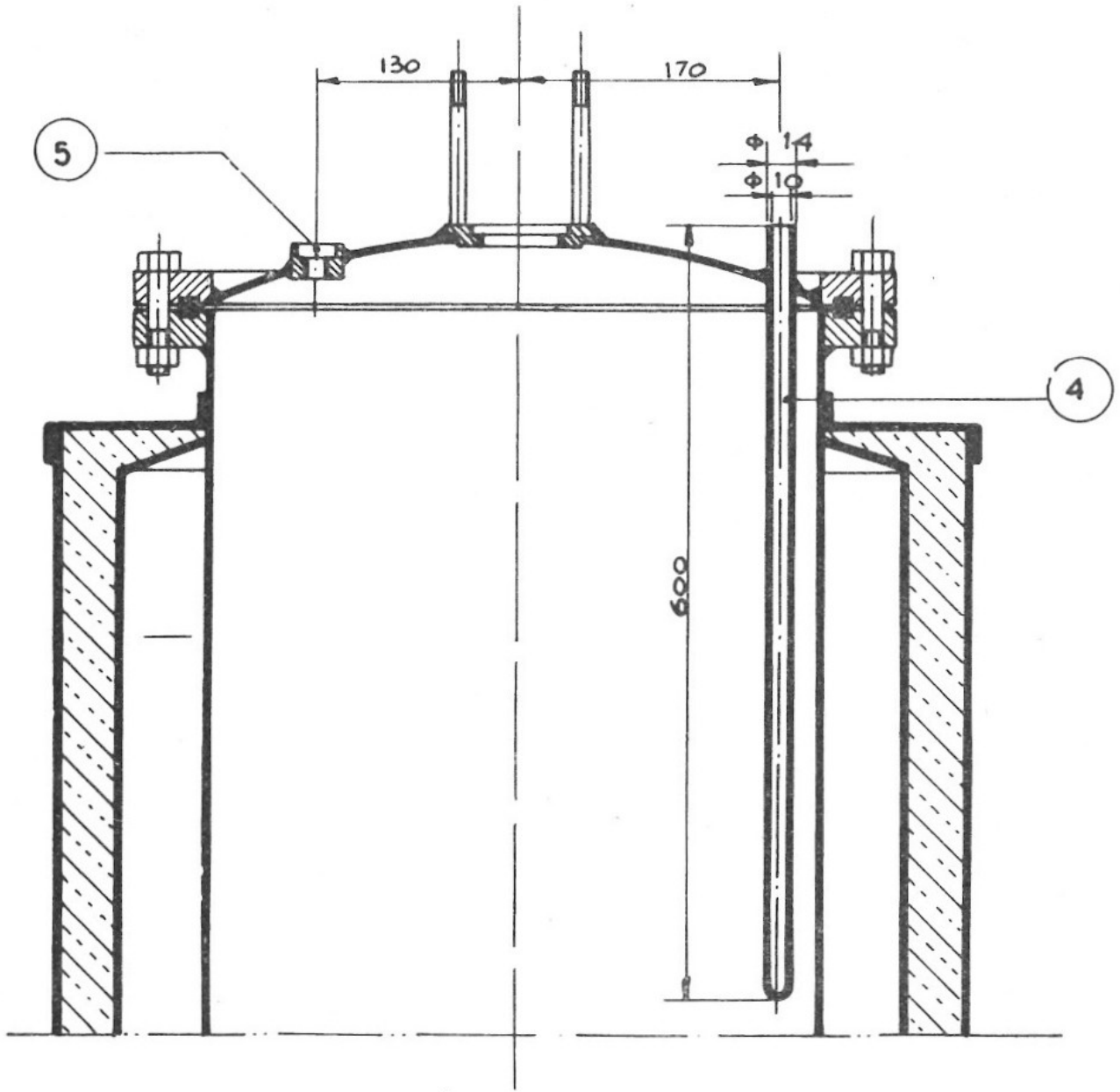


*Tav. III*



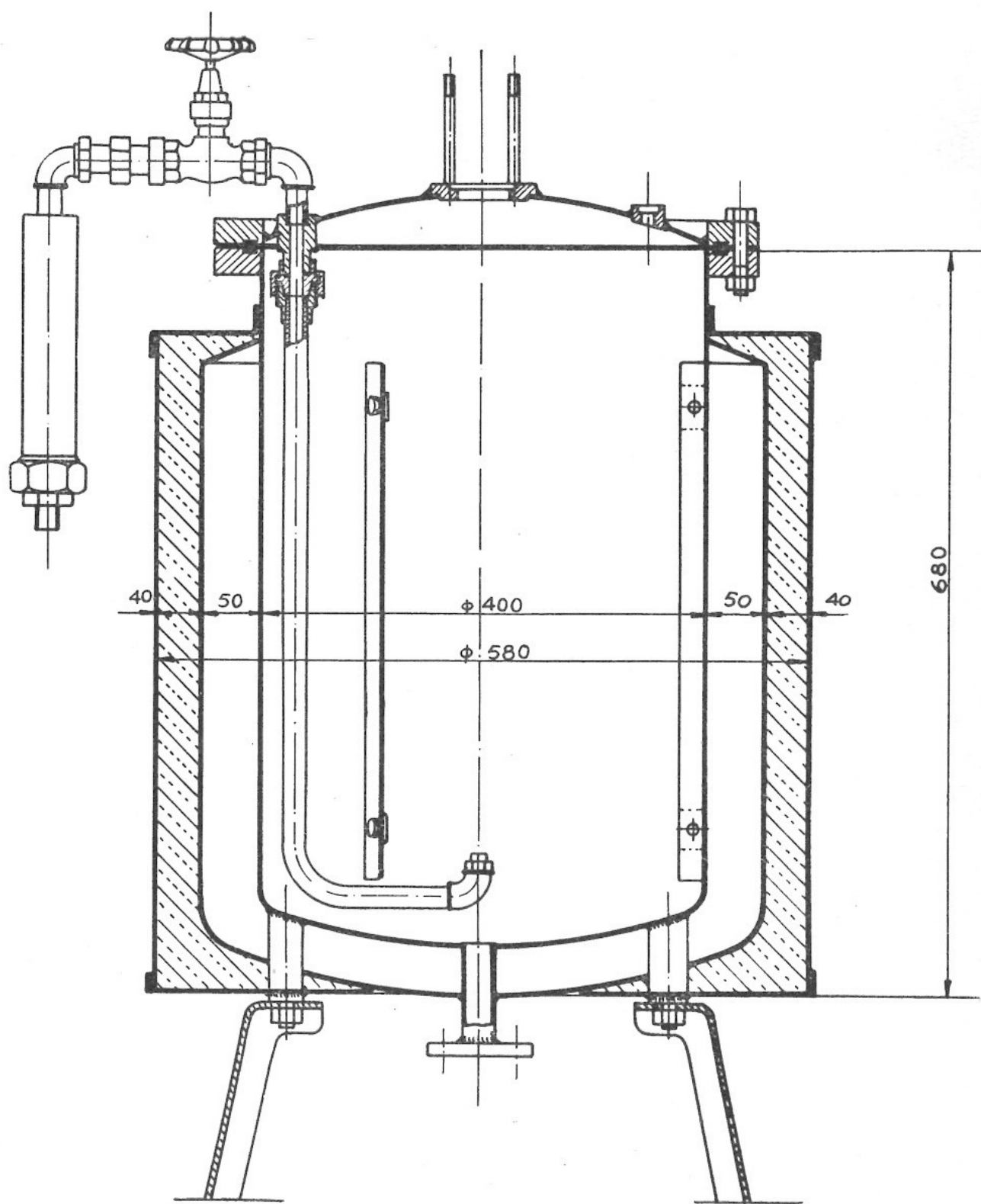


*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

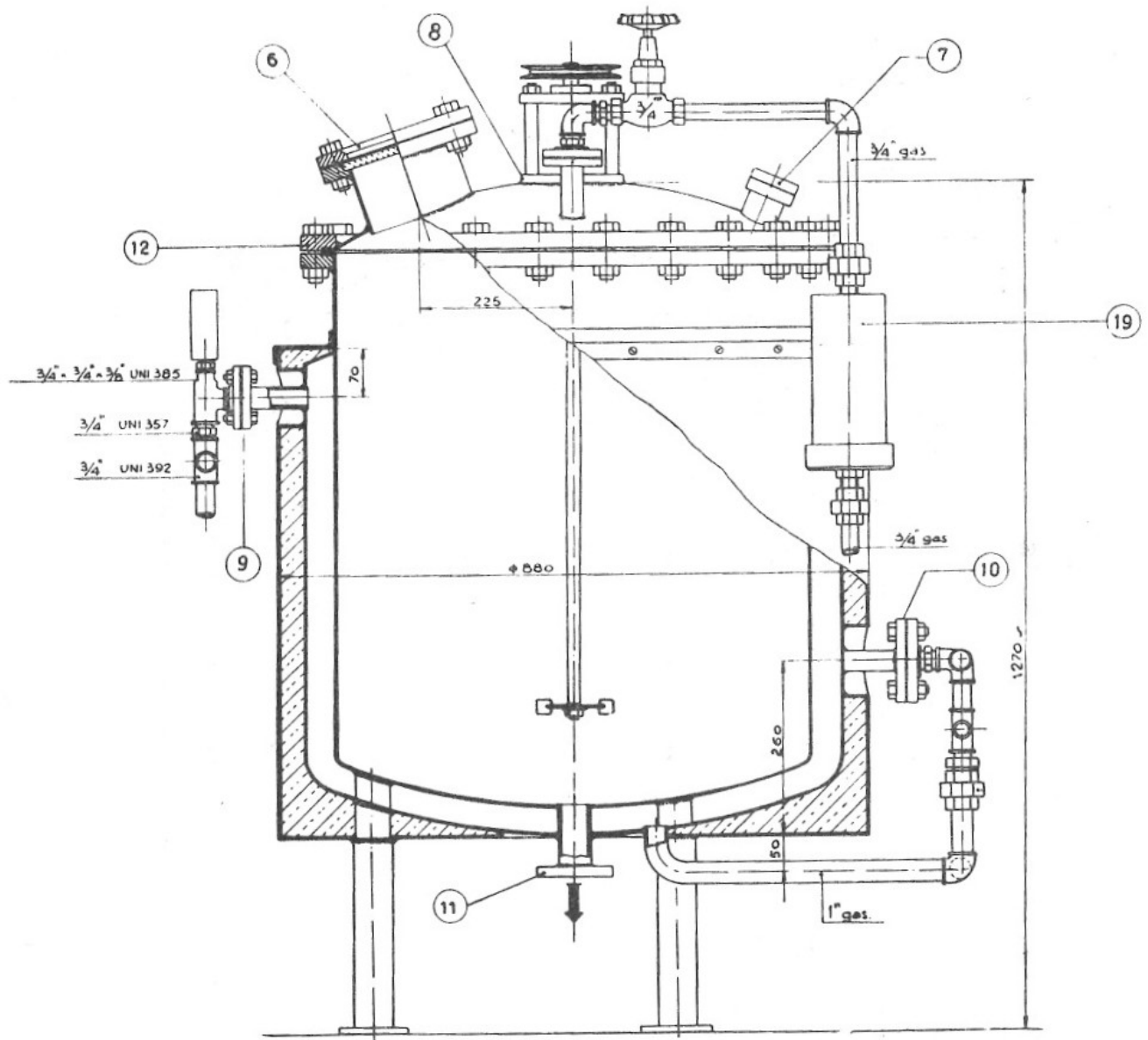


*Tav. IV - Sezione della testata del fermentatore da 190 lungo QR (vedi Tav. II).*

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



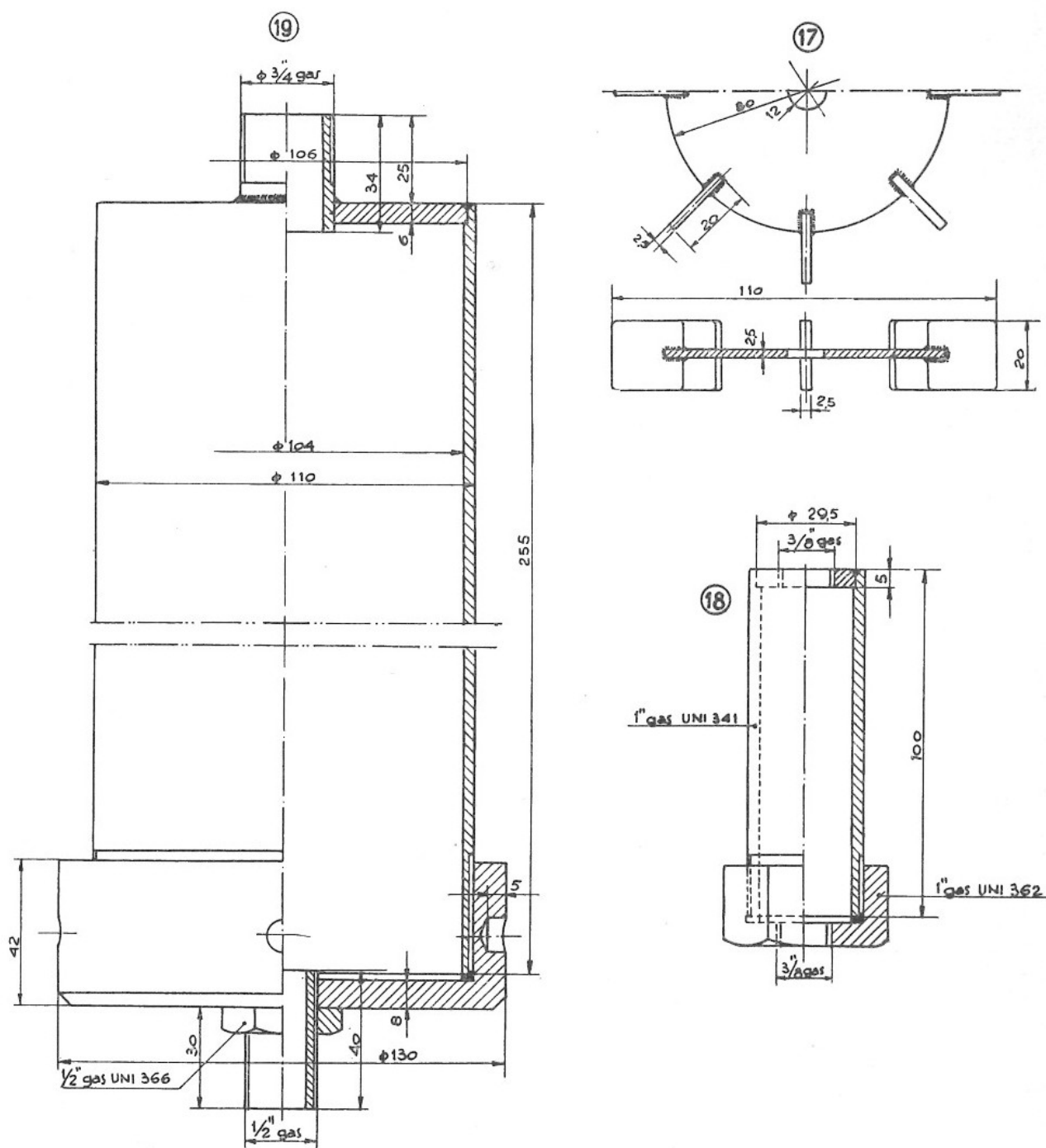
*Tav. V - Sezione del fermentatore da 190; è visibile la posizione del distributore dell'aria e degli antivortici.*



Tav. VI - Fermentatore da 1 300 sezionato parzialmente.

- 6) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore (dettagli Tav. VIII-a - 6).
- 7) Oblò per illuminazione dell'interno del fermentatore (dettagli Tav. VIII-a - 7).
- 8) Flangia per l'alloggiamento del complesso di tenuta e di guida dell'asse dell'agitatore.
- 9) Uscita dalla camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 10) Ingresso nella camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 11) Flangia dello scarico di fondo del fermentatore.
- 12) Flangia per il bloccaggio della testata al corpo del fermentatore.
- 19) Filtro sull'ingresso dell'aria nel fermentatore (dettagli Tav. VI-a - 19).

Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.

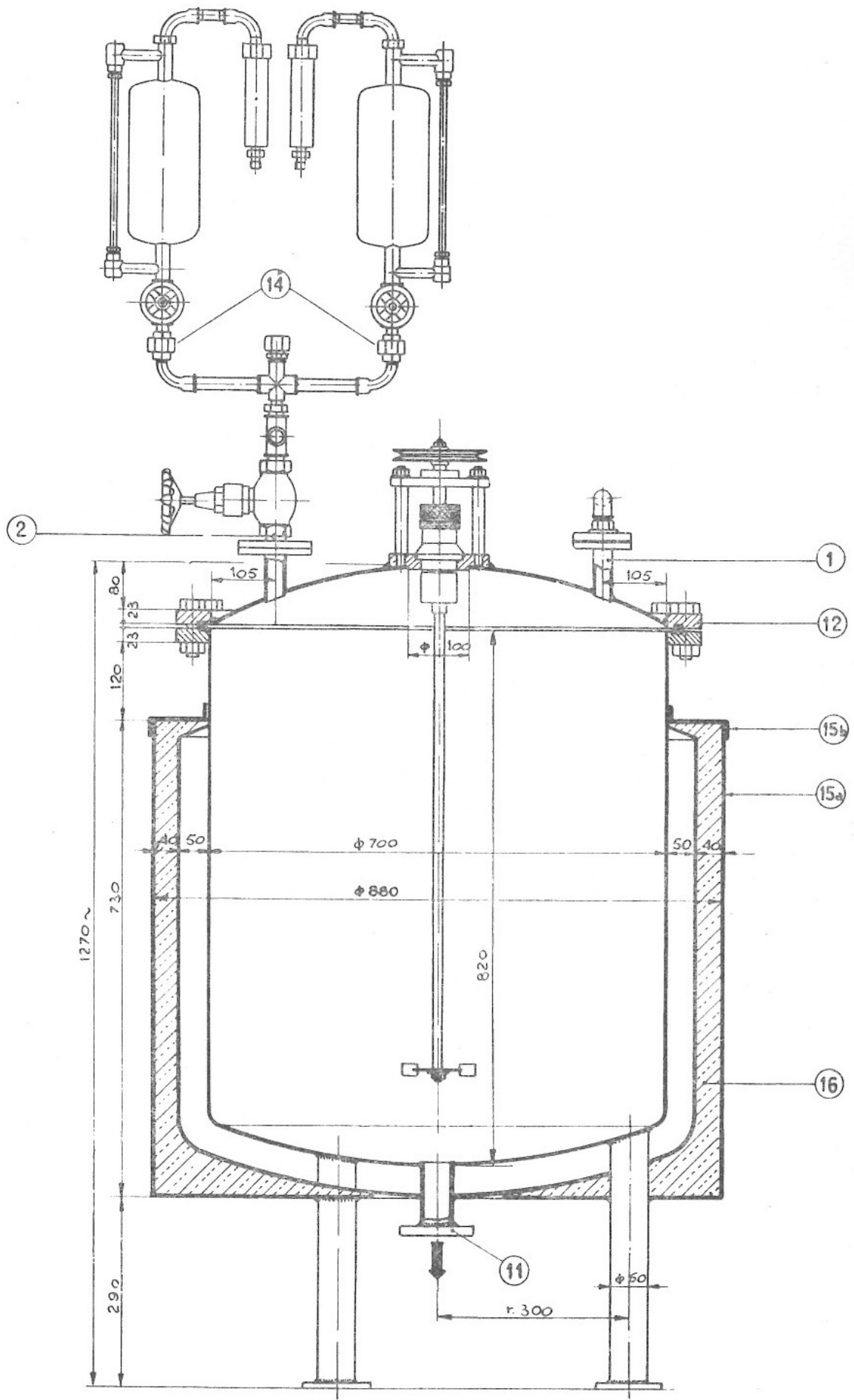


Tav. VI-a - Dettagli costruttivi del filtro d'ingresso dell'aria (19), di quello d'uscita (8), e dell'elica agitatrice per il fermentatore da l 300. Tutti questi componenti sono costruiti in acciaio inossidabile.

*Tav. VII* - Una sezione del fermentatore da l 300 completo dei recipienti per l'aggiunta di soluzioni sterili durante la fermentazione.

- 1) Ingresso dell'aria nel fermentatore.
- 2) Ingresso soluzioni sterili durante la fermentazione.
- 11) Scarico di fondo del fermentatore.
- 12) Flangia della testata del fermentatore.
- 14) Bocchettoni di collegamento del fermentatore con i recipienti contenenti le soluzioni sterili da introdurre nel fermentatore durante la fermentazione.
- 15-a) Rivestimento esterno del fermentatore (lamiera di ferro).
- 15-b) Copertura dell'intercapedine contenente il coibente (in due parti, lamiera di alluminio).
- 16) Rivestimento coibente per l'isolamento termico della camicia del fermentatore (lana di vetro).

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

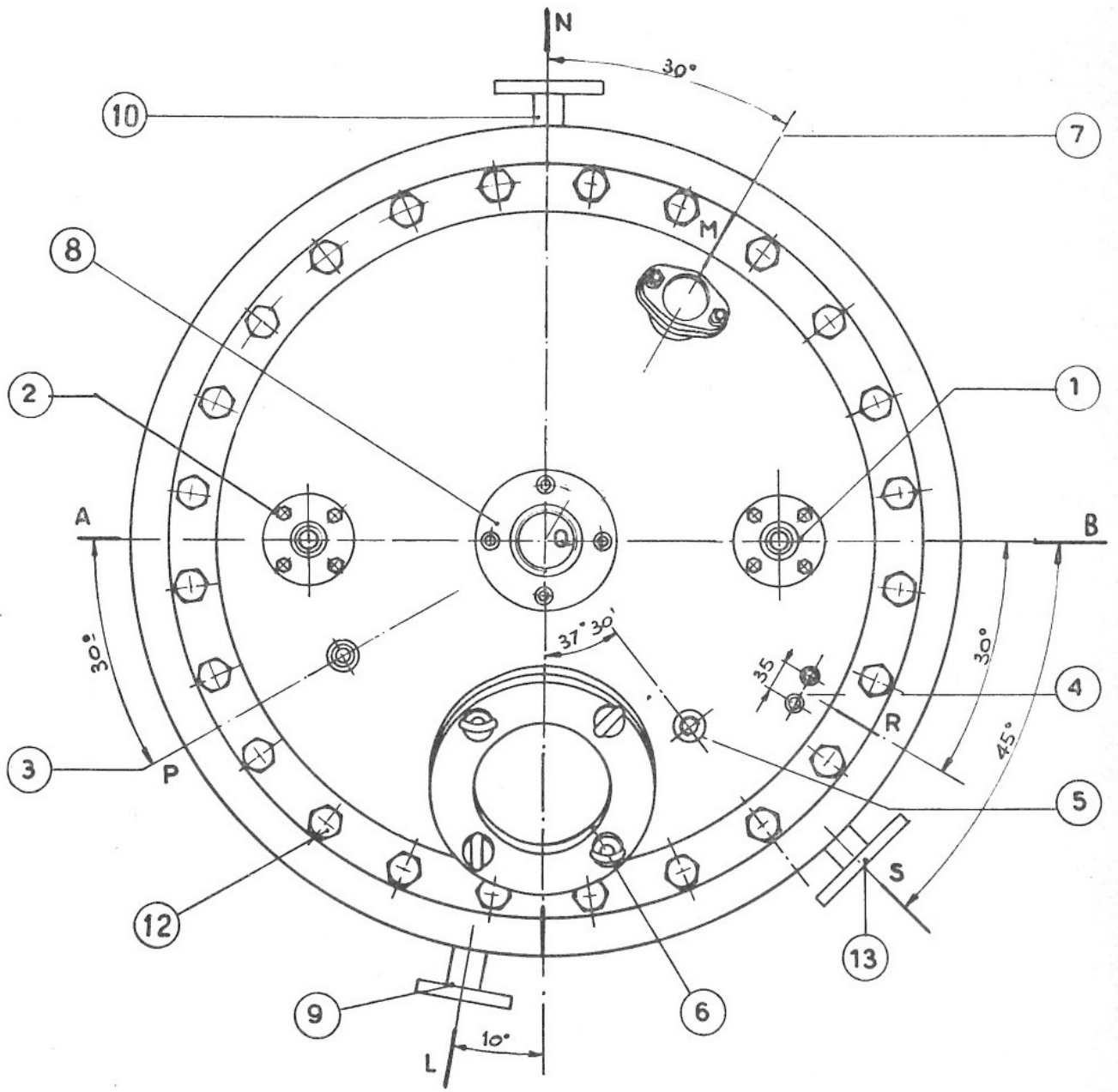


*Tav. VII*

*Tav. VIII* - Testata del fermentatore da l 300.

- 1) Flangia per l'attacco del complesso alimentante l'aria sterile al fermentatore.
- 2) Flangia per l'attacco del complesso per la introduzione nel fermentatore di soluzioni sterili durante la fermentazione.
- 3) Uscita dell'aria dal fermentatore.
- 4) Sonde termometriche.
- 5) Sede per l'alloggiamento dell'elettrodo rivelatore della schiuma.
- 6) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore.
- 7) Oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore.
- 8) Flangia per l'alloggiamento del complesso di tenuta e di guida dell'albero dell'agitatore.
- 9) Uscita dalla camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 10) Ingresso nella camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 12) Flangia per il bloccaggio della testata al corpo del fermentatore.
- 13) Flangia per l'allacciamento del complesso per la presa dei campioni.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

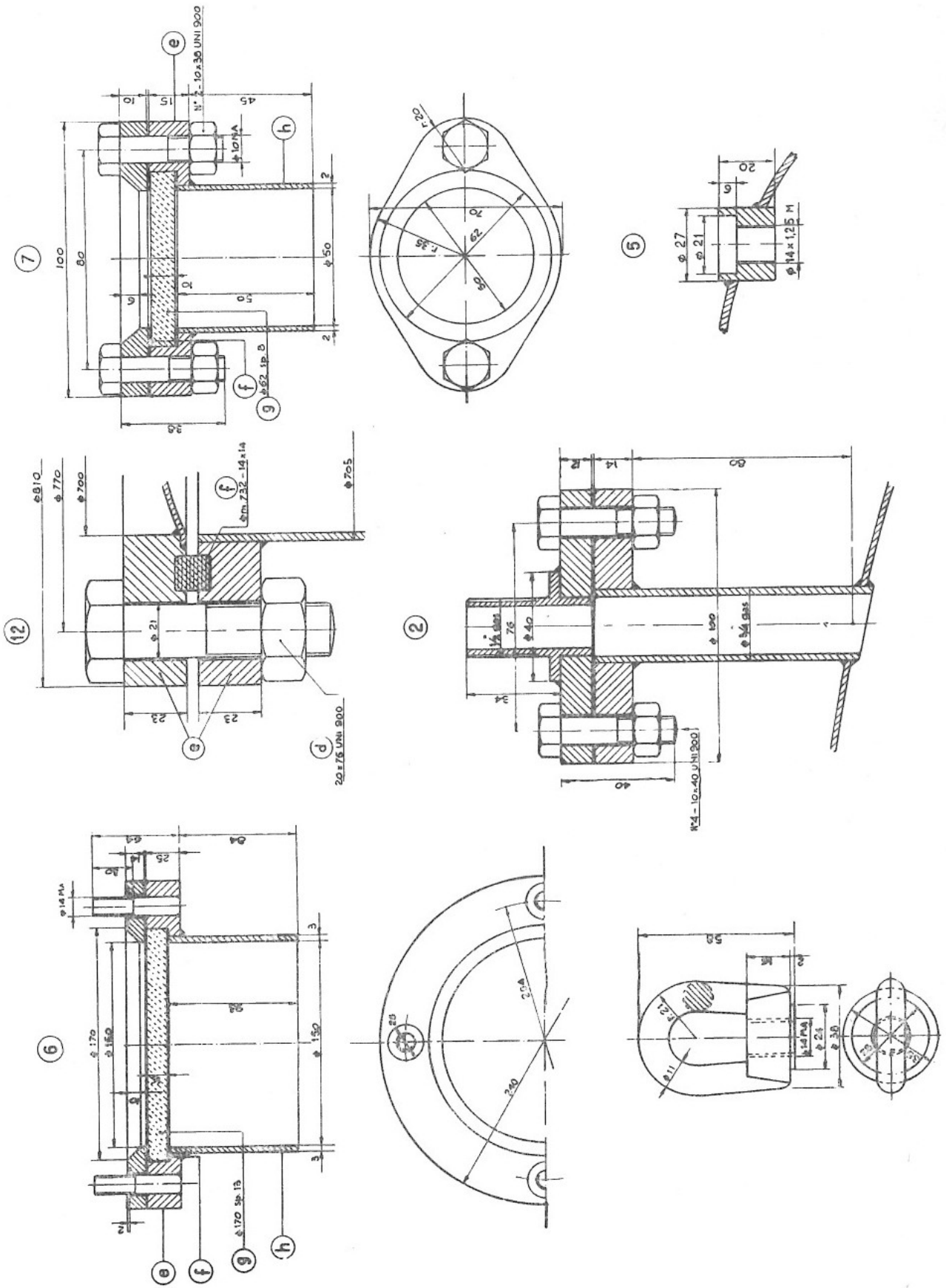


*Tav. VIII*

*Tav. VIII-a* - Dettagli costruttivi di (2), (5), (6), (7) e (12) della Tav. VIII.

- 2) Flangia per l'attacco del complesso per la introduzione nel fermentatore di soluzioni sterili durante la fermentazione (Acciaio inox).
- 5) Sede per l'alloggiamento dell'elettrodo rivelatore della schiuma.
- 6) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore:
  - e) flangie in acciaio
  - f) guarnizioni in gomma
  - g) coperchio di vetro pyrex
  - h) prolungamento in acciaio inox.
- 7) Oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore (e, f, g, h, vedi sopra).
- 12) Flangie per il bloccaggio della testa al corpo del fermentatore:
  - d) bullone in acciaio inox
  - e) flangia in acciaio
  - f) guarnizione in gomma.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vorice.*

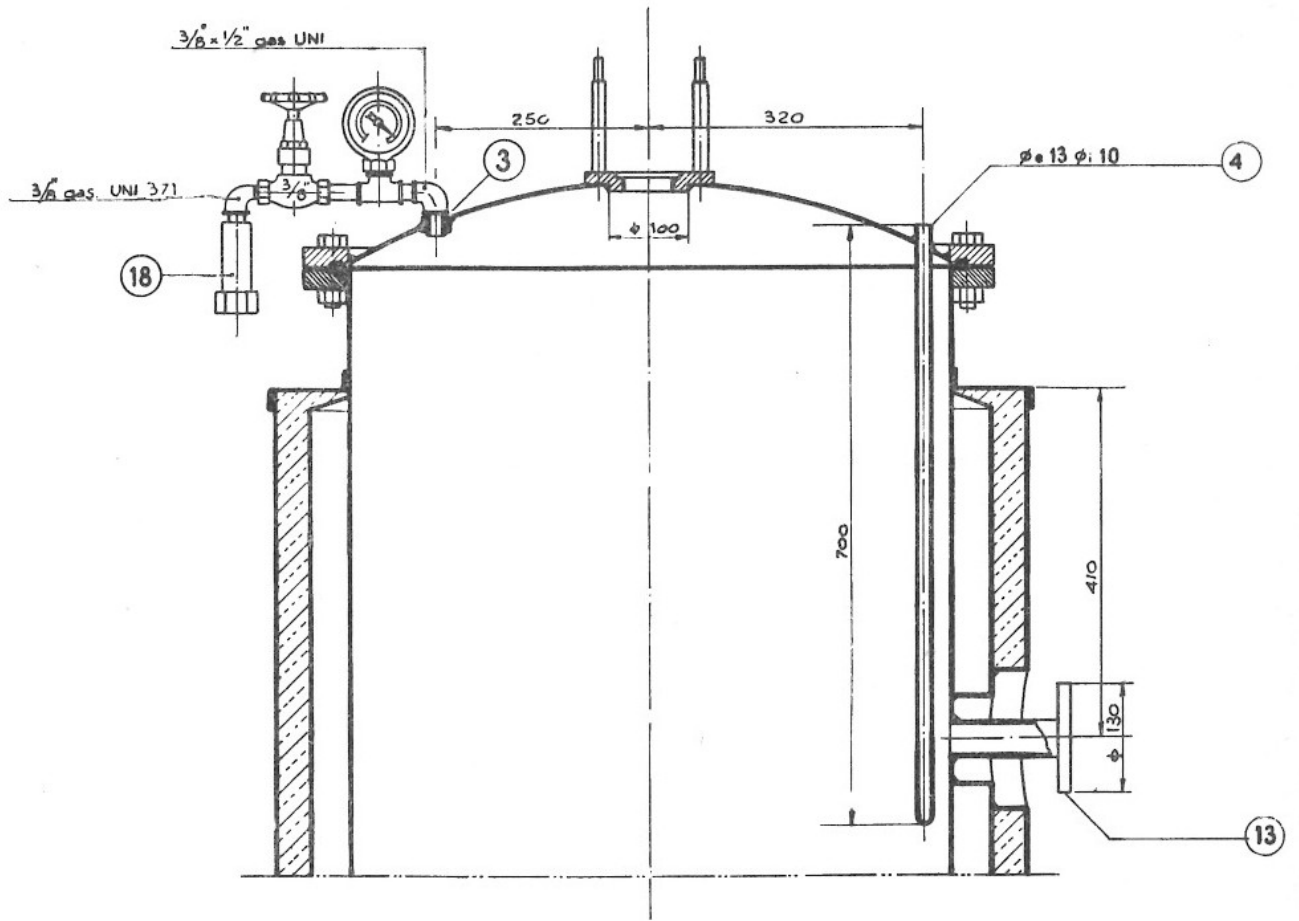


*Tav. VIII-a*

*Tav. IX* - Sezione della testata del fermentatore da l 300.

- 3) Uscita dell'aria.
- 4) Sonde termometriche.
- 13) Flangia per l'allacciamento del complesso per la presa dei campioni.
- 18) Filtro sull'uscita dell'aria dal fermentatore.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vorrice.*



Tav. IX

Tav. X - Complesso di guida e di tenuta dell'albero dell'agitatore per il fermentatore da l 300.

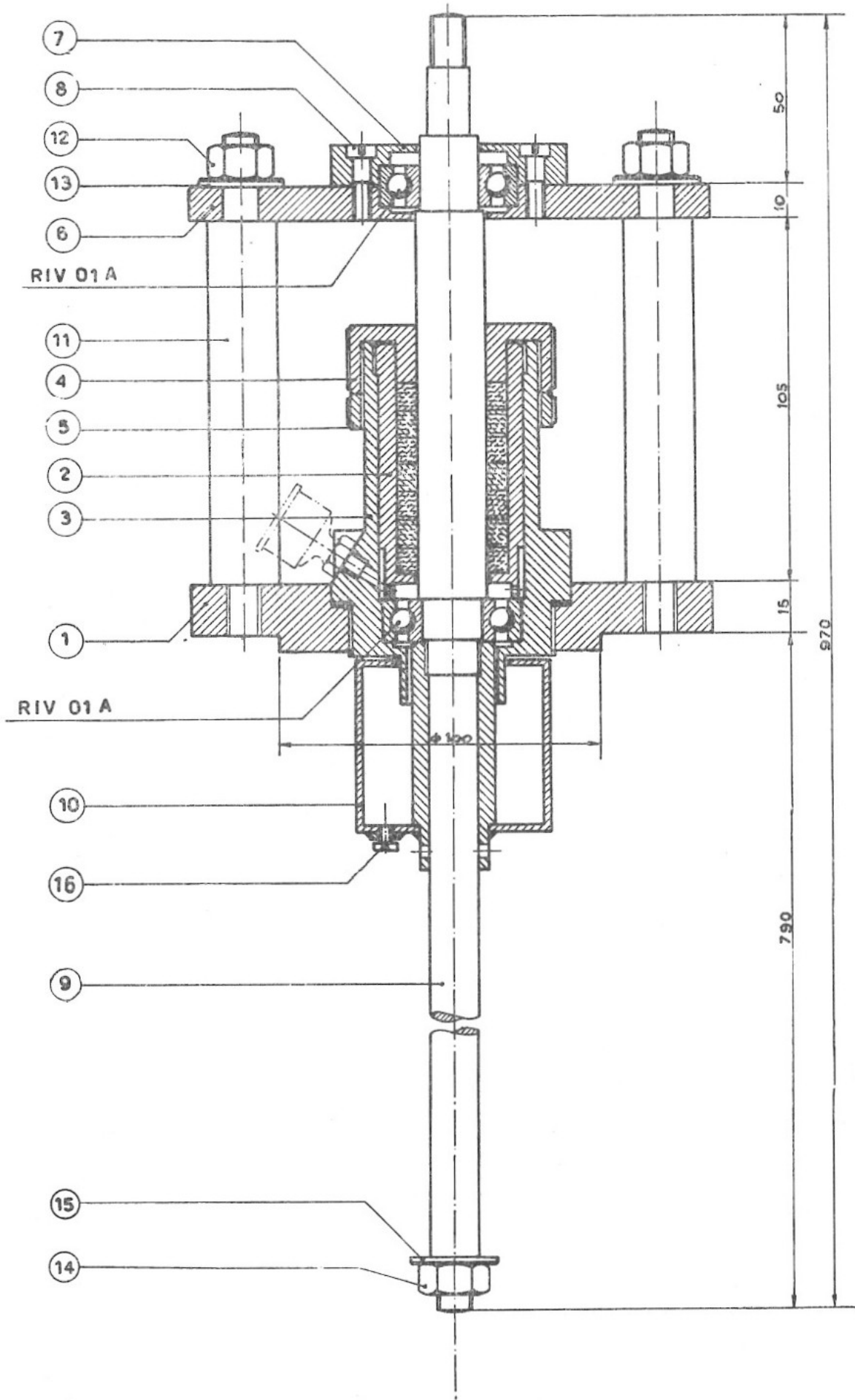
*Componenti*

- 1) Flangia sul fermentatore per l'alloggiamento del complesso di guida e di tenuta dell'asse dell'agitatore.
- 2) Porta treccia.
- 3) Scatola del complesso di tenuta e di guida.
- 4) Premistoppa.
- 5) Anello di bloccaggio.
- 6) Alloggiamento del cuscinetto superiore.
- 7) Coperchio del cuscinetto superiore.
- 8) Viti per il fissaggio del pezzo 7) al pezzo 6).
- 9) Albero dell'agitatore.
- 10) Coppa per la raccolta del grasso di supero.
- 11) Montanti per il sostegno del cuscinetto superiore.
- 12) Dado per il fissaggio dell'alloggiamento del cuscinetto superiore.
- 13) Rondella di blocco.
- 14) Dado per il fissaggio dell'elica.
- 15) Rondella di blocco.
- 16) Foro per lo scarico del grasso di supero.

*Materiale*

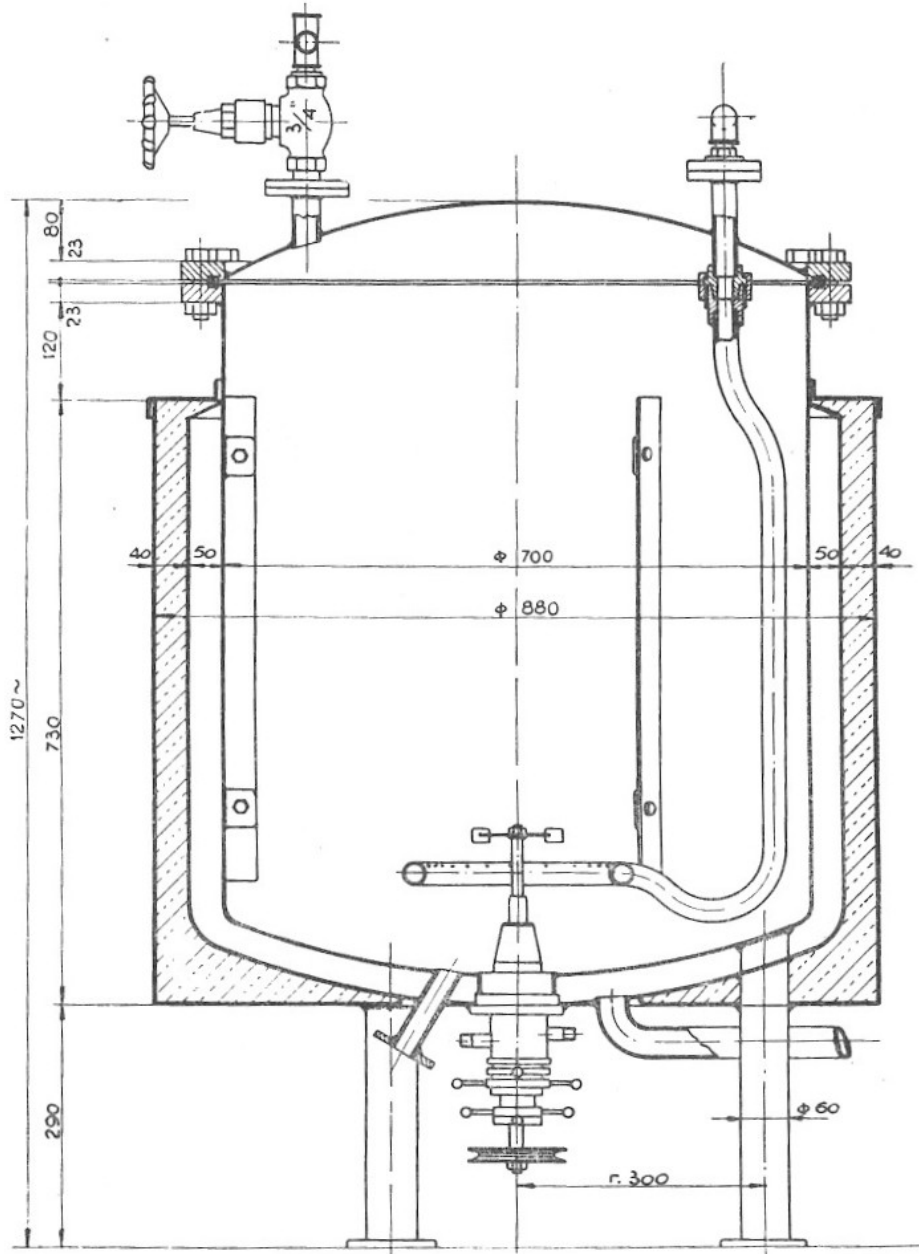
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Ottone.  
Ottone.  
Alluminio.  
Alluminio.  
Acciaio.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.  
Acciaio inox.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



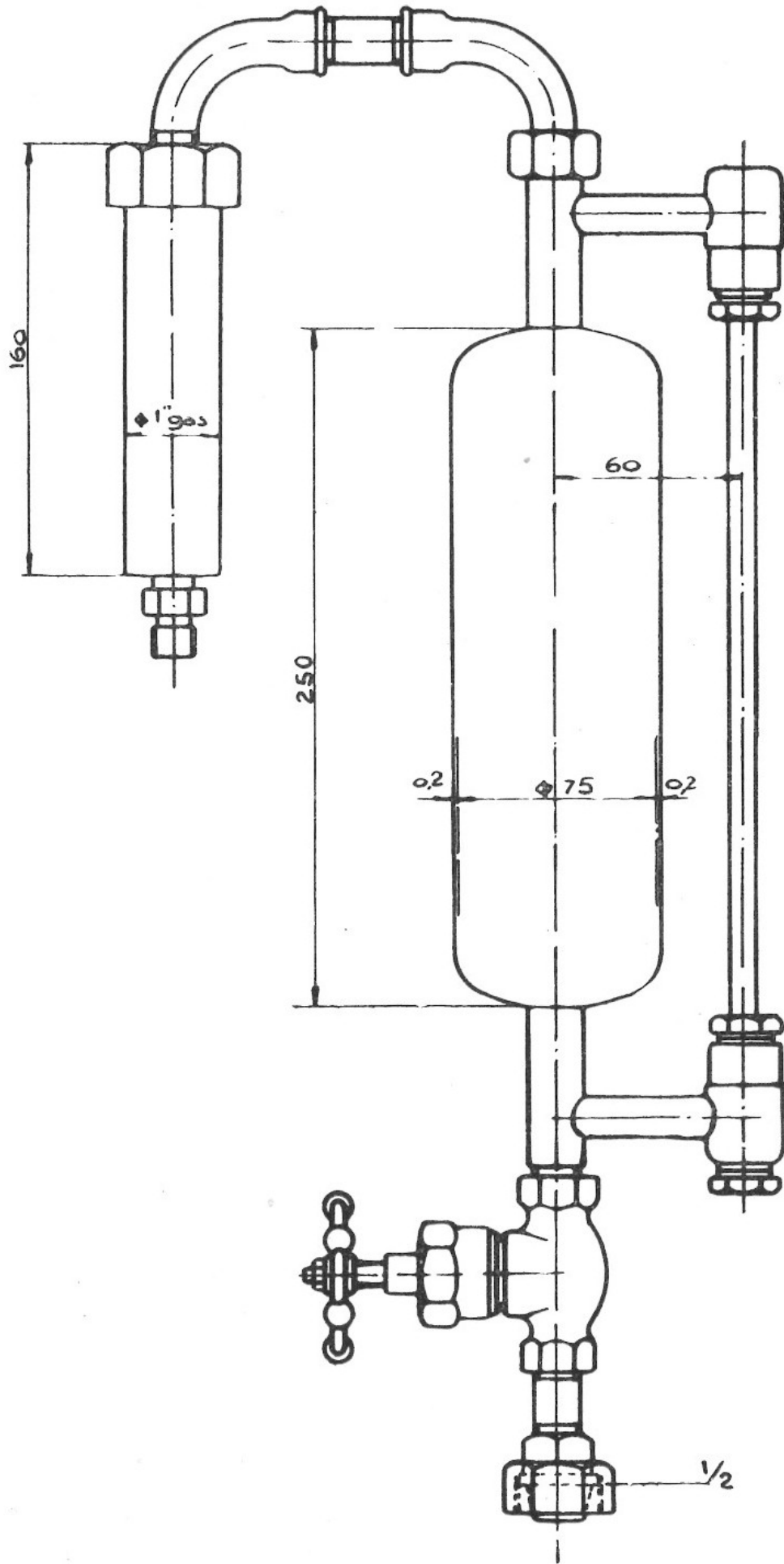
*Tav. X*

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



*Tav. XI - Sezione del fermentatore da l 300; è visibile il complesso di guida e di tenuta dell'agitatore montato sul fondo del fermentatore e la posizione del distributore dell'aria e degli antivortici.*

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

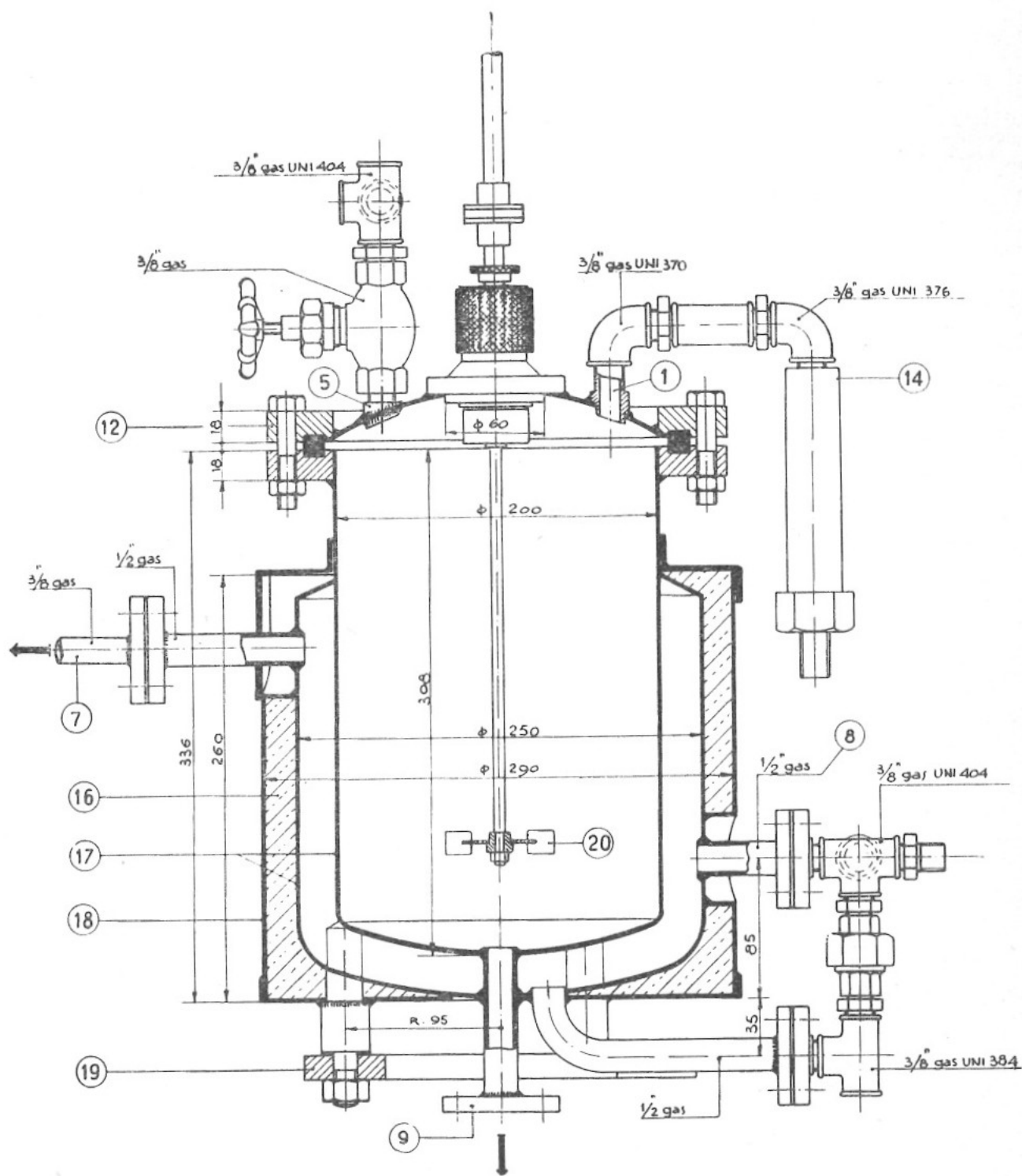


*Tav. XII - Recipiente per l'aggiunta nei fermentatori di soluzioni sterili durante la fermentazione.*

*Tav. XIII* - Sezione del fermentatore «intermedio».

- 1) Uscita dell'aria.
- 5) Ingresso dell'inoculo.
- 7) Uscita dalla camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 8) Ingresso nella camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 9) Scarico di fondo del fermentatore.
- 12) Flangia per l'alloggio della testata sul corpo del fermentatore.
- 14) Filtro sull'ingresso dell'aria nel fermentatore.
- 16) Coibente per l'isolamento termico della camicia del fermentatore (lana di vetro).
- 17) Lamiera da mm 2, in acciaio inox. del corpo del fermentatore e della camicia per la termoregolazione.
- 18) Lamiera in ferro da mm 1 per il rivestimento del coibente 16).
- 19) Piastra di base in acciaio.
- 20) Elica agitatrice.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*

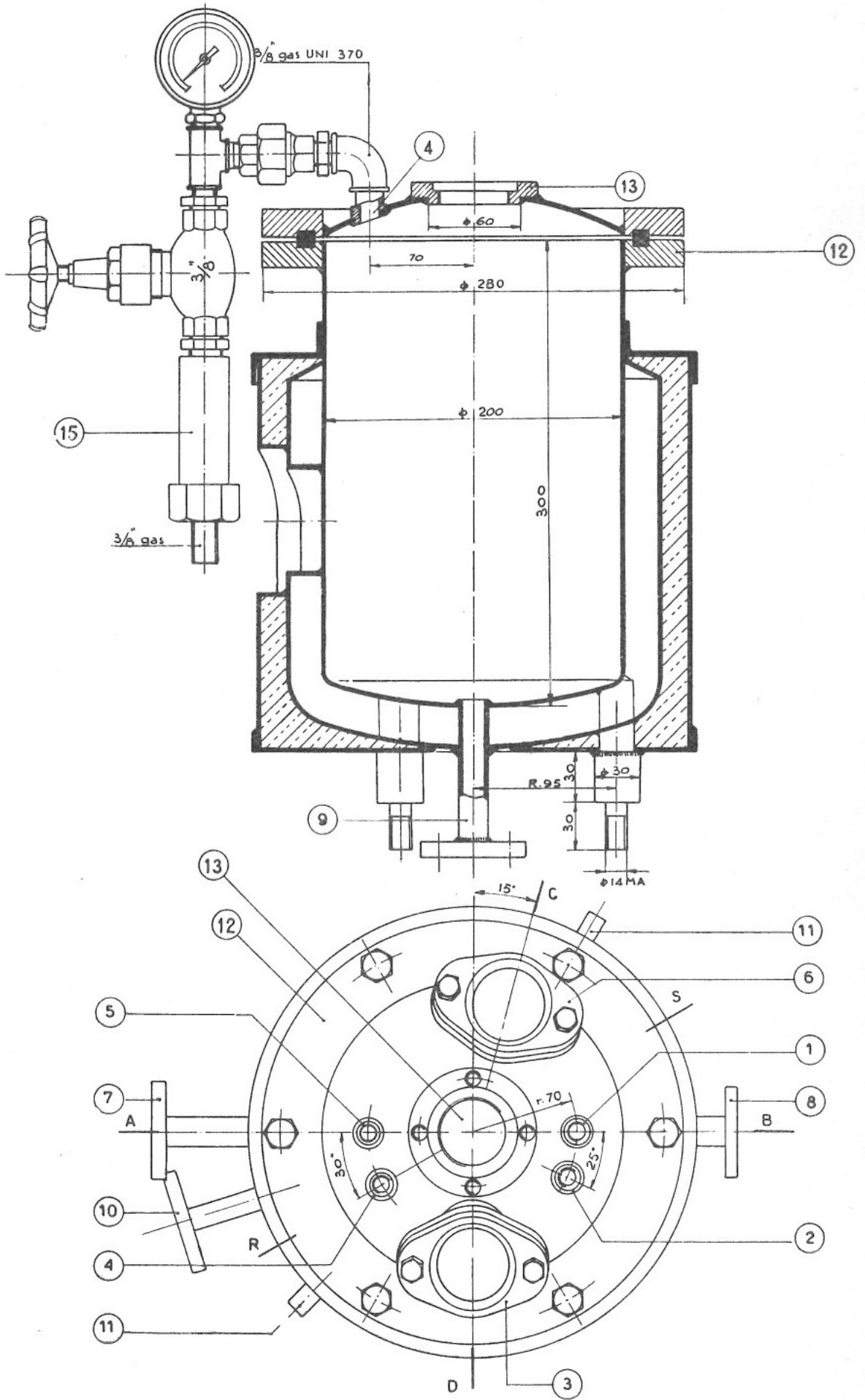


Tav. XIII

*Tav. XIV* - Sezione del fermentatore « intermedio » e pianta della sua testata.

- 1) Uscita dell'aria dal fermentatore.
- 2) Sede per l'alloggiamento dell'elettrodo rivelatore della schiuma.
- 3) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore.
- 4) Uscita dell'aria dal fermentatore.
- 5) Ingresso dell'inoculo.
- 6) Oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore.
- 7) Uscita dalla camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 8) Ingresso nella camicia dell'acqua per la termoregolazione.
- 9) Scarico di fondo del fermentatore.
- 10) Presa dei campioni.
- 11) Sonde termometriche.
- 12) Flangia del corpo del fermentatore per il fissaggio della testata.
- 13) Flangia per l'alloggiamento del complesso di guida e di tenuta dell'albero dell'agitatore.
- 15) Filtro sull'uscita dell'aria dal fermentatore.

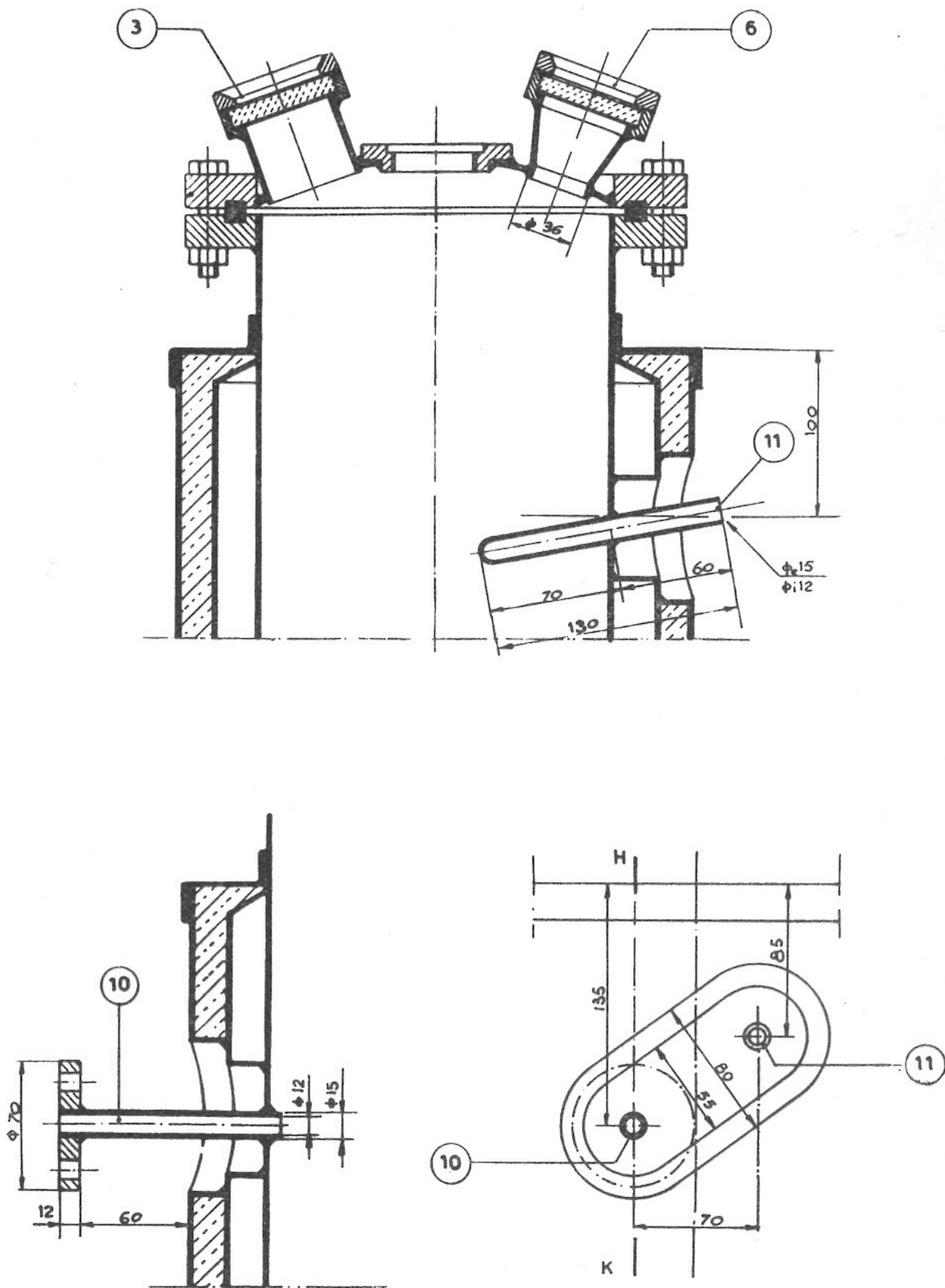
Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazioni di vorrice.



Tav. XIV

*Tav. XV* - Dettagli costruttivi del fermentatore « intermedio »: (6) oblò di illuminazione, (3) oblò per l'osservazione, (10) presa dei campioni, (11) sonda termometrica.

Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.

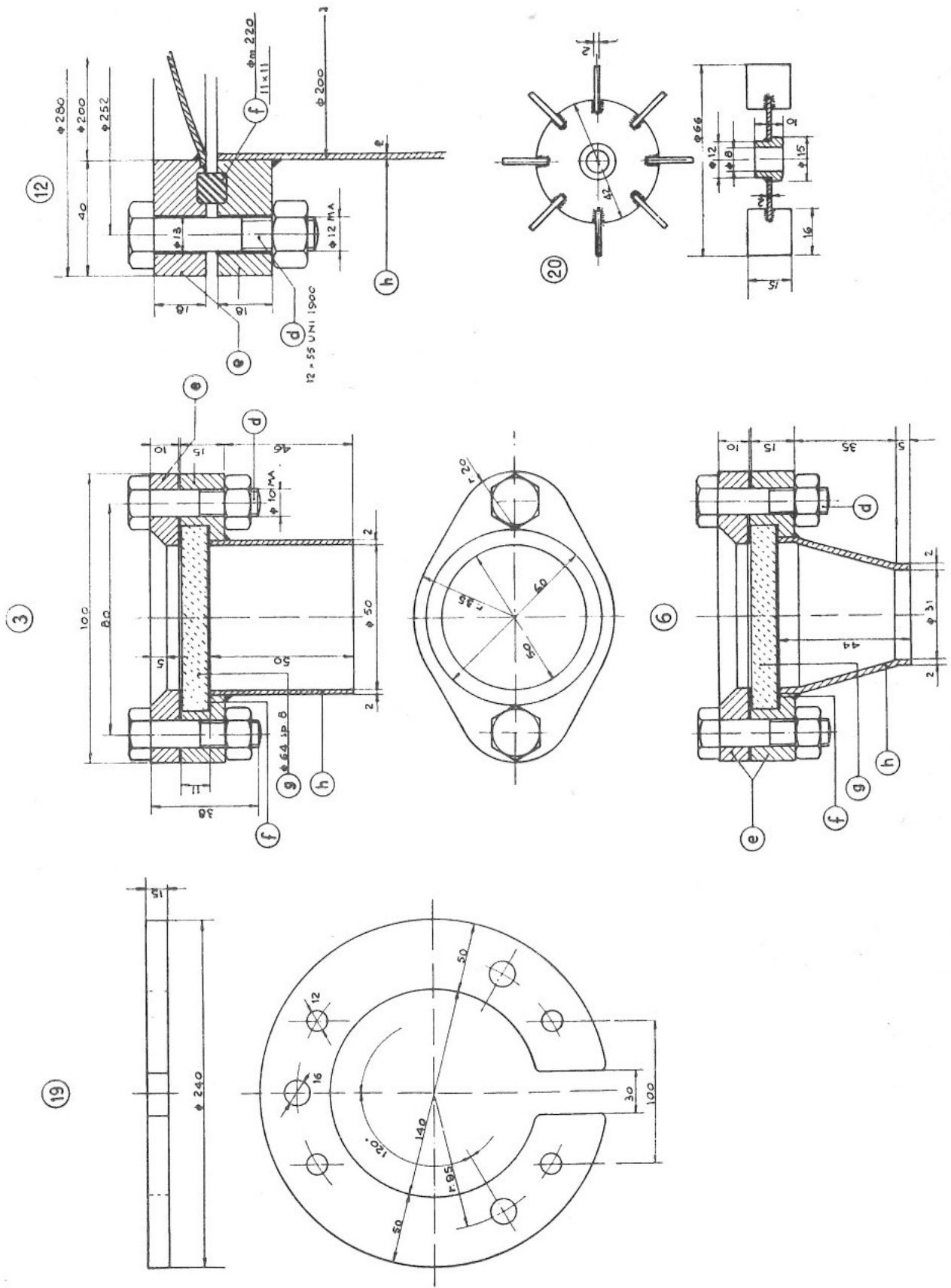


Tav. XV

*Tav. XV-a* - Dettagli costruttivi di (3) e (6) della Tav. XIV e XV e di (12), (19) e (20) della Tav. XIII.

- 3) Oblò per l'osservazione dell'interno del fermentatore:
  - d*) bullone in acciaio inox
  - e*) flangia in acciaio
  - f*) guarnizione in gomma
  - g*) coperchio di vetro pyrex
  - h*) prolungamento in acciaio inox.
- 6) Oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore (*d, e, f, g, h, vedi sopra*).
- 12) Flangie per il bloccaggio della testata al corpo del fermentatore (*d, e, f, g, h, vedi avanti*).
- 19) Piastra di base in acciaio.
- 20) Elica agitatrice.

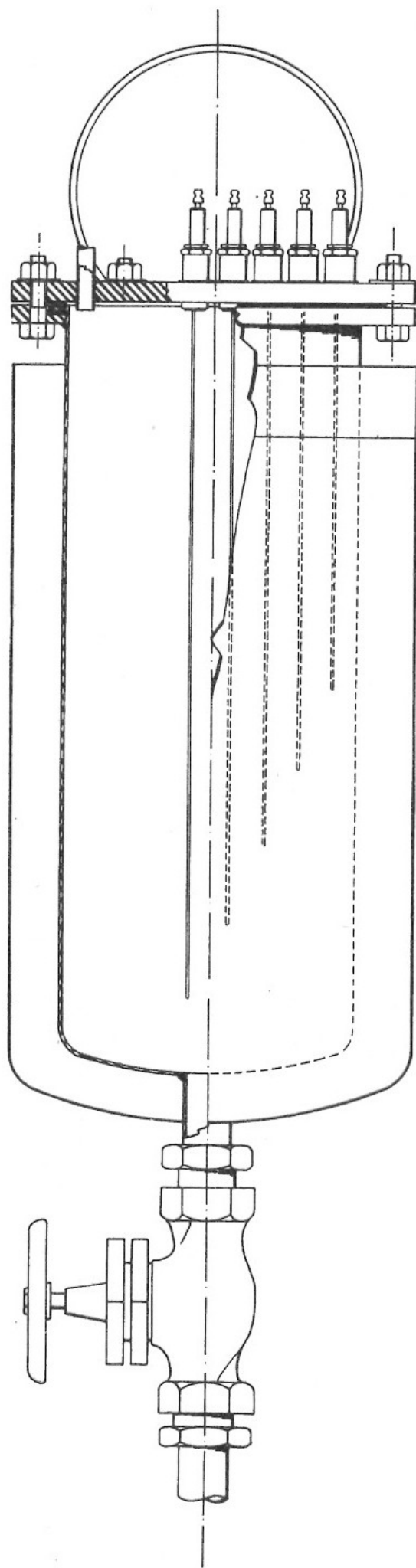
Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.



Tav. XV-a

*Tav. XVI* - Recipiente per la misura dell'inoculo; disposizione degli elettrodi.

*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



*Tav. XVI*

Tav. XVII - Diagramma schematico delle tubazioni e delle valvole di un tipo d'impianto per fermentazioni a tre stadii: S - fermentatore di « semina », S<sub>1</sub> - fermentatore « intermedio », T - fermentatore di « produzione ».

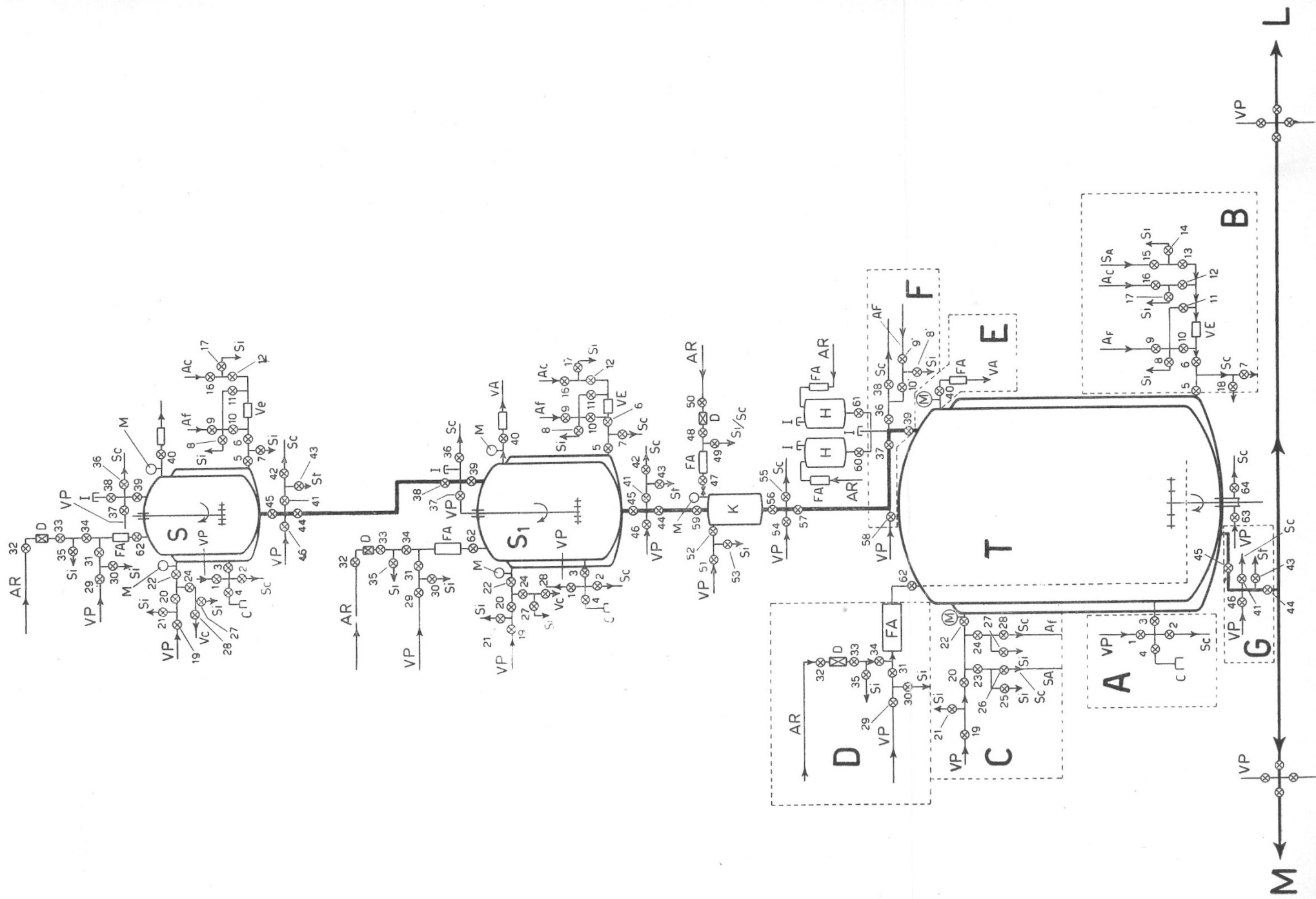
*Gruppo delle valvole e loro destinazione*

Gruppo	Destinazione	N. del diagramma
A	Presa di campioni . . . . .	da (1) a (4)
B	Ingresso in camicia di acqua calda, fredda e salamoia refrigerata . . . . .	da (5) a (18)
C	Ingresso di vapore in camicia e uscita di liquidi . . . . .	da (19) a (28)
D	Ingresso dell'aria . . . . .	da (29) a (35) e (62)
E	Uscita dell'aria . . . . .	(40)
F	Ingresso per l'introduzione di soluzioni sterili . . . . .	da (36) a (39) e (8'), (9'), (10')
G	Scarichi di fogna . . . . .	da (41) a (46)

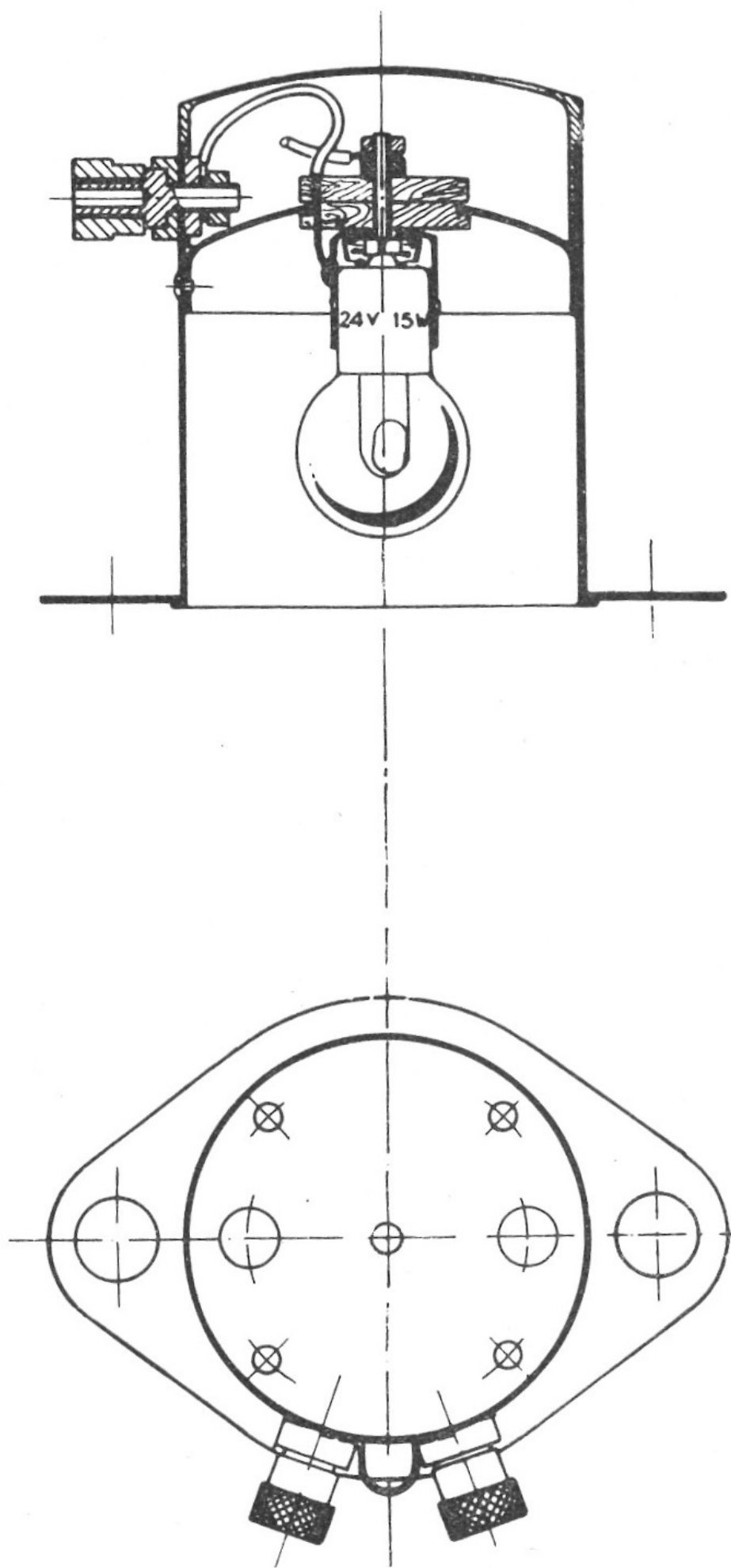
*Simboli usati*

AR = ingresso dell'aria	C = coppa di protezione della presa campioni
AC = acqua calda	O = valvola riduttrice sull'alimentazione dell'aria compressa
AF = acqua fredda	FA = filtri sterilizzatori dell'aria
SA = salamoia refrigerata	H = recipienti contenenti soluzioni sterili da introdurre nei fermentatori durante la fermentazione
Sc = scarico (vapore al collettore di recupero)	I = cappellotti
Si = valvola di sicurezza (alla canaletta di scarico)	K = dispositivo di misura per il travaso
St = canaletta di scarico (alla fogna)	M = manometri
VA = uscita dell'aria (al misuratore di portata)	VE = valvole elettromagnetiche
Vc = scarico nell'atmosfera	
VP = vapore	

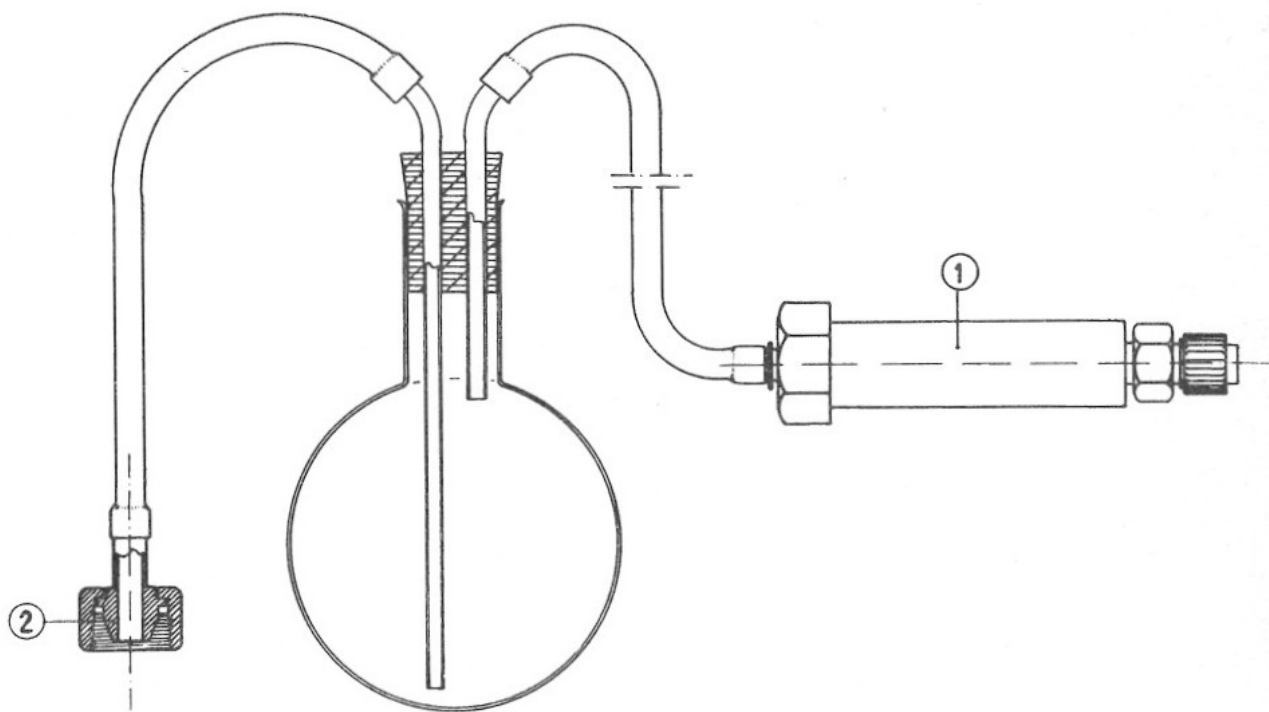
Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.



*Fermentatori da 90 e 300 litri adatti per l'aerazione con distributori d'aria o con formazione di vortice.*



*Tav. XVIII - Illuminatore per i fermentatori da l 90 e da l 300.*



*Tav. XIX - Bottiglia per il trasferimento dell'inoculo - (1) filtro d'ingresso dell'aria, (2) semibocchettone con chiavarda.*

### *Entrata e uscita dell'aria*

L'entrata e l'uscita dell'aria nei fermentatori da 300 litri sono disposte in modo molto simile a quello dei fermentatori da 90 litri. I vari particolari relativi all'entrata (1) dell'aria, al filtro (19) di entrata, all'uscita (3) dell'aria ed al suo filtro (18) sono riportati rispettivamente nelle tavole VII, VI, VIII e VIa. Per il paccaggio dei filtri è stata usata la stessa miscela di lana di vetro ed amianto, compressa in modo che ogni filtro ne contenga gr. 350. Come per i fermentatori da 90 litri all'uscita dell'aria, se è necessario, si può applicare un misuratore di aria come pure è possibile applicare gli antivortici alla parete del fermentatore (tav. XI).

### *Organi di guida e di tenuta dell'albero dell'agitatore*

I principi seguiti per la costruzione del complesso di guida e di tenuta del fermentatore da 90 litri sono stati trasportati, adeguandone semplicemente le dimensioni, nella realizzazione del complesso necessario ai fermentatori da 200 litri. I particolari costruttivi sono riportati nella tav. IX e per la loro descrizione si rimanda a quanto in merito è stato precedentemente detto; lo stesso dicasi per il fissaggio di tutto il complesso di tenuta e di guida alla testata del fermentatore (tav. VII e VIII).

I risultati ottenuti con questa apparecchiatura sono sempre stati più che soddisfacenti durante un periodo abbastanza lungo. Tuttavia continuando le esperienze in questo campo è stato messo a punto un nuovo e migliore tipo di complesso di tenuta e di guida descritto dettagliatamente in un altro lavoro [PALADINO e UGOLINI (3)]. Questo nuovo complesso è sistemato sul fondo esterno del fermentatore (vedi tav. XI) Ciò rende possibile l'uso di un albero ruotante molto più corto con evidente vantaggio specie per l'uso di eliche agitatrici ruotanti ad un alto numero di giri. Il motore può essere piazzato a terra o collocato con il sostegno del fermentatore, eliminandone praticamente le vibrazioni. Poichè alcune parti di tale complesso di guida e di tenuta sono in contatto diretto con il liquido di cultura, esse sono state isolate dall'atmosfera mediante un taglio di vapore.

Questo nuovo tipo di complesso di tenuta e di guida è stato adottato solo per i fermentatori da 300 litri, mentre si è mantenuto il vecchio tipo per i fermentatori da 90 litri. Esso ha dato degli eccellenti risultati, sia dal lato meccanico, che da quello riguardante la sterilità delle fer-

mentazioni. Sono stati effettuati molti cicli di fermentazione, alcuni dei quali della durata di un mese senza che si sia verificato alcun guasto meccanico e alcun inquinamento. Durante tali periodi è stato possibile eseguire la normale manutenzione senza mai arrestare il funzionamento del complesso.

*Oblò di osservazione e per l'introduzione del mezzo di cultura - Oblò per l'illuminazione dell'interno del fermentatore - Aggiunta di soluzioni sterili - Elettrodo rivelatore di schiuma - Termometri*

Tutti questi elementi sono ubicati sulla testata del fermentatore e, per quanto riguarda la costruzione, sono identici o molto simili ai corrispondenti elementi già descritti per i fermentatori da 90 litri. I particolari costruttivi della flangia per l'aggiunta di soluzioni sterili (2), dei termometri (4), dell'elettrodo rivelatore di schiuma (5), dell'oblò per l'introduzione del mezzo di cultura (6) e dell'oblò per l'illuminazione (7) sono riportati rispettivamente nelle tavole VI - VII - VIII - VIIIa e IX.

#### *Corpo del fermentatore*

Il corpo del fermentatore (tav. VI e VII) è costituito da un cilindro di lamiera di acciaio inossidabile dello spessore di mm. 3 avente una capacità totale di circa 300 litri; alle estremità del cilindro sono saldati un fondo semi-bombato e una flangia in acciaio al carbonio, simile a quella dei fermentatori da 90 litri, per il fissaggio della testata (12 tavola VII); per i particolari vedi (12 tav. VIIIa). Per la termoregolazione il fermentatore è munito di camicia, rivestita con materiale coibente (tav. VI e VII); essa, per l'entrata e l'uscita del fluido usato per la termoregolazione e per lo scarico di quest'ultimo presenta la medesima disposizione di quella adottata per i fermentatori da 90 litri (tav. VI - VII - VIII e IX); lo stesso dicasi per la ubicazione dello scarico di fondo del fermentatore e per la presa campione. Il fermentatore e la camicia per la termoregolazione sono collaudati entrambi per una pressione di esercizio di 3 atm

#### *Appoggi del fermentatore e fissaggio della testata al corpo cilindrico*

Il fermentatore poggia su tre sostegni costituiti da altrettanti tubi di ferro avvitati a tre bulloni saldati alla parete esterna inferiore della camicia.

La testata del fermentatore munita di flangia è fissata mediante 24 bulloni con dadi, alla corrispondente flangia forata, saldata alla estremità superiore del corpo cilindrico del fermentatore. Fra le due flangie, per la tenuta è interposta un' idonea guarnizione di gomma, appoggiata in apposita sede.

#### *Trasmissione del moto all'agitatore*

Se il complesso di guida e di tenuta è montato sulla cupola del fermentatore, per la trasmissione del moto si rimanda a quanto precedentemente è stato detto per i fermentatori da 90 litri; se invece il complesso di guida e di tenuta è montato sul fondo del fermentatore, la trasmissione del moto all'albero dell'agitatore avviene sempre con adatto accoppiamento del tipo trapezoidale; solo che in questo caso, il motore, di adeguata potenza, è portato da una mensola a bandiera regolabile, fissata al pavimento in prossimità del fermentatore.

#### ACCESSORI E TECNICA DI FERMENTAZIONE COMUNE AI FERMENTATORI DA 90 E 300 LITRI

##### 1) - *Recipienti per l'aggiunta di soluzioni durante la fermentazione*

L'aggiunta di soluzioni sterili al mezzo di cultura, durante le fermentazioni, può essere effettuata mediante l'uso di « speciali recipienti » (tav. XIII), la cui costruzione è simile a quella descritta in un precedente lavoro [CHAIN e Coll. (1)]. Cambia invece in questo caso la tecnica del travaso, in quanto per effettuarlo è necessario creare con aria sterile, nell'interno dei recipienti, una pressione maggiore di quella esistente nel fermentatore. L'aria sterile sotto pressione è fornita dall'impianto di aria compressa, previa sterilizzazione dell'aria mediante un piccolo filtro sterilizzatore di cui è munito ogni recipiente destinato a tale uso.

Le altezze di questi recipienti sono sempre le stesse mentre il loro diametro varia in rapporto al volume e precisamente:  $\phi$  75 mm. per 1 litro;  $\phi$  110 mm. per 2 litri;  $\phi$  130 mm. per 3 litri;  $\phi$  160 per 5 litri; e  $\phi$  230 mm. per 10 litri.

Per l'aggiunta di liquidi corrosivi durante la fermentazione si segue la tecnica usata per l'inoculo dei fermentatori di semina (vedi: semina pag. 26).

Quando la quantità di liquido da aggiungere è piccola (sotto i 50 cm<sup>3</sup>)

conviene seguire la stessa tecnica usata per l'aggiunta di soluzioni nei fermentatori di laboratorio (vedi lavoro citato precedentemente) e precisamente si effettua l'operazione mediante una comune siringa ipodermica, l'ago della quale viene in comunicazione coll'interno del fermentatore attraversando un diaframma di gomma dello spessore di 10 - 12 millimetri, portato da un raccordo da 1/2".

## 2) *Fermentatore di semina*

Il « fermentatore intermedio » da 50 litri, per alcuni cicli di fermentazione, è stato inoculato con una cultura ottenuta in un « fermentatore di semina » da 10 litri, in acciaio inossidabile, perfettamente simile al fermentatore da 90 litri (vedi tav. XII) tranne che per le dimensioni. La testata del fermentatore di semina ha soltanto sette fori; le sonde termometriche, per la termoregolazione sono saldate al corpo del fermentatore ed attraversano la camicia in apposita sede termicamente isolata (11 tav. XIX). La disposizione dei vari fori della testata è indicata nella tav. XIV (per i particolari vedi tav. XV a). Il complesso di guida e di tenuta e la trasmissione del moto all'agitatore sono identici a quelli del fermentatore da 10 litri, già descritto.

La diffusione dell'O<sub>2</sub> è effettuata con il sistema a vortice e non è stata prevista la possibilità dell'applicazione di un distributore d'aria, come per i fermentatori da 90 e 300 litri. Le dimensioni del corpo del fermentatore di semina e della sua camicia in acciaio al carbonio, sono riportate nelle tavv. XIII e XIX. Il trasferimento della cultura nel fermentatore intermedio da 50 litri, viene effettuata attraverso lo scarico di fondo flangiato del fermentatore di semina (9 tav. VIII e XIV).

## 3) *Recipienti per la misura dell'inoculo da travasare*

Allo scopo di poter trasferire volumi noti di inoculi dal fermentatore da 50 litri a quelli da 300 litri è stato inserito, nel circuito di alimentazione di quest'ultimo, uno speciale recipiente cilindrico (K schema tav. XVII) munito di indicatore di livello elettrico. La costruzione di questo misuratore è illustrata nella tav. XVI; esso è costituito da un corpo di fermentatore da 10 litri chiuso da una piastra di acciaio inossidabile, attraversata da 10 candele, del tipo usato per i motori a scoppio, munite di elettrodi centrali di diverse lunghezze; queste sono state calcolate in modo da sfiorare livelli progressivi d'inoculo, che entrano nel recipiente, corrispondenti a volumi diversi fra di loro di 1 litro.

L'inoculo entra nel recipiente di misura attraverso un tubo di acciaio inossidabile, saldato al fondo di esso; allorchè il livello dell'inoculo tocca

uno degli elettrodi chiude il circuito elettrico comandante l'accensione di una lampada che illumina un numero corrispondente al volume penetrato nel recipiente.

#### 4) *Illuminazione*

Per illuminare l'interno del fermentatore è stata fissata sull'oblò d'illuminazione una piccola lampada da 24 V. (tav. XIX) alimentata da un trasformatore; lo stesso sistema di illuminazione è adottato per tutti i tipi di fermentatori.

#### 5) *Termoregolazione*

La termoregolazione in tutti i fermentatori muniti di camicia è effettuata mediante circolazione in essa d'acqua calda o fredda a seconda del bisogno. Questa circolazione è regolata automaticamente da una valvola elettromagnetica, azionata da un relais elettronico, comandato da un termometro munito di contatto elettrico, tipo « Vertex », la cui parte sensibile è alloggiata nella apposita sonda che, come avanti specificato, è ripiena di olio e pesca nel terreno di cultura contenuto nel fermentatore.

#### *Servizi - Disposizioni dell'impianto*

Ad ogni fermentatore arrivano i seguenti fluidi:

- 1) vapore
- 2) aria
- 3) acqua fredda
- 4) acqua calda
- 5) salamoia refrigerata.

La disposizione dell'impianto delle tubazioni per un complesso fermentativo « standard » costituito da un fermentatore di semina da 10 litri, da un fermentatore intermedio da 50 litri, da un recipiente per la misura dell'inoculo da trasferire in fermentazione e da un fermentatore da 300 litri, è illustrato schematicamente nella tav. XII. I vari fluidi sono contraddistinti mediante i relativi colori usati internazionalmente a questo scopo.

Per assicurare la sterilità dei fermentatori, durante il corso di lavorazione sono state isolate tutte le entrate e le uscite facenti capo ad essi,

mediante « taglio di vapore » in modo da garantire la sterilità anche con eventuali perdite delle relative saracinesche di regolazione. Tale isolamento è realizzato in modo diverso a seconda dello scopo da raggiungere, come può rilevarsi paragonando fra di loro i dispositivi per il prelievamento di campione (gruppo A, tav. XVII), per lo scarico (Gruppo G, tav. XVII), per l'aggiunta di soluzioni sterili (Gruppo F, tav. XVII) e per il complesso di guida e di tenuta allorché esso è disposto sul fondo dei fermentatori. Anche l'ingresso di acqua al fermentatore, necessaria quest'ultima per la sua pulizia e per la preparazione dei terreni di cultura, è bloccato, durante la fermentazione, mediante « taglio di vapore » ed è inoltre munito di un « dispositivo di sicurezza », che sarà descritto nel paragrafo seguente, atto ad evitare che il vapore del taglio possa venire a contatto con l'acqua a causa di eventuali perdite delle relative saracinesche di comando.

Su ciascuna delle condotte di adduzione di acqua calda, di acqua fredda, di salamoia refrigerata e di vapore, facenti capo alla camicia dei fermentatori per la termoregolazione e la sterilizzazione, è installato in prossimità delle relative valvole di comando un « dispositivo di sicurezza » che ha lo scopo di impedire il mescolamento dei suaccennati fluidi.

Per sterilizzare il filtro dell'aria di alimentazione di ciascun fermentatore, l'ingresso del filtro, munito di un « dispositivo di sicurezza », è stato collegato con la tubazione del vapore in modo da poter effettuare la sterilizzazione del pacco facendo circolare il vapore nello stesso senso della circolazione dell'aria di alimentazione.

Il vapore di ritorno nei vari « tagli di vapore » è convogliato in un collettore di recupero, munito di scaricatori automatici di condensa che viene utilizzato per la produzione di acqua calda. Con tali disposizioni d'impianto, durante la lavorazione non si ha fuoriuscita di vapore nell'ambiente dei fermentatori, eccettuati i brevi periodi relativi al prelievamento dei campioni sterili.

#### *Dispositivo di sicurezza.*

Questo è essenzialmente costituito da un gruppo di tre valvole, delle quali due hanno il medesimo diametro dell'adduttrice; esse sono montate in serie con la interposizione di un T al cui braccio laterale da 1/4" è montata la terza valvola. Questa ultima deve essere sempre aperta quando sono chiuse le altre due, in modo da far defluire all'esterno le eventuali perdite delle due valvole e chiusa durante la utilizzazione del fluido portato dall'adduttrice; vedi per es. nel gruppo D le valvole (33),

(34) e (35) dell'alimentazione dell'aria e (29), (30) e (31) dell'alimentazione del vapore.

Il dispositivo di sicurezza è anche molto utile perchè dà un'indicazione immediata di eventuali guasti delle valvole dell'adduttrice, diminuisce le eventualità di scambio di fluidi dovuto a manovra sbagliata dell'operatore ed è utilizzato come scaricatore di condensa delle adduttrici di vapore, in modo da mandare subito vapore vivo nel settore voluto.

#### TECNICA PER L'USO DEI FERMENTATORI

Viene illustrato un tipo di impianto di fermentazione a tre stadi per « pilota » e la tecnica per il suo uso. L'impianto è composto da un « fermentatore di semina » della capacità di 10 litri (S-tav. XVII), da un « fermentatore intermedio » della capacità di 50 litri (S1-tav. XVII) e da un « fermentatore di produzione » della capacità di 300 litri (T-tav. XVII).

#### *Disposizioni delle valvole.*

La caratteristica principale di questo tipo di impianto è quella di aver unificato le manovre relative al funzionamento di ogni fermentatore sia esso di semina, o intermedio o di produzione in modo che il personale addetto all'impianto sia in condizioni di poter lavorare in qualunque elemento di esso, eseguendo sempre le medesime manovre.

La disposizione delle saracinesche relative al blocco della fermentazione, alla termoregolazione, alla sterilizzazione del terreno di cultura, alla presa di campione, alla immissione dell'aria nel fermentatore e alla sua fuoriuscita, alla introduzione dell'inoculo e all'aggiunta di liquidi durante la fermentazione (precursore, acidi, anti-schiuma ecc.) è sempre la stessa e le manovre relative avvengono sempre colla stessa sequenza. Con tale disposizione dei comandi, dovendosi effettuare sempre la medesima successione di manovre è più difficile commettere errori e si ottiene di conseguenza un più alto rendimento dell'impianto e una maggiore facilità e speditezza del controllo di esso.

La tav. XVII illustra chiaramente questi concetti; in essa i gruppi di servizi appartenenti ad ogni stadio sono indicati con lettere e le saracinesche appartenenti ai medesimi servizi con numeri eguali, per es. Gruppo « A » — prelevamento campione saracinesche (1), (2), (3), (4) ecc.

In totale per ogni stadio, sia esso di semina, intermedio o di produzione, si hanno sette gruppi di valvole così distribuite:

A	Presca campione . . . . .	da (1) a (4)
B	Uscita vapore ed entrata dei fluidi necessari alla termoregolazione ed al blocco della fermentazione . . . . .	da (5) a (18)
C	Entrata vapore ed uscita dei fluidi necessari alla termoregolazione ed il blocco della fermentazione . . . . .	da (19) a (28)
D	Entrata dell'aria . . . . .	da (29) a (35) e (60)
E	Uscita dell'aria . . . . .	(40)
F	Aggiunta di soluzioni sterili . . . . .	da (36) a (39) e (8') (9') - (10')
G	Scarico . . . . .	da (41) a (46)

*Preparazione dei terreni di cultura.*

I terreni di cultura, a seconda del volume del fermentatore da usare, possono essere preparati in un recipiente a parte e poi travasati nel fermentatore o preparati direttamente in esso.

Praticamente si è osservato che, nel caso di uso contemporaneo di più fermentatori di piccolo volume, (10 litri), è preferibile preparare il terreno di cultura, sufficiente per tutti i fermentatori; in tal modo si è sicuri che la percentuale dei vari componenti costituenti il terreno di cultura è uguale in tutti i fermentatori.

Nel caso di volumi maggiori, oltre i 10 litri, la preparazione del terreno di cultura può effettuarsi nel fermentatore stesso, avendo però l'accortezza di fluidificare i vari componenti in appositi recipienti e di introdurli, coll'agitatore in moto, progressivamente attraverso l'oblò, nel fermentatore, contenente acqua tiepida per metà del volume di lavorazione. E' assolutamente da evitare l'introduzione di sostanze solide, non previamente sospese o disciolte, perchè esse possono provocare colpi sulle pale dell'agitatore, con possibili deformazioni dell'asse di rotazione e conseguenze non facili a prevedersi, specie se si adoperano agitatori veloci, che ruotano ad un alto numero di giri.

Prima di iniziare la preparazione dei terreni di cultura bisogna assicurarsi che siano chiuse le saracinesche di comando per il funzionamento del fermentatore ed aperte quelle relative ai sigilli di sicurezza dei vari fluidi; nella tabella seguente sono riportate le valvole che devono rimanere aperte:

Gruppi di valvole	Numero delle valvole lasciate aperte
B	8, 14, 17, 18
C	21, 23, 27
D	30, 33
F	8'
G	43

Dopo aver introdotto i vari componenti, si ferma l'agitatore e mediante aggiunta di acqua si porta il volume del terreno di cultura a quello voluto per la fermentazione. A tale scopo è da tenere presente che, con la tecnica usata per la sterilizzazione dei terreni, la quale sarà più avanti specificata, la formazione di condensa è praticatamente quasi nulla; per cui bisogna aggiungere acqua fino a portare il terreno di cultura al volume stabilito per la fermentazione da effettuare. Mediante piccole piastre di lamiera di acciaio inossidabile, saldate elettricamente alla parete, il  $T_1$ , è suddiviso in quattro volumi parziali di 50 litri ciascuno; le frazioni dei volumi parziali sono stimabili ad occhio.

Preparato il terreno di cultura si chiude l'oblò di ispezione e si apre la saracinesca (40 gruppo E) dell'uscita dell'aria del fermentatore.

#### *Sterilizzazione dei fermentatori e del terreno di coltura.*

La contemporanea sterilizzazione dei fermentatori e dei terreni di cultura in essi contenuti, sia che si tratti di « fermentatori di semina », di « intermedio » (50 l.) o di « fermentazione » (300 l.) viene effettuata, di solito, a temperatura compresa tra 118° e 125°C., corrispondente a una pressione di vapore di  $0,9 \div 1,4$  atm. Le valvole di arrivo al fermentatore, i filtri dell'aria e tutte le tubazioni di adduzione al fermentatore vengono sterilizzati invece a 138°C. corrispondenti a 2,5 atm. Alla stessa temperatura di sterilizzazione viene sottoposto il complesso di guida e di tenuta a camera di compensazione quando esso è alloggiato sul fondo del

fermentatore. Durante il corso della fermentazione nei « tagli di vapore » è mantenuta la temperatura di circa 138°C.

La sterilizzazione del terreno di cultura nei fermentatori viene effettuata in modo da avere la formazione di una minima quantità di acqua di condensa e non alterare quindi la concentrazione dei componenti il terreno stesso. A tale scopo il terreno di cultura viene gradatamente portato alla temperatura di 100 gradi mediante circolazione di vapore nella camicia del fermentatore. Raggiunta tale temperatura si aprono gradualmente tutte le valvole d'ingresso al fermentatore, che durante la operazione di sterilizzazione sono sotto vapore, e si regola l'afflusso del vapore in modo da portare il terreno di cultura ad una temperatura oscillante fra i 118° e 125°C. Con tale sistema la quantità dell'acqua di condensa che si forma è quella relativa al salto termico 100°-125°.

Prima di portare il terreno di cultura alla temperatura di sterilizzazione si fa passare il vapore attraverso i seguenti gruppi di valvole e nell'ordine appresso indicato :

- 1) Gruppo B e C (camicia del fermentatore);
- 2) Gruppo D e F (filtro dell'aria, entrata e uscita dell'aria);
- 3) Gruppo F (aggiunta di liquidi nel solo fermentatore di produzione);
- 4) Gruppo A (complesso per il prelevamento dei campioni);
- 5) Gruppo G (scarico);
- 6) Gruppo (complesso degli organi di tenuta e di guida a camera di compensazione).

La tecnica d'uso delle valvole dei vari gruppi, nella fase di sterilizzazione è la seguente :

#### I° - Gruppi B e C.

Chiusa la valvola di sicurezza (21) dell'adduttrice di vapore si fa entrare lentamente quest'ultimo nella camicia del fermentatore, aprendo completamente le valvole (20) e (22) della adduttrice e regolandone il flusso mediante la valvola (19). Contemporaneamente si apre la valvola (5) e si scarica l'acqua di condensa formatasi nella camicia attraverso la (18); quando il vapore comincia a fuoriuscire da quest'ultima la si chiude e si

apre la saracinesca (7) per permettere al vapore degradato di passare nel collettore di condensa, comune a tutto l'impianto e successivamente ad un condensatore ad acqua. Mentre il terreno di cultura si riscalda, gli altri gruppi di valvole del fermentatore e gli accessori necessari alla fermentazione vengono sterilizzati come segue.

### II° - Gruppo D.

Si apre la valvola (29) del vapore e si scarica la condensa proveniente dall'alimentatrice attraverso la valvola di sicurezza (30); quando il vapore comincia a defluire da quest'ultima, si apre lentamente la valvola (31) e si chiude contemporaneamente la (30) in modo da inviare il vapore nel filtro sterilizzatore d'aria; quindi si regola la valvola (62), in modo da fare passare nel fermentatore, attraverso il filtro e il distributore d'aria, soltanto una piccola quantità di vapore. In tal modo in tutte le parti a monte della valvola (62) si mantiene l'intera pressione di 2,5 atm. dell'adduttrice di vapore e la corrispondente temperatura, mentre la temperatura all'interno del fermentatore può essere regolata al vapore desiderato per la sterilizzazione del terreno di cultura, che come si è detto, si aggira di solito sui 115°-118°C.

### III° - Gruppo F.

Per la sterilizzazione di questo gruppo relativo al complesso per l'aggiunta di soluzioni durante il corso della fermentazione e per il trasferimento dei liquidi dal « dispositivo di misura » al fermentatore di produzione, si aprono le valvole (54), (57), (58), (37), (36) e (10') e si scarica la condensa, raccoltasi nella tubazione per il trasferimento dei liquidi, attraverso la valvola di sicurezza (8'). Quando il vapore comincia a defluire attraverso quest'ultima, si chiude la valvola (10') e si fa passare il vapore degradato nel collettore di recupero e da questo al condensatore aprendo la (38). Ciò fatto si regola la valvola (39) in modo da far passare nel fermentatore soltanto una piccola quantità di vapore ed ottenere le stesse condizioni, di cui si è parlato al paragrafo II° per il gruppo D. Infine si allentano i tappi di chiusura dei mezzi bocchettoni per l'innesto dei recipienti per l'aggiunta di soluzioni, in modo da far fuoriuscire continuamente una piccola quantità di vapore.

IV° - Gruppo A.

Si aprono contemporaneamente la valvola (1) del vapore e la (4) e si scarica attraverso quest'ultima la condensa della condotta di alimentazione del vapore; appena questo comincia a defluire dalla valvola (4), la si chiude e aprendo la (2) si stabilisce la comunicazione con il collettore generale di recupero e quindi con il condensatore. Nello stesso tempo si regola la valvola (3) in modo da far passare nel terreno di cultura, una piccola quantità di vapore realizzando in tal modo le stesse condizioni specificate nei paragrafi II° e III°.

V° - Gruppo G.

Si apre la valvola (46) per la immissione di vapore e si scarica la condensa della relativa condotta di alimentazione attraverso la valvola (43) e la si chiude non appena comincia a fuoriuscire il vapore; nello stesso tempo si regola la valvola (41) in modo da stabilire la comunicazione col collettore generale di recupero e con il condensatore. Si regola infine la valvola (45) in modo da far passare una piccola quantità di vapore nel terreno di cultura, realizzando così le stesse condizioni esposte per la valvola (39) appartenente al gruppo F.

VI° - *Complesso degli organi di guida e di tenuta muniti di compensatore di pressione.*

Si aprono contemporaneamente la valvola (63) dell'ingresso del vapore e la (64) di collegamento con il collettore generale di recupero e col condensatore e si regola opportunamente l'apertura della valvola (64) in modo da portare il complesso di guida e di tenuta alla temperatura desiderata per la sterilizzazione.

VII° - *Terreno di cultura.*

Dopo aver controllato, per mezzo di pinze termoelettriche, che il vapore passa regolarmente attraverso tutti i sopradetti gruppi di valvole si procede alla sterilizzazione del terreno di cultura contenuto nel fermentatore nel modo seguente:

Appena la temperatura del liquido ha raggiunto un valore di circa 100°C., facilmente accertabile sia dalla lettura dei termometri che dal

vapore che fuoriesce abbondantemente dal fermentatore attraverso l'uscita dell'aria comandata dalla valvola (40), si chiude parzialmente questa ultima e si apre maggiormente la valvola (3) del dispositivo per il prelievo dei campioni, in modo da inviare una maggiore quantità di vapore nel terreno di cultura. Contemporaneamente si chiude la valvola (5) dello scarico della camicia e, parzialmente o completamente, a seconda del caso, la valvola (19) dell'entrata del vapore in quest'ultima. E' buona pratica mantenere in essa una pressione di vapore di 0,5 atm. corrispondente alla temperatura di 110°C. Effettuate tali manovre viene raggiunta la temperatura di sterilizzazione del terreno di cultura, che viene mantenuta, per il tempo stabilito, regolando la immissione del vapore mediante la valvola (3) e lo scarico di esso con la (40).

Con un po' di pratica, è possibile mantenere costante la temperatura di sterilizzazione del terreno di cultura per periodi di un'ora o più, con una variazione di circa 1°C. Il vapore di scarico, comandato dalla valvola (40) uscente dal filtro dell'« uscita dell'aria » può essere scaricato nell'ambiente o convogliato al collettore generale di recupero e quindi al condensatore.

\* \* \*

Tutti i gruppi delle valvole dei fermentatori di semina, dei fermentatori intermedi e di quelli di produzione debbono essere sterilizzati nell'ordine avanti descritto, ad eccezione del gruppo F dei fermentatori di semina e di produzione il quale, non avendo l'alimentazione dell'acqua fredda, manca delle valvole (8'), (9'), (10'). La sua sterilizzazione si effettua nel modo seguente: si aprono la valvola (37) dell'immissione di vapore e la (36) di collegamento con il collettore generale di recupero ed allorché il vapore passa liberamente attraverso quest'ultima la si chiude parzialmente e si apre opportunamente la (39) d'ingresso al fermentatore, in modo da farvi affluire una piccola quantità di vapore e mantenere contemporaneamente a monte della stessa, una pressione quasi uguale a quella della condotta di alimentazione. Ciò fatto, si allentano i tappi (1) per farvi defluire una piccola quantità di vapore.

I gruppi « G », relativi agli scarichi di fondo dei serbatoi sia di semina che intermedi, sono uguali fra di loro e sostanzialmente uguali anche al relativo gruppo « G » dei fermentatori di produzione dai quali differiscono soltanto per la disposizione delle valvole (vedi schema). Ciò comporta però che la loro sterilizzazione avviene in modo diverso da quello già descritto per lo stesso gruppo « G » del fermentatore di produzione e precisamente: si aprono contemporaneamente le valvole (46)

relative all'ingresso del vapore e le (41) di collegamento con il collettore di recupero del vapore e si scarica l'acqua di condensa attraverso la (43); appena il vapore comincia a defluire da quest'ultima, la si chiude e si regola opportunamente l'apertura della valvola (42), in modo da mantenere, a monte di essa, la pressione della condotta del vapore. Infine si apre opportunamente la valvola di fondo (45), in modo da farvi passare solo una piccola quantità di vapore.

La sterilizzazione della condotta di travaso dei liquidi dal fermentatore di semina a quello intermedio  $S_1$  si affettua aprendo la valvola (44) del primo fermentatore e la (38) del secondo.

#### STERILIZZAZIONE DELLA CONDOTTA DI TRAVASO E DEL RECIPIENTE PER LA MISURA DELL'INOCULO

Per effettuare la sterilizzazione del recipiente di misura (K tav. XVII) si apre la valvola (51) di adduzione del vapore e si scarica l'acqua di condensa attraverso la valvola (53); quando il vapore comincia a defluire da quest'ultima, la si chiude e si manda il vapore nel recipiente di misura e nel filtro dell'aria aprendo rispettivamente le valvole (52) e (47). La pressione, rilevata dal manometro M, viene regolata mediante la valvola (49), che viene aperta solo parzialmente in modo che soltanto una piccola quantità di vapore defluisca attraverso essa. Si apre quindi la valvola (56) e parzialmente la valvola (55), in modo da stabilire nel recipiente di misura e nei tratti di condotta compresi fra quest'ultime valvole e la (49) quasi la stessa pressione, esistente nella condotta principale di alimentazione del vapore. Per la sterilizzazione dei due tratti di condotta destinati al travaso dell'inoculo dal « fermentatore intermedio » al misuratore (K) e da quest'ultimo al « fermentatore di produzione » (T) si aprono rispettivamente le valvole (44) e (59) per il primo tratto e le (56), (55) e (37) per il secondo.

#### RAFFREDDAMENTO DEL TERRENO DI CULTURA DOPO LA STERILIZZAZIONE

Terminata la sterilizzazione, si porta la temperatura del terreno di cultura alla temperatura di lavorazione nel modo seguente:

a) si chiudono tutte le valvole che comandano l'afflusso del vapore nel fermentatore e precisamente: la (45) dello scarico di fondo,

la (3) del complesso per il prelievo dei campioni, la (62) e la (40) rispettivamente dell'entrata e dell'uscita dell'aria;

b) si chiudono le valvole (19) e (20) che comandano l'afflusso del vapore nella camicia del fermentatore e si apre la valvola di sicurezza (21); si chiude quindi la valvola (7) e si scarica attraverso la (18) la condensa esistente nella camicia;

c) si chiudono le valvole (29) e (31) che comandano l'afflusso del vapore nel filtro dell'aria e si apre la valvola di sicurezza (30). Si chiude quindi la (62) dell'ingresso dell'aria nel fermentatore e si apre la valvola (34) per scaricare, attraverso la (35), il vapore e la condensa presenti nel filtro sterilizzatore d'aria. Con tale operazione si ottiene pure l'essiccamento del pacco sterilizzante, contenuto nell'involucro metallico, sfruttando la sua notevole capacità termica;

d) scaricata la condensa della camicia del fermentatore, come specificato in b), si chiudono le valvole di sicurezza (18), (8) e (27); si aprono la (5) e la (10) dell'adduttrice dell'acqua fredda inviando gradualmente quest'ultima nella camicia e regolandone l'afflusso con la valvola (9); l'uscita dell'acqua di raffreddamento avviene attraverso le valvole di scarico (24) e (28);

e) appena la pressione interna del fermentatore, per effetto del raffreddamento del terreno di cultura ha raggiunto un valore di circa 0,20 atm., si immette in esso aria sterile. A tale scopo, dopo aver chiuso la valvola di sicurezza (35), si aprono le valvole (33) e (62), regolando l'afflusso dell'aria sterile e la pressione interna del fermentatore mediante la valvola di scarico (40);

f) allorché la temperatura del terreno di cultura sarà scesa sui 40°-45°C. s'inserisce la termoregolazione automatica chiudendo la valvola (10) ed aprendo la (11); in tal modo, la valvola elettromagnetica (VE), comandata dall'elemento sensibile, inserito nel fermentatore, regolato alla temperatura stabilita per la fermentazione, continuerà automaticamente il raffreddamento.

Se la temperatura per la fermentazione è di 25°C., la termoregolazione del fermentatore si effettua facendo circolare nella sua camicia acqua fredda; se invece la temperatura è superiore ai 30°C. sempre attraverso la valvola elettromagnetica (VE) si fa circolare acqua calda, aprendo le valvole (16) e (12), dopo aver chiuso la (17);

g) applicato un flussometro all'uscita dell'aria (VA) del fermentatore, si regola la portata di essa e la pressione voluta nell'interno del

fermentatore mediante la valvola riduttrice di pressione (D) e la valvola (40).

### *Prelievo dei campioni.*

L'operazione del prelievo di campioni sterili durante la fermentazione deve sempre essere preceduta dalla sterilizzazione del complesso riguardante la presa dei campioni. A tale scopo si apre completamente la valvola (4) per 10 minuti e si fa passare il vapore attraverso un foro di mm. 2 praticato al centro del tappo di protezione della coppa del complesso per la presa dei campioni. Poichè il diametro del foro, praticato sul tappo di protezione, è molto piccolo, la pressione del vapore nell'intero complesso non si discosterà in modo apprezzabile dal valore esistente nella condotta di alimentazione del vapore. Trascorsi 10 minuti, si chiudono contemporaneamente le valvole (1), (2) e (4), lasciando raffreddare il complesso per circa 15-20 minuti; indi si toglie il tappo della coppa di protezione e la si sterilizza ancora alla fiamma. Si apre quindi la valvola (4) per lo scarico della condensa e si pone la beuta, che dovrà contenere il campione, sotto la coppa in condizioni di sterilità. Ciò fatto, si preleva il quantitativo desiderato del terreno di cultura, aprendo opportunamente la valvola (3). Effettuato il prelievo, si chiude quest'ultima e sempre rispettando le condizioni di sterilità, si toglie dalla coppa la beuta, si avvita il tappo sulla coppa di protezione, si apre la valvola (1) e, per alcuni minuti si lava con vapore il dispositivo per il prelievo dei campioni. Dopo di che si chiude la valvola (4) e si ristabilisce il taglio di vapore, aprendo parzialmente la valvola (2).

### *Inoculo.*

La tecnica seguita per l'inoculo del « fermentatore di semina » o di quello « intermedio » è identica. A tale scopo, la sospensione di spore o di forme vegetative dei microrganismi, da inoculare nel « fermentatore di semina » o in quello « intermedio », viene messa in un pallone di vetro di dimensioni opportune, avvolto in un panno onde proteggere l'operazione dal pericolo di una eventuale esplosione, durante l'operazione del travaso, effettuato sotto pressione, (vedi tav. XVIII). Il pallone è chiuso con un tappo di gomma, attraversato da due fori nei quali passano due tubi metallici; uno dei quali pesca sul

fondo del pallone ed è collegato ad un semi-bocchettone in acciaio inossidabile mediante un tubo flessibile di gomma di opportuna lunghezza (2 tav. XVIII) e l'altro, che attraversa appena il tappo di gomma, è collegato a un piccolo filtro sterilizzatore di aria (1 tav. XVIII), che termina con un « attacco rapido ». Per il travaso dell'inoculo nel fermentatore si chiudono le valvole (36), (37) e (38) e si lasciano raffreddare i tratti di tubazione, da esse delimitate fino a circa 40°C. Raggiunta tale temperatura, si toglie il tappo di protezione del semi-bocchettone fissato al tubo verticale per l'inoculo del fermentatore; indi si sterilizza il semi-bocchettone alla fiamma e gli si innesta quello fissato al tubo di gomma portato dal pallone con l'inoculo, bloccando infine la relativa chiavarda. Ciò fatto si riduce la pressione all'interno del fermentatore portandola a circa 0,25 atm.; si collega con l'impianto di aria compressa il piccolo filtro sterilizzatore dell'aria, portato dal pallone per l'inoculo, e si stabilizza in esso una pressione leggermente superiore a quella dell'interno del fermentatore in modo che, aprendo la valvola (39) il contenuto del pallone possa passare nel fermentatore.

Effettuato l'inoculo, si chiudono le valvole (38) e (39) e dalla alimentatrice dell'aria compressa si disinnesta il filtro, riportando a zero la pressione interna del pallone. Dopo aver disinnestati i due semi-bocchettoni, si avvita il tappo di protezione a quello fissato al fermentatore senza tuttavia bloccarlo, in modo che un po' di vapore possa fuoriuscire attraverso esso e si ripristina infine il taglio di vapore aprendo le valvole (37) e (36). Quando l'inoculo è effettuato direttamente nel « fermentatore intermedio », la valvola (38) rimane chiusa nel corso dell'operazione di trasferimento sopradescritto.

#### TECNICA PER IL TRAVASO « STERILE » DEL TERRENO DI CULTURA DA UNO STADIO FERMENTATIVO AL SUCCESSIVO

a) Dal « fermentatore di semina » a quello « intermedio ».

Si chiudono le valvole (46), (41) e (36), (37) dei tagli di vapore dello scarico di fondo del « fermentatore di semina » (S) e dell'inoculo di quello « intermedio » (S<sub>1</sub>) in modo da togliere l'alimentazione del vapore alla condotta di travaso e si aprono contemporaneamente le valvole (44) e (38). Quando la condotta di travaso ha raggiunto una temperatura di circa 35°C. si riduce la pressione nel « fermentatore intermedio » a circa 0,25 atm. regolando rispettivamente la valvola (62) per l'entrata e la (40) per l'uscita dell'aria. Ciò fatto, nel « fermentatore di semina » si

porta la pressione a circa 1,25 ed aprendo contemporaneamente le valvole (39) e (45) si effettua il travaso del liquido di cultura da esso al « fermentatore intermedio » ( $S_1$ ). Effettuato il travaso, che può essere seguito attraverso l'oblò di osservazione del « fermentatore intermedio », si chiudono le valvole (38) e (39) di ( $S_1$ ) e si ristabilisce il taglio di vapore aprendo la valvola (37) e regolando opportunamente la (36).

b) *Dal « fermentatore intermedio » al recipiente di misura e da questo al « fermentatore di produzione ».*

Questi travasi vengono effettuati operando le seguenti manovre (vedi schema tav. XVII): si chiudono le valvole (46), (41), (54) e (55) dei tagli di vapore e degli scarichi del fermentatore ( $S_1$ ) e del recipiente di misura (K); le valvole (51), (52), (47), (58), (36) e (38) delle entrate e delle uscite di vapore del misuratore (K) e della condotta di travaso, che congiunge quest'ultimo col fermentatore di produzione (T). Contemporaneamente si aprono le valvole di sicurezza (43), (53) e (49), si scarica il vapore, ancora presente in tutto il complesso per il travaso, attraverso una valvola di sicurezza, per es. la (49) e lo si lascia raffreddare. Il raffreddamento può essere accelerato mediante una corrente di aria sterile, proveniente dal fermentatore di produzione. Per questo scopo si apre la valvola (39) e con la valvola (40) si regola il flusso di aria d'uscita del fermentatore in modo che una parte di essa venga ad attraversare le tubazioni per il travaso, il recipiente di misura (K) ed il suo filtro dell'aria (FA) ed uscire infine attraverso la valvola (49). In questo modo non solo si abbrevia il periodo necessario per il raffreddamento, ma si mantiene in tutto il complesso di travaso una pressione positiva di aria sterile, eliminando così possibilità di inquinamento.

2) Raggiunta la temperatura di 35°C. si chiudono la valvola (39) del fermentatore di produzione e le (49) e (56) dell'alimentazione di aria compressa e dello scarico di fondo del misuratore (K). Si apre quindi la valvola (50) dell'adduttrice di aria compressa a quest'ultimo e lasciando chiusa la (48), mediante la valvola di riduzione (D), si regola la pressione dell'aria a monte di essa, a 2 atm.; in tal modo si è pronti a sottoporre a tale pressione il recipiente di travaso (K) dopo aver travasato in esso il volume del liquido che deve essere trasferito nel fermentatore di produzione (T).

3) Si riduce a 0.25 atm. la pressione interna del recipiente di misura, aprendo la valvola di sicurezza (49), e si porta a circa 2 atm. la

pressione nel fermentatore intermedio ( $S_1$ ) regolando la valvola di uscita (40) e il complesso di alimentazione d'aria.

4) Si apre quindi la valvola di scarico (45) del fermentatore intermedio e regolando la (39), si fa passare il liquido di cultura nel recipiente di misura fino a raggiungere il volume desiderato, che sarà indicato otticamente dall'indicatore elettrico di livello.

5) Travasata nel misuratore (K) la quantità di liquido voluta si chiudono la valvola di scarico (45) dell'( $S_1$ ) e la valvola (59) di entrata nel misuratore; si aprono quindi le valvole (48) e (47) dell'entrata dell'aria nel misuratore, stabilizzando nel suo interno una pressione di 2 atm.; contemporaneamente nel fermentatore di produzione (T), mediante la opportuna regolazione delle valvole di entrata e uscita dell'aria (62) e (40), viene ridotta la pressione a 0,25 atm. Stabilizzate le pressioni sopradette, si fa passare il contenuto del recipiente di misura nel fermentatore (T) aprendo consecutivamente la valvola (56) di uscita del misuratore (K) e la (39) d'ingresso al fermentatore (T).

L'operazione del travaso si segue mediante l'indicatore elettrico di livello e attraverso l'oblò di ispezione del fermentatore (T). Effettuata tale operazione si chiudono le valvole (47) e (48) di entrata dell'aria e si apre la valvola di sicurezza (49), scaricando la pressione del misuratore fino ad un valore di 0,25 atm.

6) Se il volume da inviare nel « fermentatore di produzione » è maggiore di l. 10 si ripetono le operazioni descritte nei paragrafi da 1 a 4.

7) Effettuato l'ultimo travaso, si stabiliscono i tagli di vapore esistenti antecedentemente all'operazione di travaso.

#### AGGIUNTA DI SOLUZIONI STERILI DURANTE IL CORSO DELLA FERMENTAZIONE

L'aggiunta di soluzioni nel fermentatore di produzione in condizioni sterili, durante il corso della fermentazione, viene effettuata per mezzo di speciali recipienti (vedi sopra), sterilizzati unitamente al loro contenuto, in apposito autoclave. Le operazioni per il montaggio di detti recipienti sui fermentatori (18 tav. I, 13 tav. VII) e dell'aggiunta delle soluzioni vengono eseguite in modo simile a quelle descritte per l'inoculo del fermentatore di semina e precisamente come segue: si allentano i tappi che proteggono i semi-bocchettoni, montati sulle entrate delle valvole (60) o (61) del fermentatore (T) in modo da far defluire un po' di

vapore attraverso le filettature; dopo circa 10 minuti, si chiudono le valvole (37) e (36), si tolgono i tappi di protezione dei semi-bocchettoni e si innestano ad essi, sotto fiamma, i semi-bocchettoni portati dai recipienti stringendo in ultimo la chiavarda di bloccaggio. Si apre quindi la valvola (39) e per mezzo di attacco rapido si collega il filtro sterilizzatore dell'aria del recipiente con la tubazione di gomma per l'alimentazione dell'aria compressa, stabilizzata mediante valvola riduttrice ad una pressione di 2 atm. destinata ai servizi; s'invia infine nei recipienti aria sterile fino a livellare la pressione della rete di alimentazione. Nello stesso tempo la pressione nell'interno del fermentatore di produzione viene ridotta a 0,25 atm. e aprendo opportunamente, per es. la valvola (60), si regola l'immissione del liquido nel fermentatore. Il volume del liquido aggiunto viene controllato con la lettura dell'apposito livello, esterno al recipiente e graduato precedentemente in rapporto alle necessità della fermentazione. Dopo di che si chiudono le valvole (60) e (39), si ripristina il taglio di vapore e si disinnesta dal filtro la tubazione di gomma per l'alimentazione dell'aria compressa.

#### TERMINE DELLA FERMENTAZIONE

##### a) *Chiusura dei « tagli di vapore ».*

Terminata la fermentazione, si eliminano i tagli di vapore chiudendo le seguenti valvole: (58), (38) e (36) dell'immissione di soluzioni sterili durante la fermentazione; (1) e (2) del complesso per la presa dei campioni; (63) e (64) del complesso di tenuta e (46), (44) e (41) dello scarico di fondo del fermentatore di produzione (T); si apre infine il sigillo di sicurezza (43) di quest'ultimo.

##### b) *Raffreddamento del terreno di cultura nel fermentatore.*

Se la cultura non viene adoperata immediatamente per le successive lavorazioni, essa può essere conservata nel fermentatore previo il « blocco » delle attività enzimatiche dei microrganismi, che si ottiene portando la temperatura della cultura a  $2 \div 4^{\circ}\text{C}$ . mediante circolazione di salamoia refrigerata nella camicia del fermentatore. A questo scopo si regola alla temperatura desiderata per il « blocco », il termometro che comanda la termoregolazione; si chiudono le valvole (9), (11) e (6) dell'entrata dell'acqua per la termoregolazione e la valvola (28) dell'uscita di essa e si aprono le rispettive valvole di sicurezza (8) e (27); attraverso

quest'ultima l'aria esterna è messa in comunicazione con la camicia del fermentatore, per cui è possibile scaricare l'acqua in essa contenuta, attraverso la valvola (18). Ciò fatto, si chiudono la valvola (18) e la valvola (24) del ritorno dell'acqua di raffreddamento e si aprono le valvole (23) e (26) del circuito di recupero della salamoia, dopo aver chiusa quella di sicurezza (25). Chiuso il sigillo di sicurezza (14), dell'alimentazione della salamoia refrigerata, si aprono le valvole (15) e (13) dell'adduttrice di essa inviandola nella camicia del fermentatore, attraverso la valvola elettromagnetica (VE) che, come si è detto innanzi è inserita nel circuito elettrico della termoregolazione. In ultimo, mediante la regolazione delle valvole (62) e (40), si riduce la pressione interna del fermentatore a 0,20 atm. Dopo aver adoperata la cultura, per togliere dalla camicia del fermentatore la circolazione della salamoia refrigerata si opera nel modo seguente: si chiudono le valvole (13) e (15) dell'alimentazione, si apre quella di sicurezza (14) e si chiude la valvola (26) del circuito di ritorno; mediante tubo flessibile si collega la valvola (18) con l'aspirazione di una pompa portatile, la cui mandata è collegata con il serbatoio della salamoia egualmente con tubo flessibile; aperte infine le valvole (18) e (25), si mette in moto la pompa e si aspira la salamoia esistente nella camicia, mandandola nel serbatoio generale. Effettuata questa operazione, si ferma la pompa, si chiude la valvola di scarico (18) e si disinnesta da essa l'aspirazione della pompa portatile.

Ciò fatto, si procede al lavaggio della camicia con acqua corrente, utilizzando il circuito formato dalle valvole (9), (11), (VE), (6), (5), (22), (23) e (25) previa chiusura della valvola di sicurezza (8) e mantenendo aperta la valvola elettromagnetica (VE). Terminato il lavaggio, si chiudono le valvole di alimentazione dell'acqua e si scarica dalla camicia attraverso la valvola (18) dopo aver aperta quella di sicurezza (25).

#### *c) Scarico della cultura.*

Lo scarico della cultura viene effettuato sotto pressione attraverso le valvole (45) e (43); prima di iniziare questa operazione è consigliabile disinnestare la termoregolazione automatica del fermentatore.

#### *d) Pulizia dei fermentatori.*

Per la pulizia, alla fine della fermentazione, si effettuano le seguenti operazioni nell'ordine descritto:

1) Si chiudono tutte le valvole direttamente collegate con il fermentatore e precisamente: (62), (39), (45) e (40).

2) Si toglie dall'oblò di osservazione il vetro relativo e si introduce nel fermentatore una soluzione calda di carbonato di sodio al 10%.

3) Si puliscono mediante opportuna spazzola tutte le parti interne del fermentatore, avendo cura di mettere periodicamente in moto l'agitatore.

4) Terminata la pulizia delle pareti e della cupola interne, si scarica attraverso la valvola (45) e le valvole (3) e (4) della « presa campioni » il liquido di lavaggio.

5) Si lava quindi il fermentatore con acqua corrente, per mezzo di un idrante introdotto prima nell'oblò ed innestato poi, tramite la valvola (4), alla presa campione.

e) *Controllo e manutenzione dopo ogni fermentazione.*

1) Si controllano le guarnizioni di gomma e si sostituiscono quelle difettose.

2) Si controlla la tenuta di tutte le valvole e si sostituiscono le guarnizioni di quelle che hanno dato fastidi durante la fermentazione.

3) Si controllano le portate d'aria delle valvole di riduzione, e se si nota qualche variazione, si procede alla loro revisione.

4) Si ispezionano le valvole di sicurezza e se ne controlla il loro funzionamento, pulendole se necessario.

5) Si controlla il funzionamento delle valvole elettromagnetiche per la termoregolazione (VE) ed in particolare, la portata di afflusso, che qualora risultasse variata, rende necessario lo smontaggio della valvola e la pulizia dello spillo conico di comando e della sua sede.

6) Si controlla l'usura delle cinghie di trasmissione, regolando se necessario la loro tensione.

7) Si controlla la quantità dell'olio contenuto nelle sonde dei termometri.

8) Si lubrificano le parti seguenti:

a) i gambi filettati delle valvole, il gambo filettato della membrana di riduzione di pressione e le molle delle valvole di sicurezza con olio fluido;

b) il complesso di tenuta e di guida con grasso, ad alto punto di gocciolamento, mediante opportuno ingrassatore.

### MANUTENZIONE PERIODICA

*E' consigliabile eseguire ogni 90 giorni di lavorazione le seguenti operazioni:*

- 1) Cambiare le guarnizioni di gomma.
- 2) Smontare tutte le valvole, pulirle e, se necessario, sostituire le guarnizioni.
- 3) Cambiare le guarnizioni degli attacchi rapidi.
- 4) Smontare le valvole di riduzione di pressione, ispezionare le membrane e controllare l'elasticità delle molle di regolazione.
- 5) Smontare le valvole di sicurezza e pulire le sedi; controllare l'elasticità delle molle e tarare nuovamente alla pressione di sicurezza.
- 6) Smontare le valvole elettromagnetiche, controllare l'isolamento del solenoide, pulire lo spillo conico di chiusura e la relativa sede; controllare il funzionamento dei relais.
- 7) Smontare e ispezionare il complesso di guida e di tenuta; *questa operazione deve essere eseguita in officina da meccanici specializzati.*
- 8) Sostituire il grasso di lubrificazione dei cuscinetti a sfere dei motori elettrici.

### CAUSE D'INQUINAMENTO E SISTEMI PER RILEVARLE

a) *Tecnica per il collaudo di un fermentatore agli effetti della sterilità.*

Oltre il normale collaudo meccanico, un fermentatore « nuovo » deve subire un severo collaudo agli effetti della « sterilità ». A tale scopo, esso deve essere sottoposto a ripetute prove per il controllo di tenuta delle varie saldature con particolare riguardo a quelle interne e a quelle in comune con il sistema per la termoregolazione. Tali prove debbono essere effettuate anche variando la temperatura fra il fermentatore e il sistema per la termoregolazione fino a differenze di  $130 \div 140^{\circ}\text{C}$ . e mantenendo sempre in ambedue la pressione di collaudo.

Con tali controlli le perdite grossolane che eventualmente possono verificarsi, vengono ad essere individuate abbastanza facilmente ed in casi

eccezionali saranno rilevate da un « inquinamento rapido » del terreno di cultura durante la fermentazione di prova. Piccole perdite invece fra il corpo del fermentatore e la camicia si manifestano con « inquinamenti lenti » del terreno di cultura, che si trasforma in una cultura mista di batteri sporigeni e non sporigeni. Tali perdite, dovute a fori di piccolo diametro, dell'ordine di 1/10 di mm. possono essere individuate introducendo, sotto pressione, nella camicia del fermentatore una soluzione di fluorescina ed osservando il suo passaggio nell'interno del fermentatore con l'aiuto di una lampada a raggi ultravioletti; un altro sistema d'individuazione è quello di introdurre nella camicia del fermentatore, sempre sotto pressione, una cultura di batteri « indicatori » facilmente riconoscibili, per es. « *Serratia Marcescens* » o « *Chromobacterium Prodigiosus* ».

Effettuate con esito favorevole queste prove di collaudo, in un fermentatore del tipo descritto, completo dei suoi accessori, è raro che si verificano inquinamenti del terreno di cultura; se ciò avviene essi sono di solito quasi sempre dovuti o ad una non razionale installazione del fermentatore nell'impianto di fermentazione o ad una non razionale tecnica di fermentazione.

E' bene ripetere nei fermentatori periodicamente ogni quattro mesi di lavoro sterile continuativo, le prove di collaudo agli effetti della sterilità.

Dopo una serie di inquinamenti con batteri sporigeni o dopo un lungo periodo di inattività dell'impianto, è buona norma procedere ad una sterilizzazione di tutto l'impianto con vapore a 2,5 atm. tenendo i fermentatori vuoti.

#### b) *Sterilizzazione insufficiente del terreno di cultura.*

Una delle più comuni cause d'inquinamento è la sterilizzazione insufficiente del terreno di cultura o delle soluzioni da aggiungere ad esso durante il corso della fermentazione. Ciò avviene in particolare quando i liquidi, sopra menzionati contengono in sospensione particelle di sostanze insolubili, quali per es. carbonato di calcio. Da ciò risulta che la tecnica della sterilizzazione varia in conformità dei casi e secondo l'esperienza degli Autori, i terreni naturali di cultura contenenti carbonato di calcio si possono sterilizzare con risultati soddisfacenti tenendoli a 100°C. per 20 minuti, purchè siano continuamente agitati ed il loro pH sia compreso fra 5 e 6. Con pH 7 o superiore a 7 sono necessari periodi di sterilizzazione notevolmente maggiori.

c) *Sterilizzazione insufficiente delle soluzioni antischiumogene.*

Occasionalmente qualche inquinamento è stato causato da una insufficiente sterilizzazione delle soluzioni oleose antischiumogene. Per la sterilizzazione di queste soluzioni, contenute negli appositi recipienti, gli Autori hanno constatato che è sufficiente che questi ultimi rimangano in autoclave per 90 minuti a circa 125°C. perchè la piccola quantità di acqua di condensa che viene a formarsi nei recipienti durante la sterilizzazione, si mescoli con le soluzioni antischiumogene, permettendo la distruzione dei microrganismi e delle spore nelle condizioni di sterilizzazione sopra dette. Di conseguenza è stata abbandonata la tecnica della sterilizzazione a secco per 3 ore a 150°C. proposta dai vari Autori.

Per la sterilizzazione delle soluzioni oleose antischiumogene necessarie all'impianto pilota semi-industriale e a quello industriale, gli Autori hanno iniettato vapore vivo nelle soluzioni, contenute in appositi recipienti, termicamente isolati, fino a stabilizzare in questi una pressione di 2 atm. per la durata di circa 90 minuti. I risultati ottenuti con tale tecnica sono stati sempre più che soddisfacenti.

d) *Eccessiva formazione di schiuma.*

Molta cura deve essere posta per evitare che nel fermentatore si formi una eccessiva quantità di schiuma, inquantochè se essa raggiunge la testata del fermentatore e fuoriesce dagli organi di tenuta dell'agitatore e dal filtro d'uscita dell'aria si può essere sicuri che ciò ha provocato l'inquinamento del terreno di cultura. Il pericolo più serio, rappresentato dalla fuoriuscita della schiuma dagli organi di tenuta e di guida, è eliminato adoperando il complesso precedentemente descritto, che lavora anche sotto battente liquido.

L'eccessiva formazione di schiuma, oltre che a prodursi per effetto dell'aumentata schiumosità del terreno di cultura durante la fermentazione, può anche prodursi per una repentina diminuzione della pressione interna del fermentatore; per cui, quando per necessità di lavorazione si deve diminuire la pressione di lavorazione del fermentatore, questa operazione deve essere fatta per gradi e con molta cautela.

e) *Pressione del vapore.*

Particolare attenzione deve essere posta al valore della pressione del vapore che alimenta l'impianto, inquantochè una diminuzione di essa porta ad una conseguente diminuzione della temperatura dei « sigilli di vapore » e di conseguenza una diminuzione della loro efficienza. Ciò

può causare l'inquinamento del terreno di coltura, specialmente attraverso il dispositivo della presa di campione, che viene a trovarsi ad una temperatura inferiore a quella necessaria per la sua sterilizzazione. Ciò si è verificato nel nostro impianto pilota a causa di alcune riparazioni fatte alle caldaie di produzione del vapore, quando la pressione di alimentazione del vapore era scesa da 2,5 a circa 1,2 atm. Contemporaneamente a questo abbassamento si ebbero a registrare numerosi inquinamenti, che furono eliminati solo quando la pressione del vapore nell'impianto fu riportata al valore usuale di lavorazione e cioè a 2,5 atm.

f) *Valvolame.*

Anche le valvole possono essere causa d'inquinamento allorchè cominciano a presentare difetti meccanici di tenuta, che non sono spesso facilmente rilevabili. Le valvole, munite di sedi per la tenuta, sono le più delicate inquantochè esse si alterano facilmente a causa della presenza di sostanze cristalline spesso molto dure nei fluidi che le attraversano; lo stesso dicasi per le valvole del tipo a membrana che risultano inoltre non affatto resistenti ai continui sbalzi di temperatura. L'impiego di questi tipi ha bisogno di conseguenza di un continuo controllo e di una manutenzione scrupolosa, mentre quelle a pistone, all'atto pratico si sono dimostrate resistenti all'usura e hanno richiesto una scarsa manutenzione.

g) *Controllo della sterilità.*

Per effettuare il controllo della sterilità del terreno di coltura, si prendono dei campioni ad intervalli regolari a cominciare dal momento in cui esso ha raggiunto la temperatura di lavorazione dopo la sua sterilizzazione. I campioni da esaminare si passano su agar e in brodo nutritivo e si incubano in termostati regolati a 24 e 37°C. Gli inquinamenti più frequenti sono dovuti a batteri sporigeni gram-positivi o gram-negativi; sono di solito assenti i batteri non sporigeni e qualora fosse accertata la loro presenza essa indicherebbe, quasi sicuramente, una comunicazione creatasi fra il sistema di termoregolazione ed il fermentatore.

L'inquinamento dei campioni, presi immediatamente dopo la sterilizzazione del terreno di coltura, o dopo l'aggiunta di soluzioni acquose o antischiuogene, è da attribuirsi a cattiva sterilizzazione rispettivamente del terreno o delle soluzioni aggiunte.

h) *Aria sterile di alimentazione.*

I filtri sterilizzatori dell'aria di alimentazione dei fermentatori, avanti descritti, non hanno mai dato luogo ad inquinamenti; per il loro perfetto funzionamento bisogna solo fare attenzione a non bagnarli con la schiuma o con ritorni del terreno di cultura. Se si ha il sospetto che l'inquinamento possa essere stato causato dal filtro sterilizzatore, si controlla la sua efficienza spruzzando con un inalatore Collison una sospensione di batteri indicatori nell'impianto di distribuzione dell'aria (4).

CONCLUSIONI

I descritti fermentatori da impianto pilota, della capacità di 300 e 90 litri, adatti a fermentazioni in cultura sommersa con microrganismi non patogeni, sono stati progettati particolarmente per il sistema di aerazione con distributore d'aria a vortice (5, 6), ma volendo, essi si possono trasformare rapidamente nel comune sistema di aerazione con distributore d'aria e antivortice.

Nella letteratura si trovano numerose descrizioni di fermentatori con capacità simile o maggiore (fino a 1000 litri) adatti a fermentazioni con microrganismi non patogeni fatte da: (STAFANIAK, GAILEY and JOHNSON (7); GORDON, GREENFELL, KNOWLES, LEGGE, MACALLISTER e WITE (8); GARIBALDI e FEENEY (9); FORTUNE, MCCORMICK, RHODEHAMEL e STAFANIAK (10); BLOOM, PLEIFER, MOYER, TRAUFLER, CONWAY, CROCKER, FARISON e HANNIBAL (11); PFEIFER, VOJNOVICH e HEGER (12). Nel presente lavoro non sono stati presi in considerazione i problemi particolari, presentati dalla produzione di microrganismi patogeni; per la costruzione di un fermentatore da 200 litri, adatto per tale produzione, si rimanda a quan-

---

(4) BOURDILLON R. B., LIDWELL O. M. e LOVELOCK J. E. - Spec. Rep. Ser. Counc. London N. 262 Section 13 p. 58, (1948).

(5) CHAIN E. B., PALADINO C., CALLOW D. S., UGOLINJ F. e VAN DER SLUIS J. - Bull. World. Hith. Org. 6: 73, (1952).

(6) CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, (1954).

(7) STAFANIAK J. J., GAILEY F. B., BROWN C. S. e JOHNSON M. J. - Ind. Eng. Chem. 38: 666, (1946).

(8) GORDON J. J., GREENFELL E., KNOWLES E., LEGGE B. J., MAC ALLISTER R. G. e WHITE T. - J. gen. Microbiol., 1: 187, (1947).

(9) GARIBALDI J. A. e FEENEY R. E. - Ind. Eng. Chem. 41: 432, (1949).

(10) FORTUNE W. B., MCCORMICK S. L., RHODEHAMEL H. W. e STAFANIAK J. J. - Ind. Eng. Chem., 42: 191, (1950).

(11) BLOM R. H., PFEIFER V. F., MOYER A. J., TRAUFLER D. H., CONWAY H. F., CROCKER C. K., FARISON R. I. e HANNIBAL D. V. - Ind. Eng. Chem., 44: 435, (1952).

(12) PFEIFER V. F., VOJNOVICH C. e HEGER E. N. - Ind. Eng. Chem. 44: 2975, (1952).

to è stato detto da MALMGREN, HEDEN, SUNDSTROM e TORQUIST (13). Il sistema di aerazione, comunemente usato dagli Autori per la diffusione dell'ossigeno dell'aria è quello di introdurla nel fondo del fermentatore, attraverso un distributore e di disperderla, per mezzo di eliche ruotanti in presenza o meno di antivortici. Un altro metodo di aerazione adoperato è quello del sistema « Waldhof », impiegato industrialmente per la produzione di lieviti; il SEAMAN (14) ha descritto una modifica di questo sistema per fermentatori da impianto pilota, consistente nell'uso di un distributore di aria sistemato al piano dell'elica; in queste condizioni, anche parte dell'aria sovrastante al terreno di cultura, viene in parte aspirata, dal liquido che si rovescia nel tubo centrale di aspirazione (« draft tube »). Questa modifica è, tra quelle descritte nella letteratura, quella che si avvicina maggiormente al sistema di aerazione con « distributore a vortice », messo a punto dagli Autori.

Per quanto riguarda la semplicità di costruzione, i fermentatori descritti nel presente lavoro, adatti a qualunque sistema di aerazione, compreso quello con vortice, reggono bene il confronto con tutti gli altri tipi di fermentatori riportati nella letteratura. Con il sistema di « aerazione a vortice » si possono facilmente raggiungere aerazioni fino a 300 cm<sup>3</sup> di ossigeno per 100 cm<sup>3</sup> di soluzione per ora, sia nei fermentatori da 90 litri che in quelli da 300 litri. Gli Autori ritengono, che per le fermentazioni in cui le esigenze di ossigeno non superano il valore sopraddetto questo sistema rappresenta, allo stato della loro esperienza, il metodo di aerazione più semplice e più conveniente fino a una scala di 200 litri e, in alcuni casi fino a 2000 litri. Per l'uso del sistema di aerazione con vortice, nei piccoli fermentatori da 10 l., per la produzione di penicillina, vedi CHAIN, CALLOW e SEKULIC (15).

I fermentatori sopra descritti sono stati adoperati continuamente per più di due anni nell'impianto pilota e non si è mai avuto il minimo inconveniente meccanico. In particolare ha funzionato ottimamente il complesso degli organi di guida e di tenuta, sia del tipo normale che di quello a compensazione, nonostante il pesante lavoro compiuto ininterrottamente da essi, per effetto del numero di giri imposto agli agitatori (800 e 1400 giri al minuto), per periodi di molte settimane e talvolta di mesi.

Il montaggio dei recipienti ai fermentatori per l'aggiunta di soluzioni durante la fermentazione, richiede operazioni semplici nelle quali

---

(13) MALMGREN B., HEDEN C. G., SUNDSTRÖM K. E. e TÖRNQUIST B. - Acta Pathol. Microbiol. Scand., 30: 284, (1952).

(14) SAEMAN J. F. - Anal. Chem., 19: 913, (1947).

(15) CHAIN E. B., CALLOW D. S. e SEKULIC A. - Rend. Ist. Sup. Sanità, in corso di stampa.

è stato praticamente eliminato il pericolo di inquinamento. Lo stesso dicasi per l'introduzione dell'inoculo nel fermentatore di semina e per il travaso del liquido di cultura dal « fermentatore di semina » al « fermentatore di produzione ». Allo stato attuale dell'impianto è molto raro che si verificano inquinamenti e qualora essi avvengano, sono dovuti sempre solamente a difetto di tecnica d'uso, per es. sterilizzazione incompleta del liquido di cultura, presa di campione non sterile, ecc.

Il sistema adottato nell'impianto per le tubazioni e per le valvole è stato progettato apportando alcune innovazioni agli schemi comunemente usati, descritti da V. STEFANIK, GAILEY, BROWN e JOHNSON (7), che per primi si occuparono di fermentazioni sommerse ottenute in fermentatori da impianto pilota della capacità di 350; per taluni dettagli sulla tecnica asettica applicati a fermentazioni sommerse, vedi anche PARKER (16). Dalla esperienza degli AA. è risultato che una delle condizioni basilari per evitare gli inquinamenti e per assicurare il regolare decorso delle fermentazioni è quella di montare, per il comando dei servizi del fermentatore, valvolame che necessiti di una minima manutenzione.

Il problema delle valvole è stato oggetto di particolare attenzione da parte degli Autori, i quali, dopo numerosi esperimenti, sono della convinzione che il tipo più soddisfacente e decisamente superiore a tutti gli altri sperimentati, è il tipo di valvola a pistone.

La tecnica d'uso delle valvole di comando dei fermentatori e degli accessori è stata descritta in tutti i particolari, per ogni fase del processo di fermentazione e questo è stato fatto particolarmente a beneficio di coloro che non hanno una precedente esperienza in questo campo; nella letteratura, infatti non sembra che sia stato finora riferito in dettaglio sulla tecnica della fermentazione sommersa con fermentatori da impianto pilota.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.

---

(16) PARKER A. - Spec. Rep. Roy. Ist. Chem. London p. 138, (1950).