

106. E. B. CHAIN, S. PALADINO, F. UGOLINI, e D. S. CALLOW. — “Impianto pilota” per fermentazioni in coltura sommersa.

Riassunto. -- Si descrive un impianto pilota per lo studio di fermentazioni con micro-organismi non patogeni in coltura sommersa. L'impianto comprende una sezione di fermentazione con fermentatori della capacità di 10, 90 e 300 litri, una camera di preparazione per l'isolamento dei microorganismi e l'estrazione e concentrazione dei loro prodotti metabolici, e vari servizi accessori. Si danno particolari sulla disposizione dell'impianto, sull'apparecchiatura e sulla tecnica da seguire per il trasferimento sterile del contenuto di un fermentatore in qualsiasi altro fermentatore dell'impianto. Si menzionano alcuni importanti problemi organizzativi, dalla cui soluzione appropriata dipende il regolare funzionamento dell'impianto pilota.

Résumé. — Les A. décrivent une station pilote de fermentations en culture submergée pour des microorganismes non pathogènes. La station comprend une section de fermentation comportant des fermentateurs de 10, 90 et 300 litres de capacité, une chambre de préparation affectée à l'isolation des microorganismes, à l'extraction et à la concentration des produits de leur métabolisme, enfin les divers services accessoires. La disposition de l'installation, son équipement, les manipulations de transvasement en conditions stériles sont clairement détaillées. Il y est fait mention des problèmes d'organisation dont dépend le bon fonctionnement de la station.

Summary. — A pilot plant for the study of fermentations with non-pathogenic micro-organisms in submerged culture is described. The plant comprises a fermentation section with fermenters of 10, 90 and 300 l capacity, a preparation room for the isolation of the micro-organisms and the extraction and concentration of their metabolic products; and various accessory services. Details of the plant lay-out, equipment and sterile transfer manipulations from one fermenter to another are given. Some important organisational problems are mentioned, on the appropriate solution of which depends the smooth functioning of the pilot plant.

Zusammenfassung. — Eine Versuchsanlage für das Studium von Gärungen in Tiefenkultur mit nicht-pathogenen Mikroorganismen wird beschrieben. Die Versuchsanlage besteht aus einem Gärungssaal, in dem

Fermenter von 10, 90 und 300 l Inhalt untergebracht sind, einem Saal für die Gewinnung von Mikroorganismen und die Aufarbeitung von Gärflüssigkeiten für die Darstellung der gewünschten Stoffwechselprodukt, sowie verschiedener Hilfsanlagen. Einzelheiten der Konstruktion der Anlage und der in ihr vorhandenen Apparate und Maschinen werden beschrieben, und die Arbeitsmethoden für die sterile Ueberführung von Kulturflüssigkeit von einem Fermenter zum anderen werden geschildert.

Einige wichtige Organisationsprobleme werden erörtert, von deren geeigneten Lösung der erfolgreiche und reibungslose Ablauf der Arbeiten der Versuchsanlage abhängt.

Gli AA. descrivono un « impianto pilota » per microbiologia chimica, composto da fermentatori della capacità di 10, 90 e 300 litri, per lo studio delle fermentazioni sommerse con microrganismi non patogeni e della produzione in massa di questi ultimi; l'impianto è completato con le apparecchiature necessarie per la concentrazione e per la estrazione dei prodotti del metabolismo microbico.

Esistono nella letteratura varie descrizioni di apparecchiature per « impianto pilota » e le più dettagliate sono riportate nei lavori di: JACOBS - WRIGHT - HILDEBRANDT ⁽¹⁾; FORTUNE - MAC CORMIK - RHODEHAMEL - STEFANIAK ⁽²⁾ e PFEIFER - VOJNOVICH - MEYER ⁽³⁾. Però sebbene questi lavori contengano informazioni di grande valore per gli specializzati, su molti importanti aspetti della tecnica delle fermentazioni in « impianto pilota » e sulle lavorazioni delle sostanze prodotte dalle fermentazioni, tuttavia esse non sono sufficientemente dettagliate in modo tale da consentire, specie alle persone prive di una esperienza specifica e pratica, di progettare e realizzare tali installazioni. Per tale ragione e in seguito alla crescente importanza dei metodi di produzione su vasta scala di metaboliti microbici, in tutti i campi della chimica biologica, gli AA. hanno ritenuto utile fornire la descrizione dettagliata di un « impianto pilota » da essi realizzato e in pieno funzionamento da oltre tre anni. I dettagli costruttivi sono descritti in modo tale da consentire la realizzazione di tali impianti, senza eccessive difficoltà a chiunque ne sia interessato. Sono anche illustrati e discussi alcuni problemi derivati dalla organizzazione del lavoro corrente dell'« impianto » dalla cui soluzione, dipende il successo di esso.

⁽¹⁾ JACOBS W. L., WRIGHT R. K. e HILDEBRANDT F. M. - Ind. Eng. Chem. 40: 759, (1948).

⁽²⁾ FORTUNE W. B., MCCORMICK S. L., RHODEHAMEL H. W. e STEFANIAK J. J. - Ind. Eng. Chem., 42: 191, (1950).

⁽³⁾ PFEIFER V. F., VOJNOVICH C. e HEGER E. N. - Ind. Eng. Chem. 44: 2975, (1952).

DISPOSIZIONE GENERALE DELL'« IMPIANTO PILOTA »

La disposizione generale dell'« impianto pilota » è illustrata nella Tav. I; l'« impianto » comprende una sezione di fermentazione (A tav. I e II e fig. 1) ed una di filtrazione ed estrazione (F. tav. I e fig. 3-3a). Queste due sezioni sono completate dai locali, nei quali sono installati i vari accessori dell'impianto e precisamente: l'impianto per il recupero solventi, (G tav. I e fig. 4), la centralina di compressione dell'aria (B tav. I), il generatore di vapore (I tav. I) e il complesso per la preparazione dei terreni, per il lavaggio della vetreria e per la sterilizzazione dei fermentatori da laboratorio (M tav. I).

SEZIONE DI FERMENTAZIONE

a) Numero e dimensione dei fermentatori

La sezione di fermentazione è costituita da: 46 fermentatori da laboratorio da 10 litri [CHAIN, PALADINO, UGOLINI, CALLOW e VAN der SLUIS ⁽⁴⁾], da 8 fermentatori da 90 litri e 3 da 300 [PALADINO, UGOLINI e CHAIN ⁽⁵⁾], ed infine da 2 sterilizzatori da 150 litri.

La costruzione dettagliata di questi fermentatori è riportata nei lavori sopra menzionati. In merito alla impostazione del numero dei fermentatori da installare in un « impianto pilota » bisogna tenere presente che uno dei fattori più importanti che limita e definisce tale numero è costituito dalle « unità » di personale disponibile (vedi in seguito).

b) Fermentatori da 10 litri

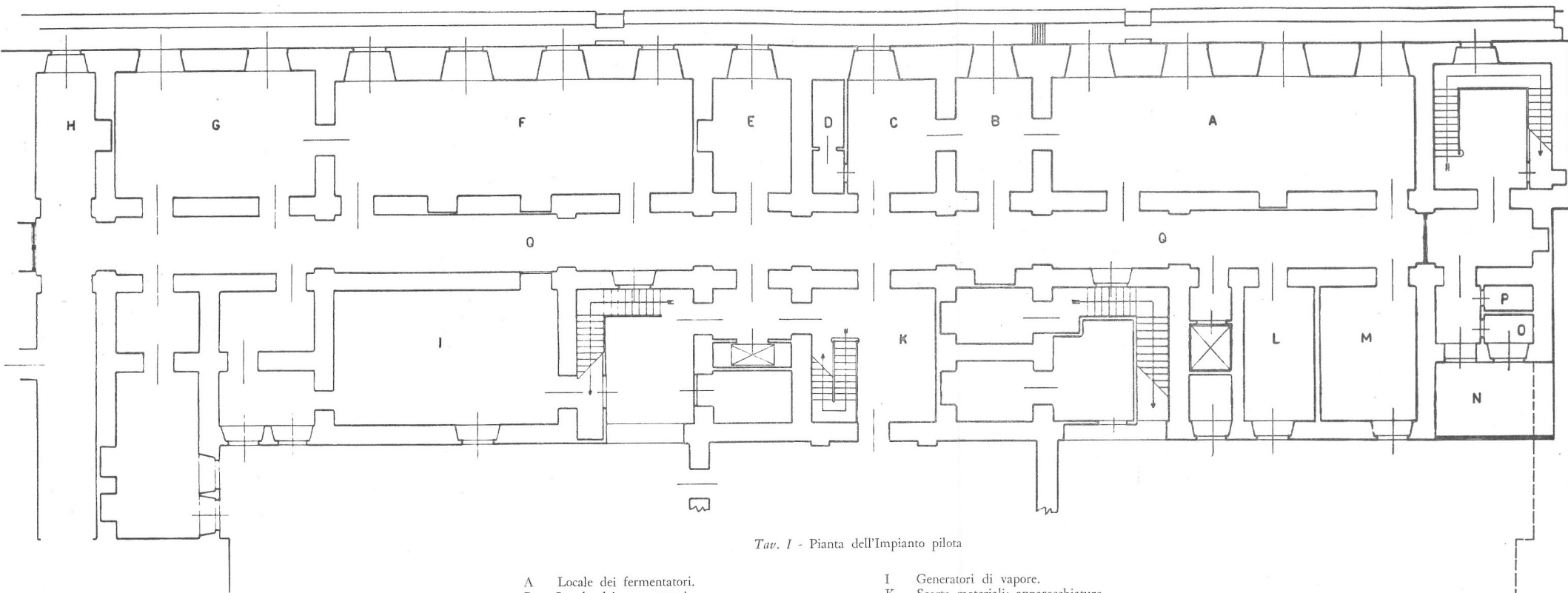
In questi si effettuano le fermentazioni sperimentali in serie per poter studiare e seguire il decorso di una fermentazione sotto diverse condizioni di lavoro. E' ovvio che, maggiore è la disponibilità di tali piccoli fermentatori in un « impianto pilota » e maggiore è il « guadagno di tempo » del lavoro sperimentale.

c) Fermentatori da 90 e da 300 litri

In un « impianto pilota » è essenziale poter disporre anche di fermentatori di dimensioni maggiori di quelli prima citati e ciò, non solo per scopi tecnologici ai fini industriali, ma anche per quelli di carattere biologico e biochimico. Infatti, se a causa dell'agitazione meccanica si verifica un'influenza sulla forma morfologica e sul comportamento bio-

⁽⁴⁾ CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 1164 (1954).

⁽⁵⁾ PALADINO S., UGOLINI F. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 1195 (1954).



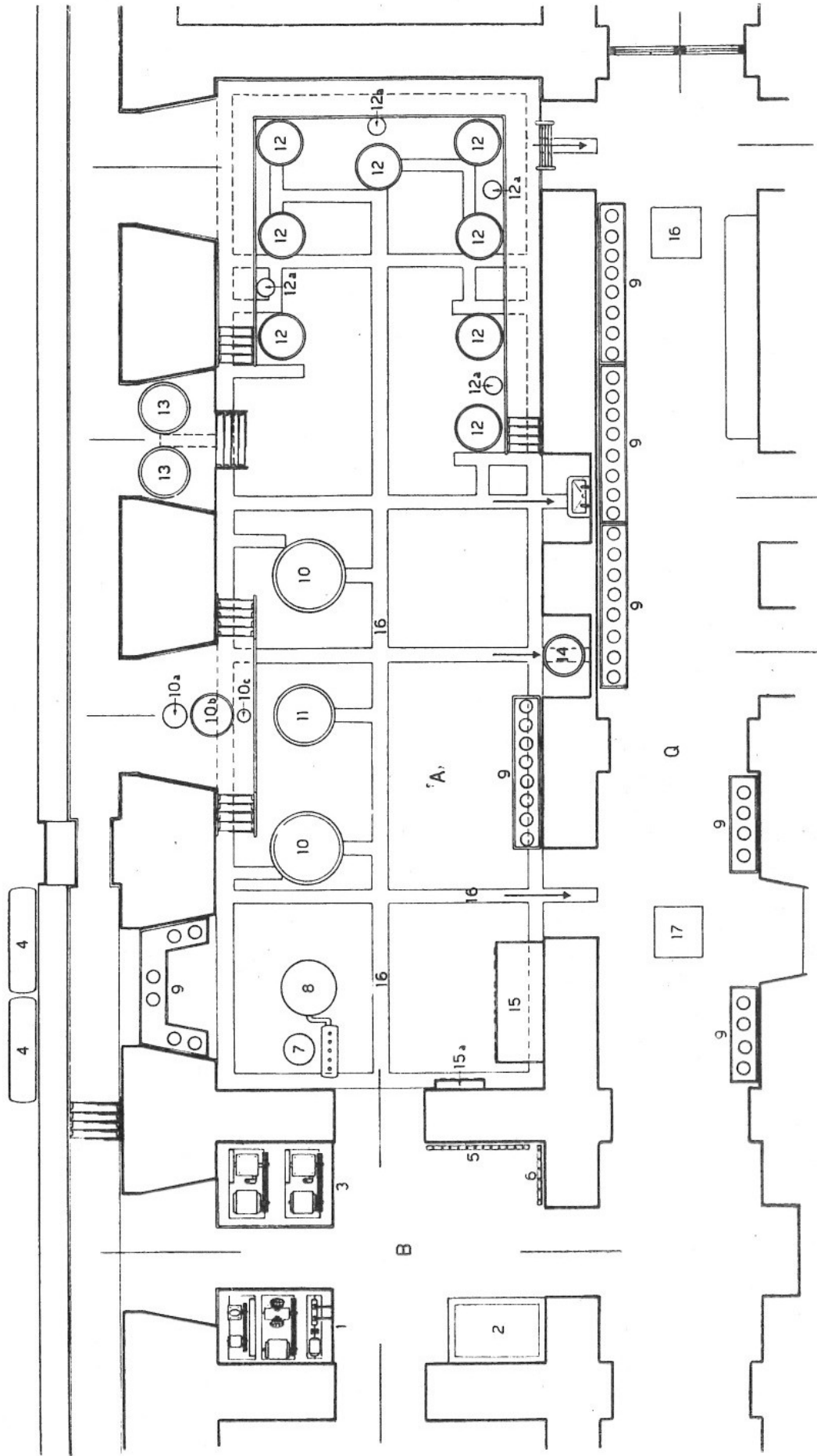
Tav. I - Pianta dell'Impianto pilota

- | | | | |
|---|--|---|---|
| A | Locale dei fermentatori. | I | Generatori di vapore. |
| B | Locale dei compressori. | K | Scorta materiali; apparecchiature. |
| C | Piccolo laboratorio per il controllo dell'andamento delle fermentazioni. | L | Ufficio. |
| D | Cella frigorifera. | M | Locale per la sterilizzazione dei piccoli fermentatori, lavaggio ed essiccaggio vetreria. |
| E | Camera termostatica. | N | Deposito materie prime. |
| F | Filtrazione ed estrazione. | O | W. C. |
| G | Impianto pilota per il recupero solventi. | P | Docce. |
| H | Officina per la manutenzione. | Q | Corridoio. |

Tav. II - Locale dei fermentatori.

- | | |
|---|---|
| 1) Compressori per la produzione del freddo. | 10-c) Recipiente per la misura dell'inoculo. |
| 2) Serbatoio di salamoia refrigerata. | 11) Fermentatore da l 200. |
| 3) Compressori d'aria. | 12) Fermentatore da l 90. |
| 4) Serbatoi d'aria compressa. | 12-a) Fermentatore di semina da l 10 per l'alimentazione di (12). |
| 5) Quadro di distribuzione dell'aria compressa e del gas illuminante. | 13) Sterilizzatori da l 200. |
| 6) Quadro di distribuzione dell'acqua fredda. | 14) Autoclave verticale da l 200. |
| 7) Decalcificatore dell'acqua. | 15) Quadro di distribuzione e di comando dell'energia elettrica. |
| 8) Caldaia elettrica per la produzione sussidiaria di vapore. | 15-a) Spie elettriche di controllo del funzionamento dei motori elettrici dei fermentatori. |
| 9) Gruppo di fermentatori da laboratorio da l 10. | 16) Canalette di servizio. |
| 10) Fermentatori da l 300. | 17) Ingresso al cunicolo dei servizi di fognatura. |
| 10-a) Fermentatore di semina da l 5 per l'alimentazione di (10). | |
| 10-b) Fermentatore di semina da l 50 per l'alimentazione di (10). | |

« Impianto pilota » per fermentazioni in cultura sommersa.



Tav. II.

Tav. III - Schema delle tubazioni di collegamento dei vari fermentatori.

A, B... G₁ = Vari gruppi di valvole; vedi Tav. III-a.

L-M = Tubazioni, in acciaio inossidabile, di collegamento dei fermentatori da 90, 200 e 300 litri.

S, S₂... S₅ = Fermentatori di semina da l 10.

S₁ = Fermentatori di semina da l 10.

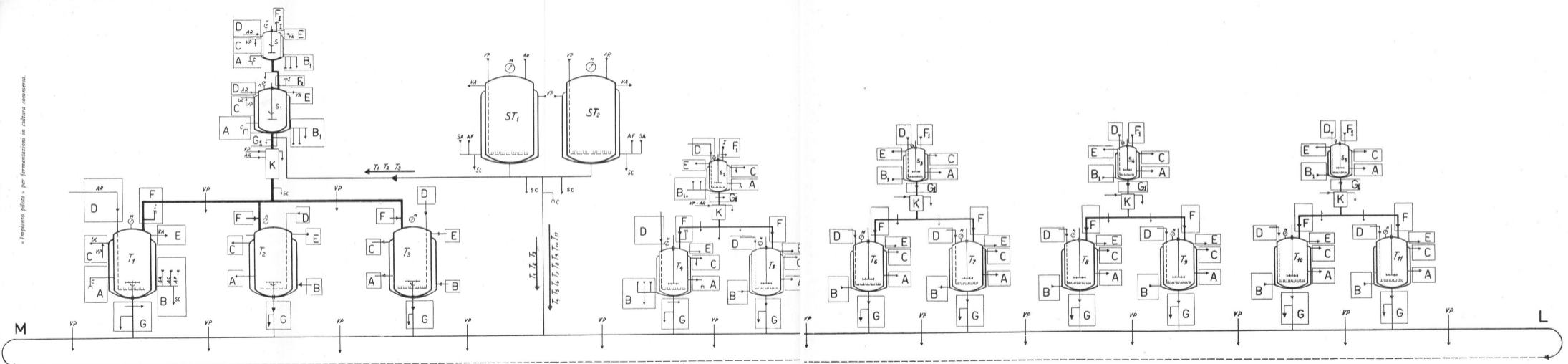
ST₁, ST₂ = Sterilizzatori da l 200.

T₁ e T₃ = Fermentatori da l 300.

T₂ = Fermentatore da l 200.

T₄, T₅... T₁₁ = Fermentatori da l 90.

AR	= Ingresso dell'aria compressa.	VP	= Vapore.
AC	= Ingresso dell'acqua calda.	UC	= Uscita acqua fredda dai fermentatori.
AF	= Ingresso dell'acqua fredda.	C	= Presa dei campioni.
SA	= Ingresso della salamoia refrigerata.	K	= Recipiente per la misura dell'inoculo.
SC	= Scarico del vapore (al collettore).	I	= Ingressi nel fermentatore chiusi con cappellotti.
VA	= Uscita dell'aria dai fermentatori (ai misuratori di portata).	M	= Manometri.

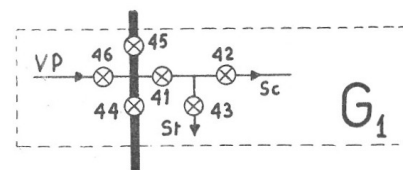
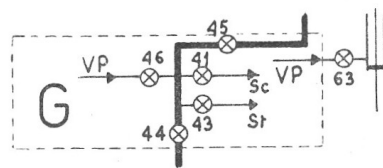
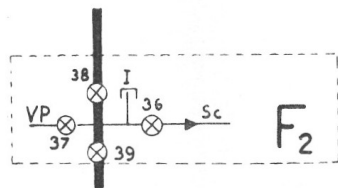
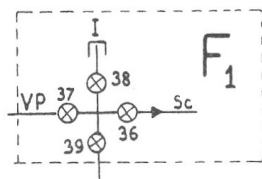
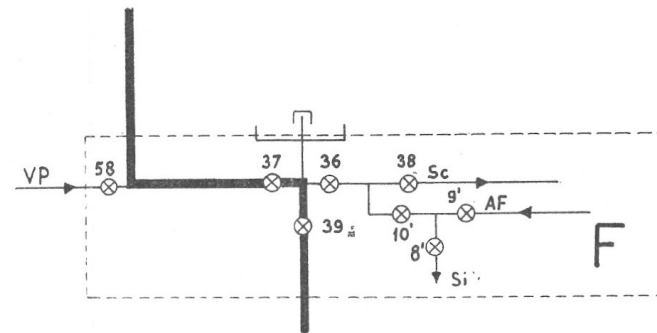
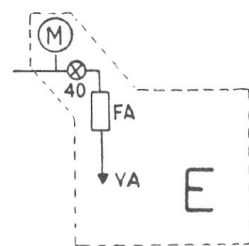
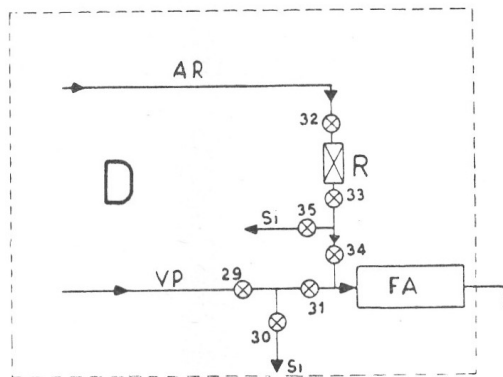
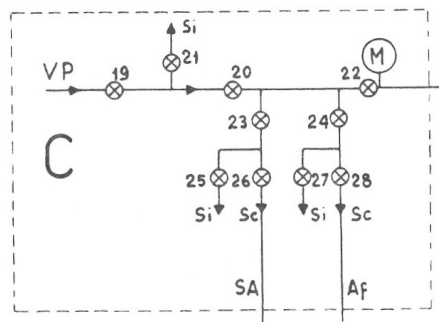
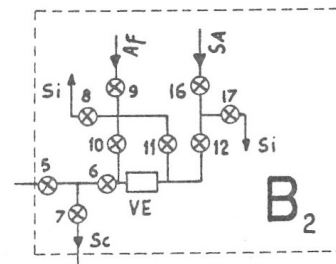
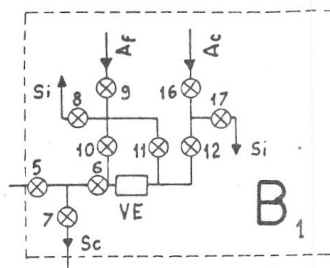
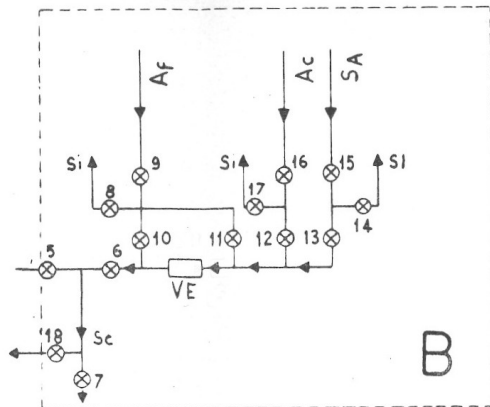
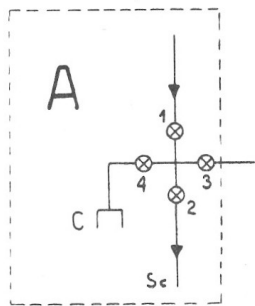


Tav. III

Tav. III-a - Dettagli dei vari gruppi di valvole.

Gruppo A	Presca dei campioni.
» B	Ingresso dell'acqua calda, fredda e della salamoia refrigerata nella camicia del fermentatore.
» B ₁	Derivato dal gruppo B ed usato per i fermentatori di « semina » o per gli « intermedi » per i quali non è richiesta la salamoia refrigerata.
» B ₂	Derivato dal gruppo B ed usato per gli sterilizzatori per i quali non è richiesta l'acqua calda.
» C	Ingresso del vapore nella camicia ed uscita dei fluidi usati per la termoregolazione.
» D	Ingresso dell'aria nei fermentatori.
» E	Uscita dell'aria dai fermentatori.
» F	Aggiunta di liquidi sterili nei fermentatori durante la fermentazione.
» F ₁	Aggiunta di liquidi sterili nei fermentatori di « semina ».
» F ₂	Aggiunta di liquidi sterili nei fermentatori « intermedi »,
» G	Scarichi in fogna.
» G ₁	Derivato dal gruppo G ed usato per i fermentatori di « semina ».

AR	= Ingresso dell'aria compressa.	VP	= Ingresso del vapore.
AC	= Ingresso dell'acqua calda.	C	= Presca dei campioni.
AF	= Ingresso dell'acqua fredda.	FA	= Filtri sterilizzatori dell'aria.
SA	= Ingresso della salamoia refrigerata.	I	= Ingressi nel fermentatore chiusi con cappellotti.
SC	= Scarico del vapore (al collettore).	K	= Recipienti per la misura dell'inoculo.
Si	= Valvola di sicurezza.	M	= Manometri.
St	= Scarico (alla fognatura).	R	= Valvola di riduzione (per la aria compressa).
VA	= Uscita dell'aria dai fermentatori (ai misuratori di portata).	VE	= Valvola elettromagnetica.



Tav. III-b - Schema delle tubazioni necessarie alle varie operazioni di « trasferimento ».

A, B,... G = Vari gruppi di valvole; vedi Tav. III-a.

L-M = Tubazioni in acciaio inossidabile, di collegamento dei fermentatori da 90, 200 e 300 litri.

S₁ = Fermentatore « intermedio » da l 50.

ST₁-ST₂ = Sterilizzatori da l 200.

T₁-T₃ = Fermentatori da l 200.

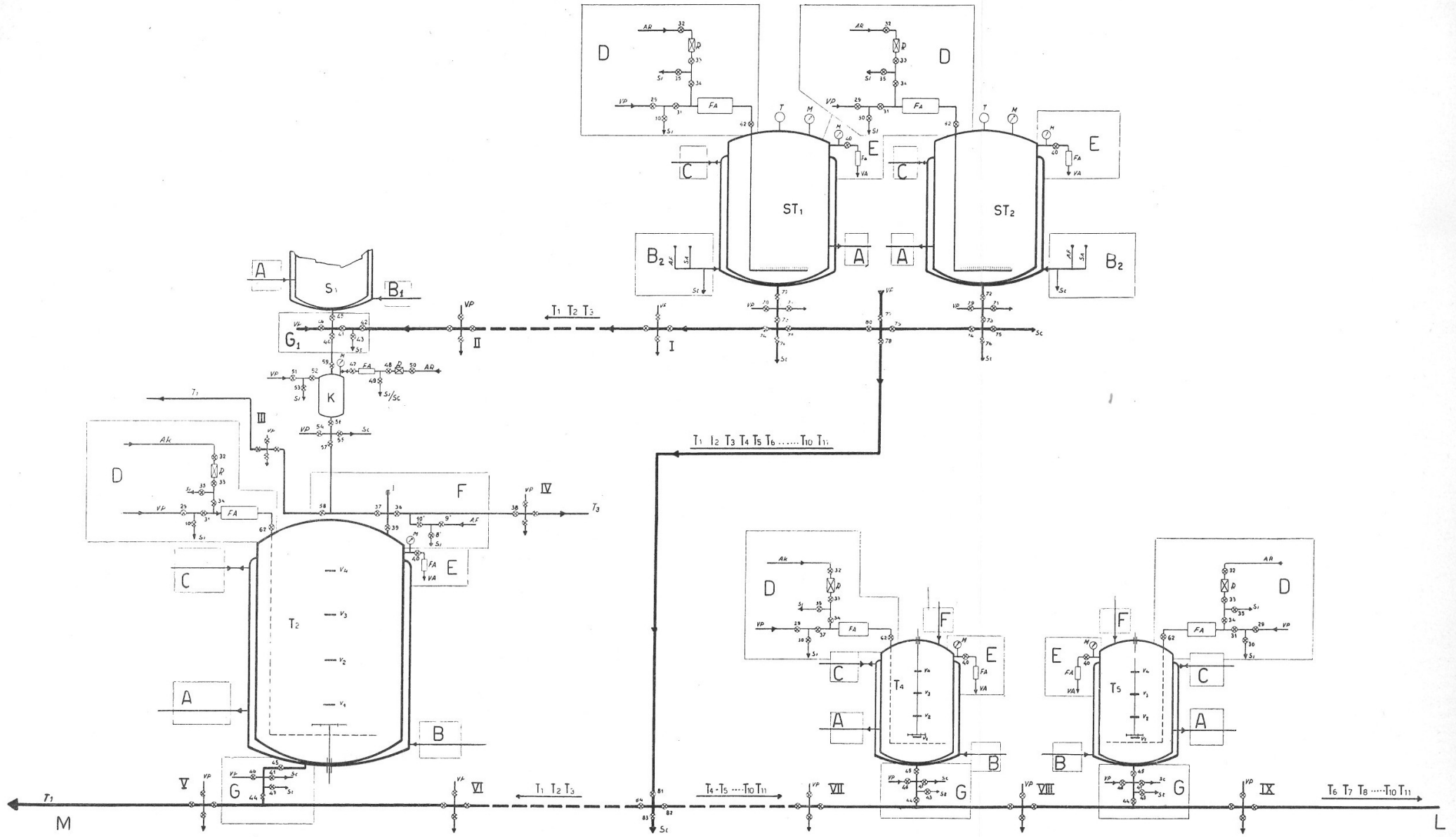
T₂ = Fermentatori da l 200.

T₄, T₅... T₁₁ = Fermentatori da l 90.

V₁, V₂... V₄ = Piastrine segnavolume, saldate nell'interno dei fermentatori.

I, II,... IX = Tagli di vapore.

AR	= Ingresso dell'aria compressa.	VP	= Ingresso del vapore.
AC	= Ingresso dell'acqua calda.	C	= Presa dei campioni.
AF	= Ingresso dell'acqua fredda.	FA	= Filtri sterilizzatori dell'aria.
SA	= Ingresso della salamoia refrigerata.	I	= Ingressi nel fermentatore chiusi con cappellotti.
SC	= Scarico del vapore (al collettore).	K	= Recipienti per la misura del « l'inoculo ».
Si	= Valvola di sicurezza.	M	= Manometri.
St	= Scarico (alla fognatura).	R	= Valvola di riduzione (per la aria compressa).
VA	= Uscita dell'aria dei fermentatori (ai misuratori di portata).	T	= Termometri.

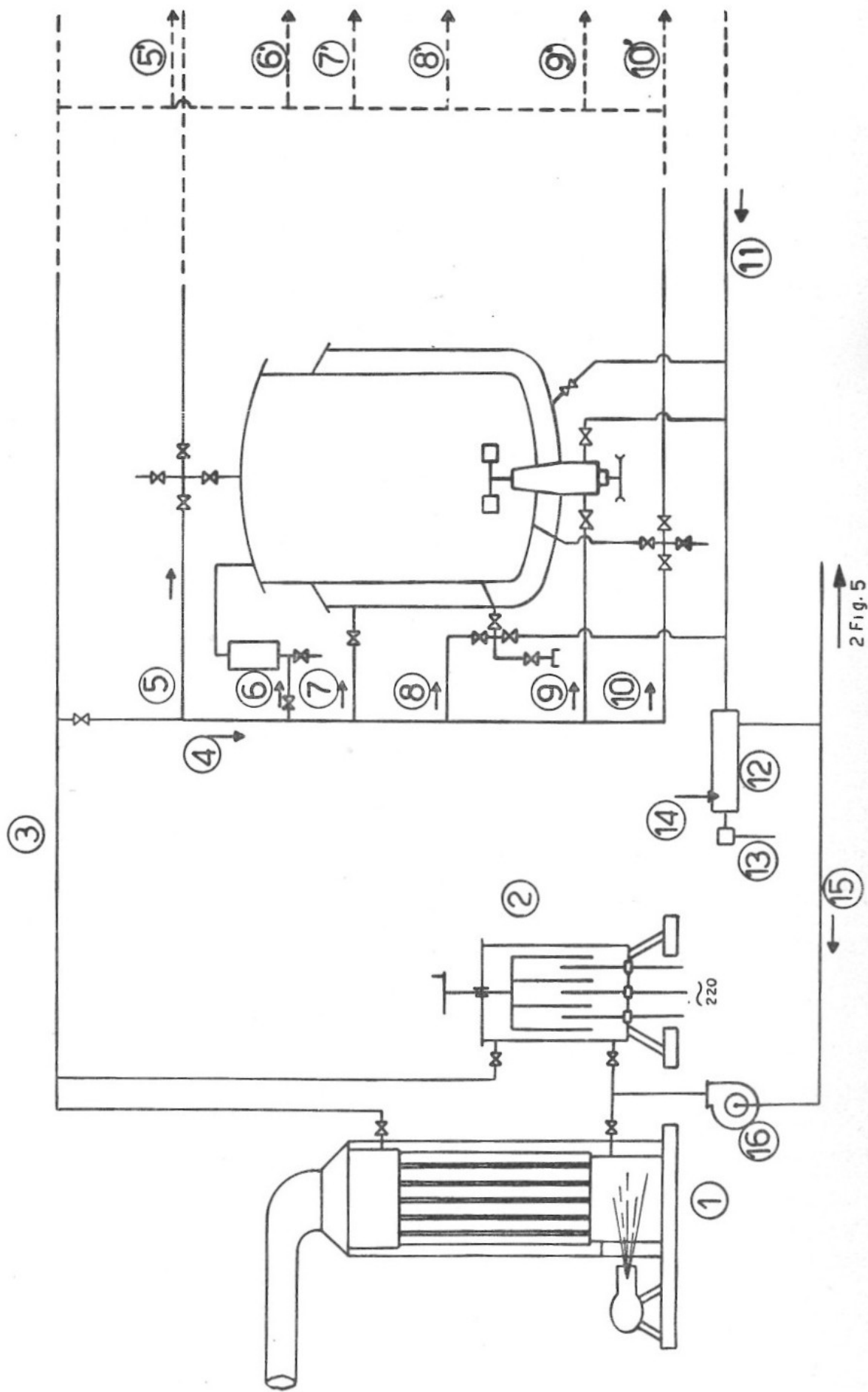


Tav. III-b

Tav. IV - Schema della circolazione del vapore.

- 1) Generatore di vapore, a nafta, produttore 100 Kg/h di vapore saturo a 4 Atm.
- 2) Generatore di vapore, elettrico, da 120 KW, produttore 150 Kg/h di vapore saturo a 4 Atm.
- 3) Condotta principale, aerea, di adduzione del vapore nel locale dei fermentatori (pressione di distribuzione 3 Atm).
- 4) Condotte di distribuzione del vapore ai fermentatori ed alle relative apparecchiature.
- 5-10) Condotte di derivazione del vapore per:
 - 5) il taglio di vapore necessario per il trasferimento dell'inoculo;
 - 6) il filtro sterilizzatore dell'aria;
 - 7) la camicia del fermentatore;
 - 8) la presa dei campioni;
 - 9) il taglio di vapore del complesso di guida e di tenuta dell'albero dell'agitatore;
 - 10) il taglio di vapore dello scarico di fondo del fermentatore.
- 11) Condotta del vapore di ritorno.
- 12) Condensatore (scambiatore).
- 13) Scarico della condensa.
- 14) Ingresso nello scambiatore di acqua decalcificata.
- 15) Acqua calda decalcificata per l'alimentazione dei generatori di vapore e dei fermentatori.

« Impianto pilota » per fermentazioni in cultura sommersa.

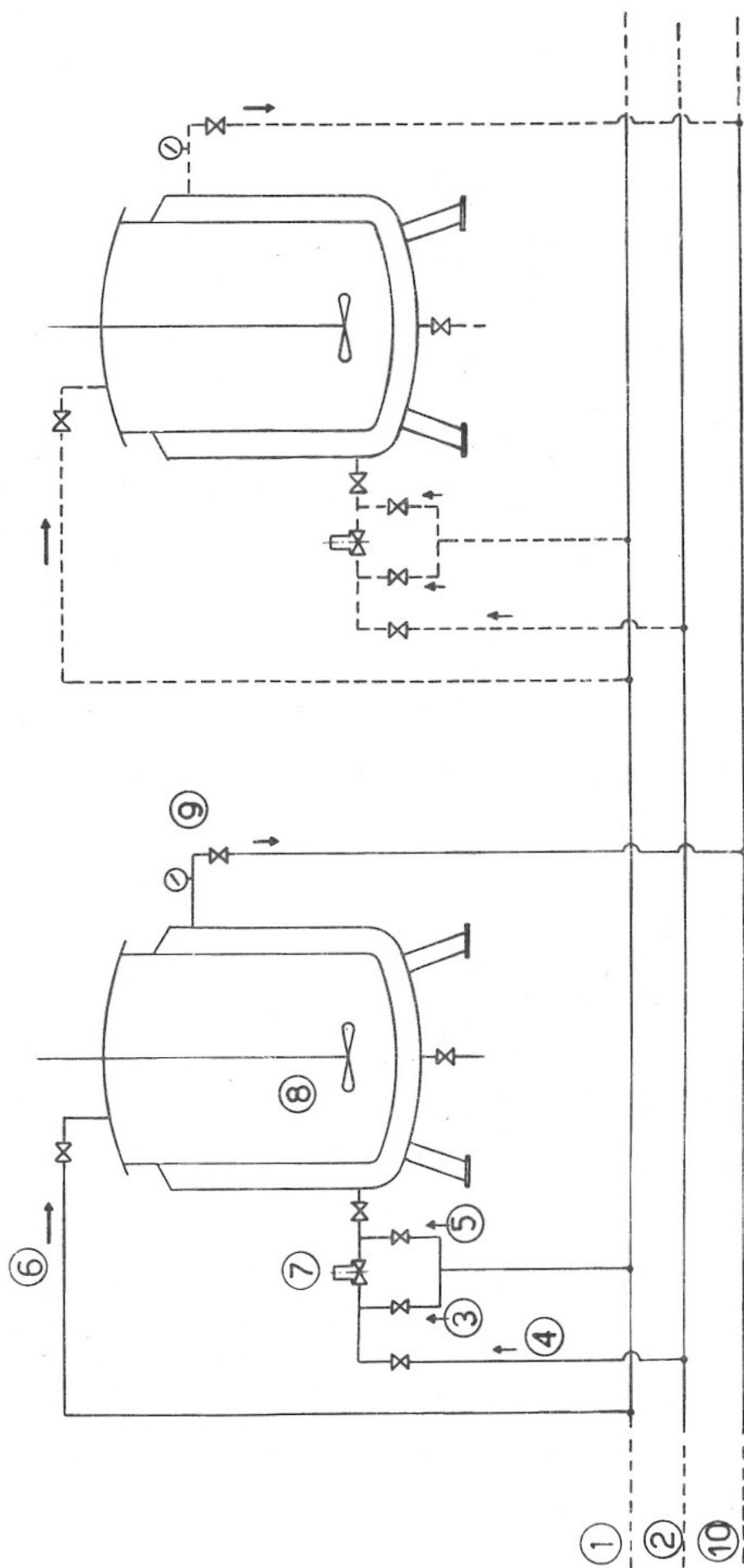


Tav. IV

Tav. V - Schema della circolazione dell'acqua.

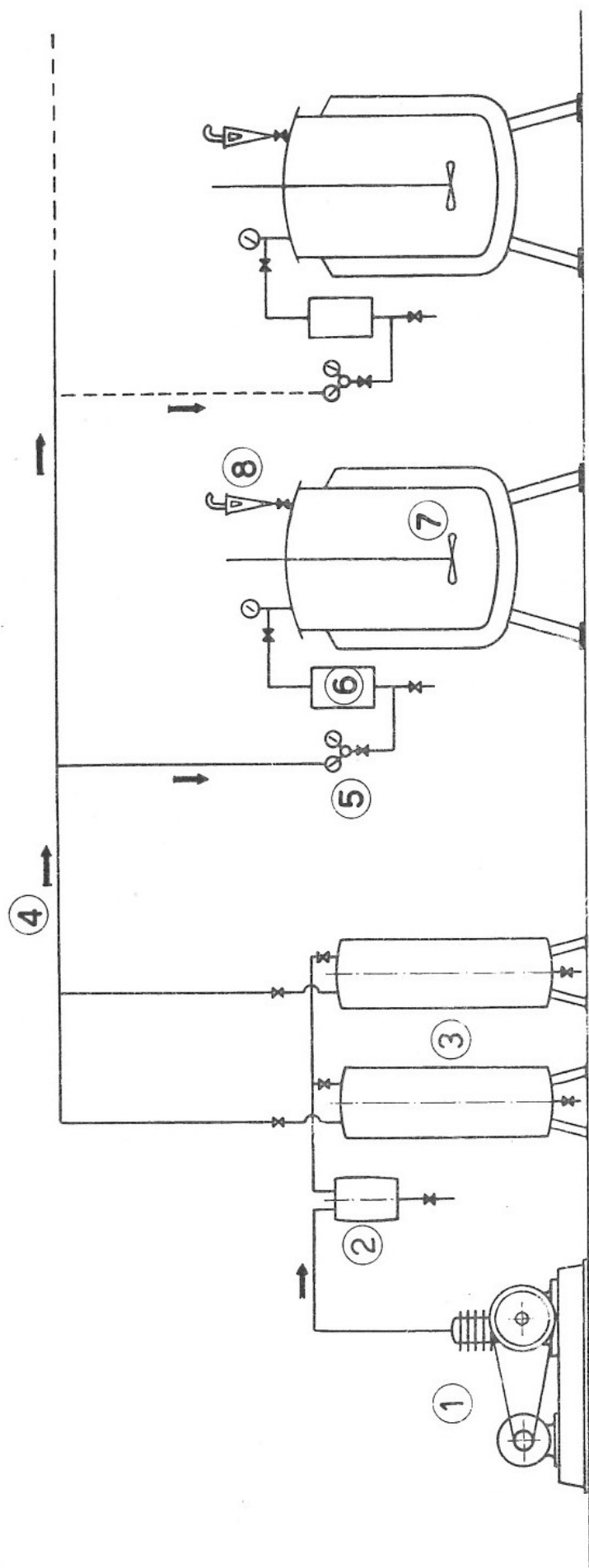
- 1) Condotta principale, aerea, dell'acqua fredda.
- 2) Condotta principale, aerea, dell'acqua calda.
- 3) Ingresso attraverso la valvola elettromagnetica, dell'acqua fredda nella camicia del fermentatore per la termoregolazione.
- 4) Ingresso, attraverso la valvola elettromagnetica, dell'acqua calda nella camicia del fermentatore per la termoregolazione.
- 5) Ingresso diretto dell'acqua fredda nella camicia del fermentatore.
- 6) Ingresso diretto dell'acqua fredda nel fermentatore.
- 7) Valvola elettromagnetica.
- 8) Fermentatore.
- 9) Uscita dell'acqua dalla camicia del fermentatore.
- 10) Tubazione di scarico, raccordata con la fogna.

« Impianto pilota » per fermentazioni in cultura sommersa.



Tav. V

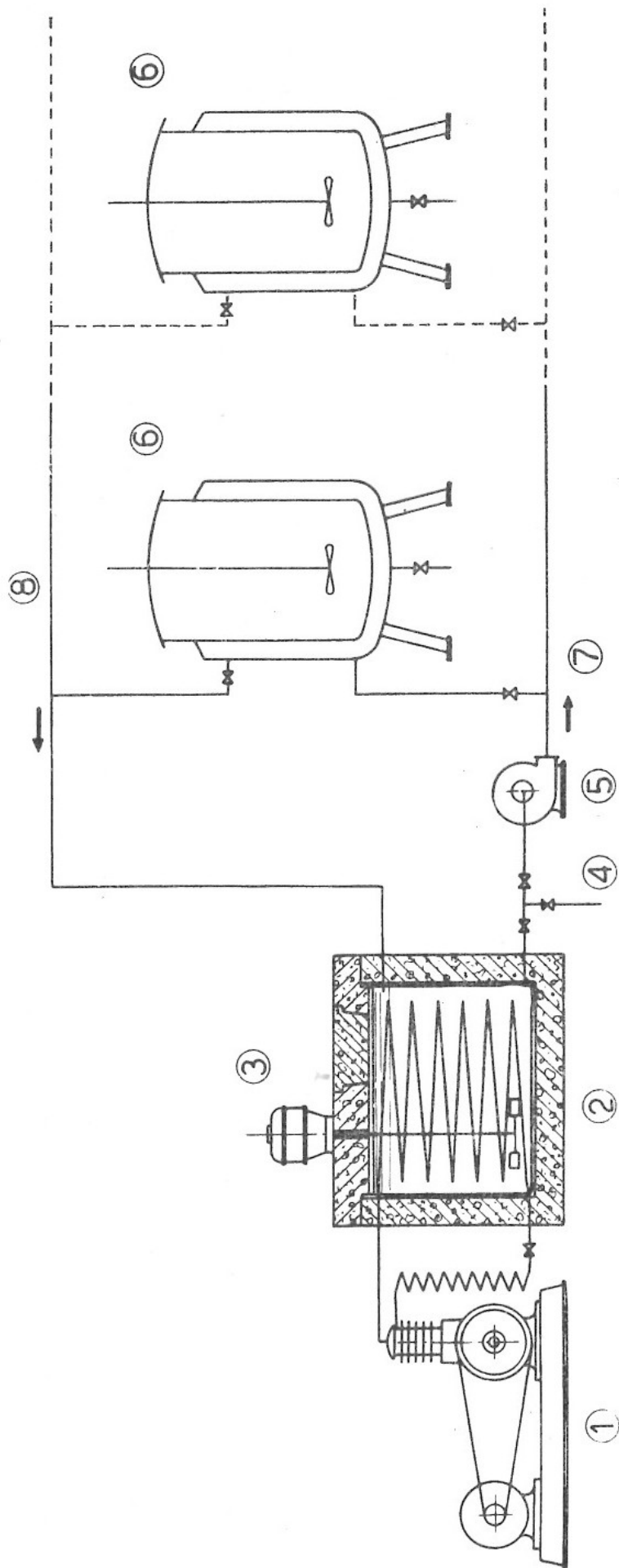
« Impianto pilota » per fermentazioni in cultura sommersa.



Tav. VI - Schema della circolazione dell'aria compressa.

- 1) Compressore alternativo, con raffreddamento a circolazione di acqua, portata 1 1000 al minuto a 3 Atm.; ne sono installati due unità che lavorano alternativamente.
- 2) Scaricatore di condensa.
- 3) Serbatoi dell'aria compressa da 1 300 cadauno.
- 4) Condotta principale, aerea, di adduzione dell'aria compressa ai fermentatori.
- 5) Valvola di riduzione.
- 6) Filtri sterilizzatori dell'aria di alimentazione.
- 7) Fermentatori.
- 8) Misuratori di portata.

« Impianto pilota » per fermentazioni in cultura sommersa.



Tav. VII - Schema della circolazione della salamoia refrigerata.

- 1) Compressore da 10.000 Frigorie/ora.
- 2) Recipiente da 1 1000 della salamoia refrigerata.
- 3) Agitatore della salamoia refrigerata.
- 4) Scarico in fogna della salamoia refrigerata.
- 5) Pompa per la circolazione nei fermentatori della salamoia refrigerata.
- 6) Fermentatori.
- 7) Tubazione di alimentazione della salamoia refrigerata dei fermentatori.
- 8) Tubazione di ritorno dai fermentatori della salamoia refrigerata.

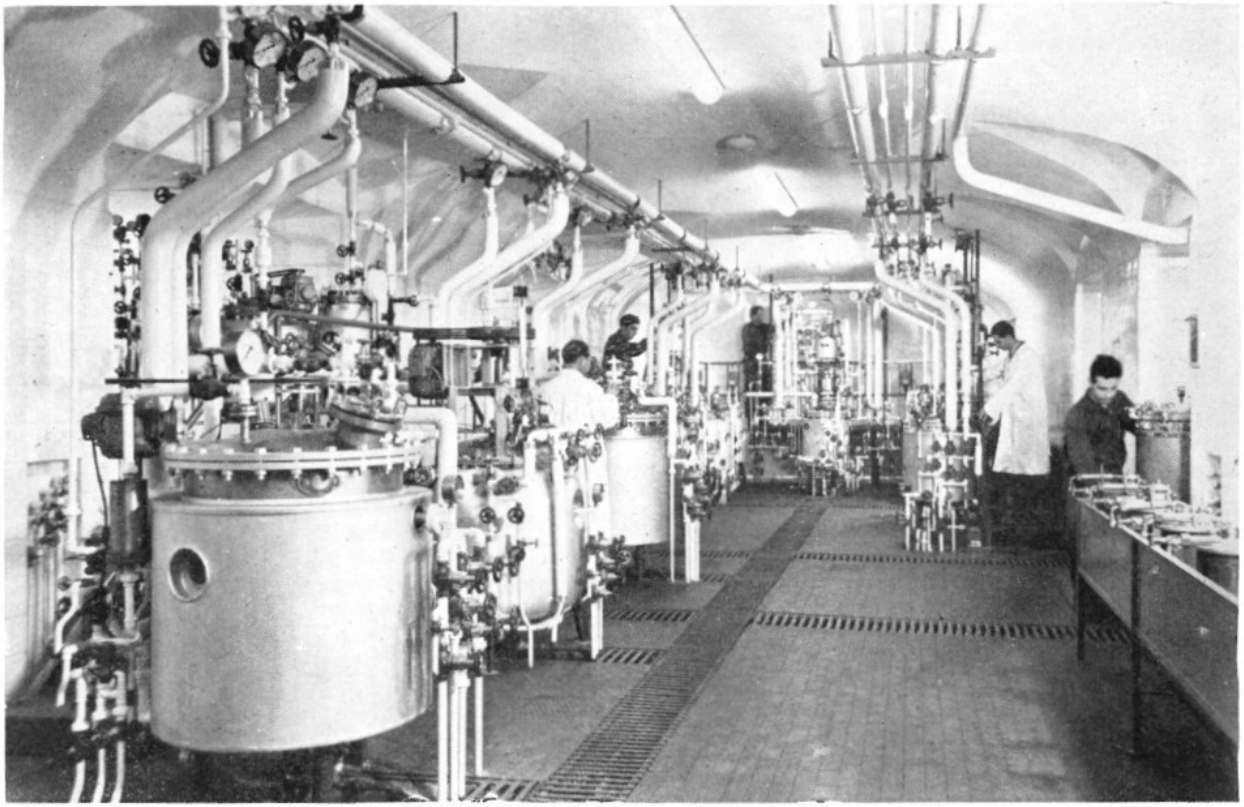


Fig. 1. - Locale dei fermentatori (A Tav. I); sono visibili: a sinistra i fermentatori da 200 e 300 litri, al centro quelli da 90 litri ed a destra quelli da 10 litri con la loro vasca termostatica.

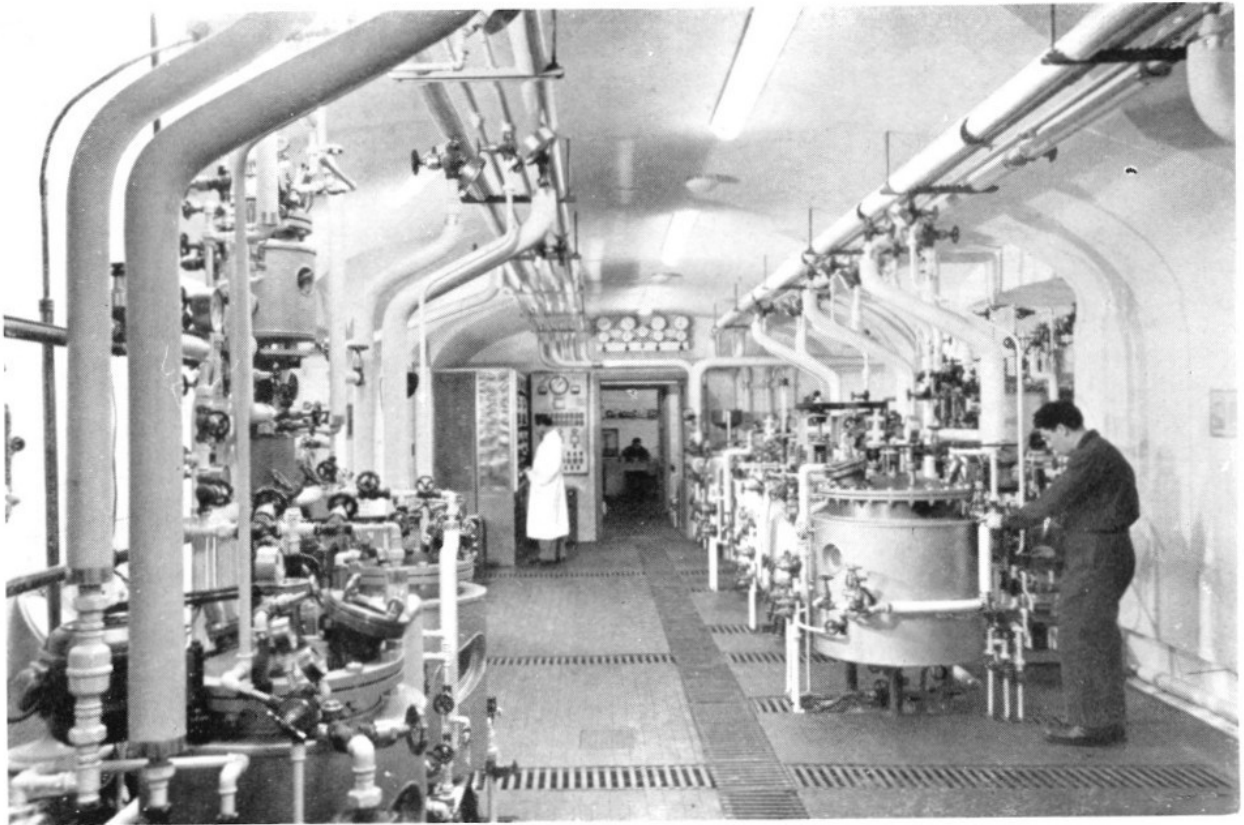


Fig. 2. - Locale dei fermentatori (A, Tav. I); sono visibili a sinistra i fermentatori da 90 litri; al centro il pannello elettrico di controllo e l'ingresso al laboratorio di controllo ed a destra i fermentatori da 200 e 300 litri.



Fig. 3. - Locale per la filtrazione e l'estrazione; veduta generale.

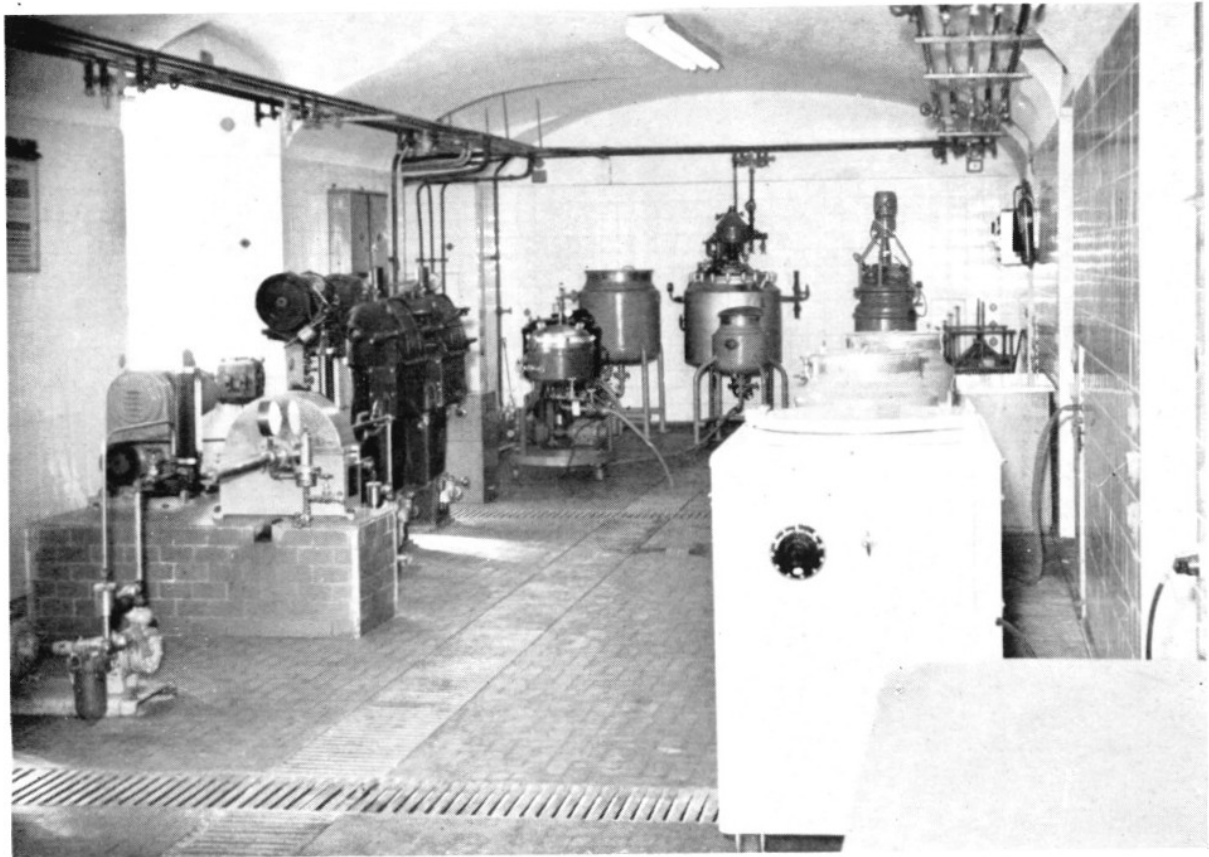


Fig. 3 a. - Locale per la filtrazione e l'estrazione (vedi particolari nella Tav. III); sono visibili: a sinistra l'estrattore Podbielniak, le centrifughe Sharples, il filtro Sparkler; al centro i recipienti per le reazioni e quelli di deposito, tutti muniti di camicia; a destra ancora recipienti di deposito ed una centrifuga refrigerata.

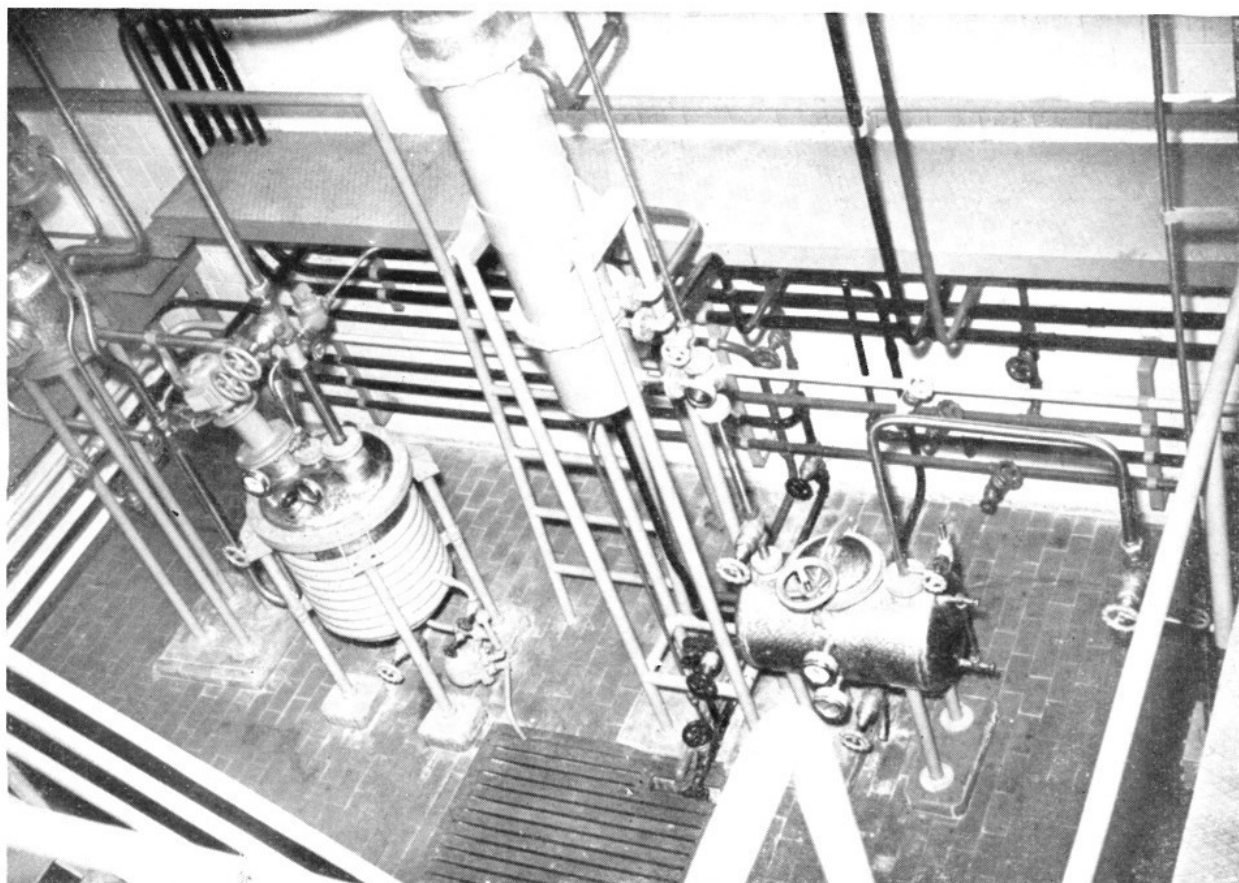


Fig. 4. - Impianto pilota per il recupero dei solventi.

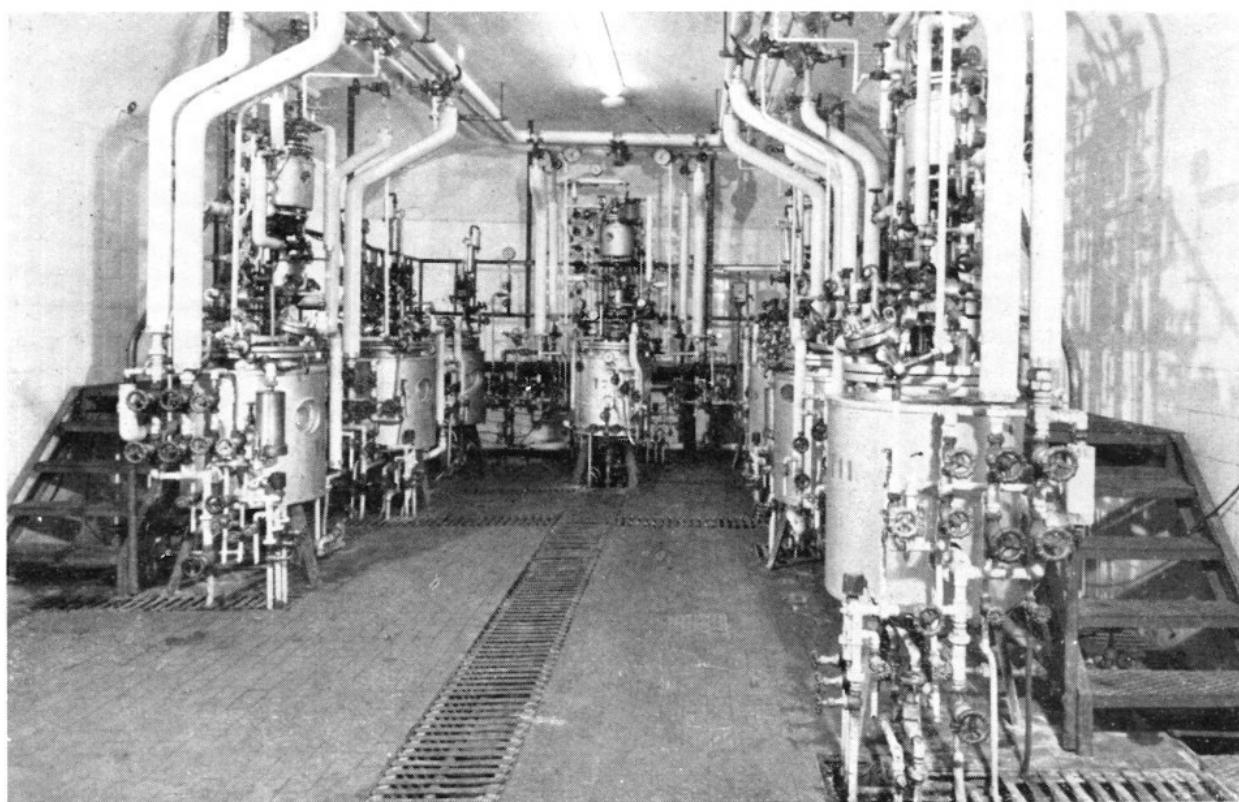


Fig. 5. - Il gruppo degli otto fermentatori da 90 litri.

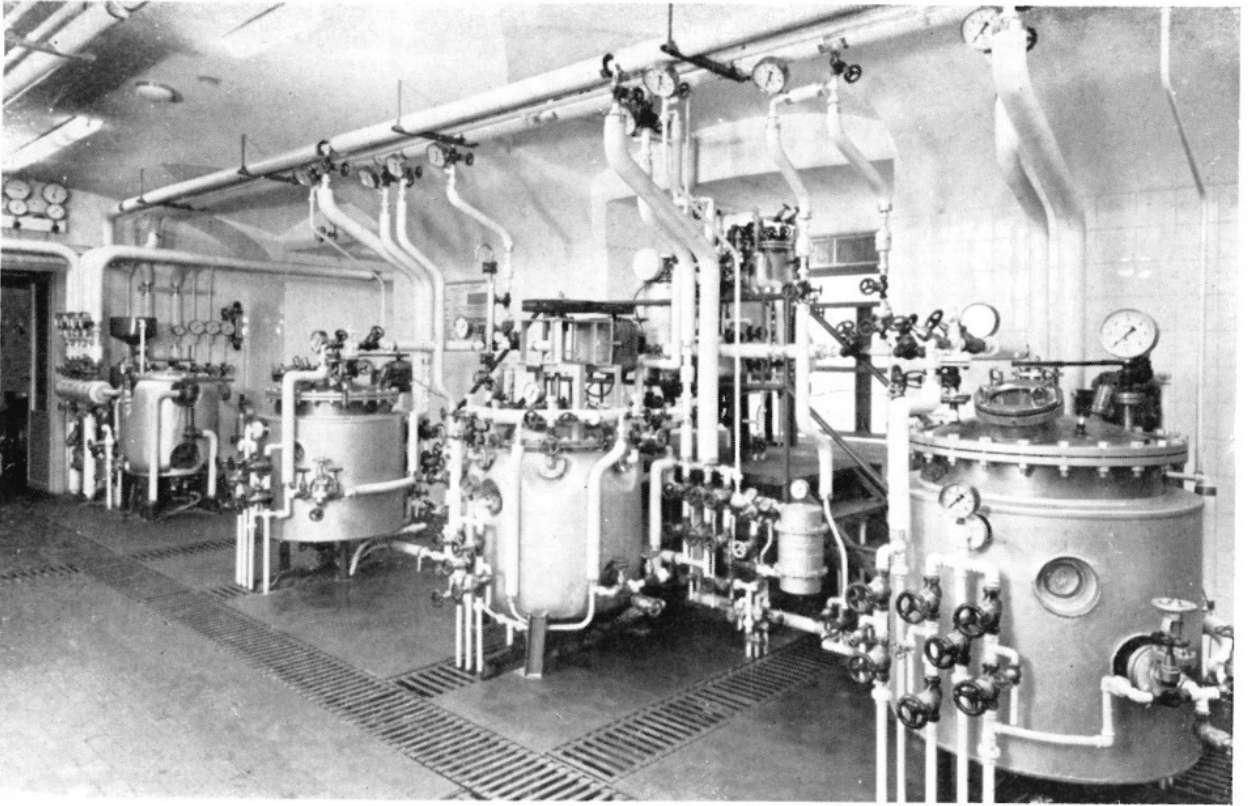


Fig. 6. - I fermentatori da 200 e 300 litri.

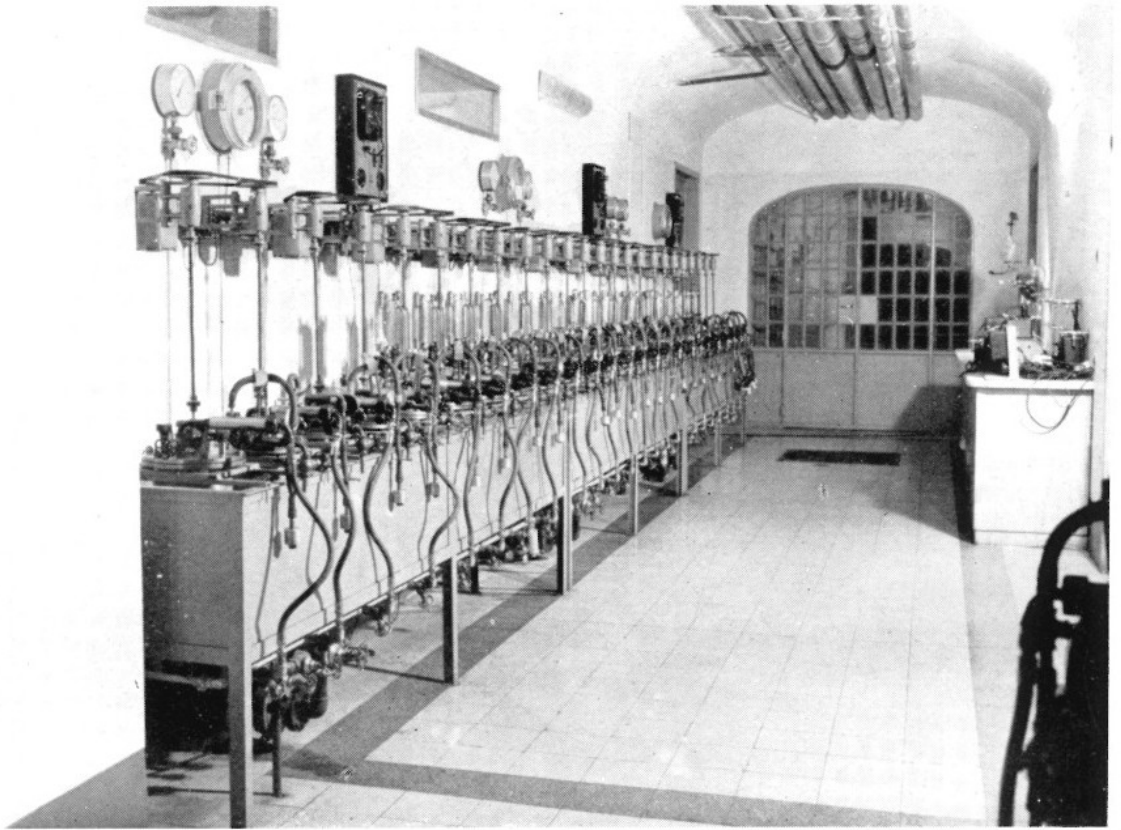


Fig. 7. - Tre unità formate ciascuna da 8 fermentatori da 10 litri.

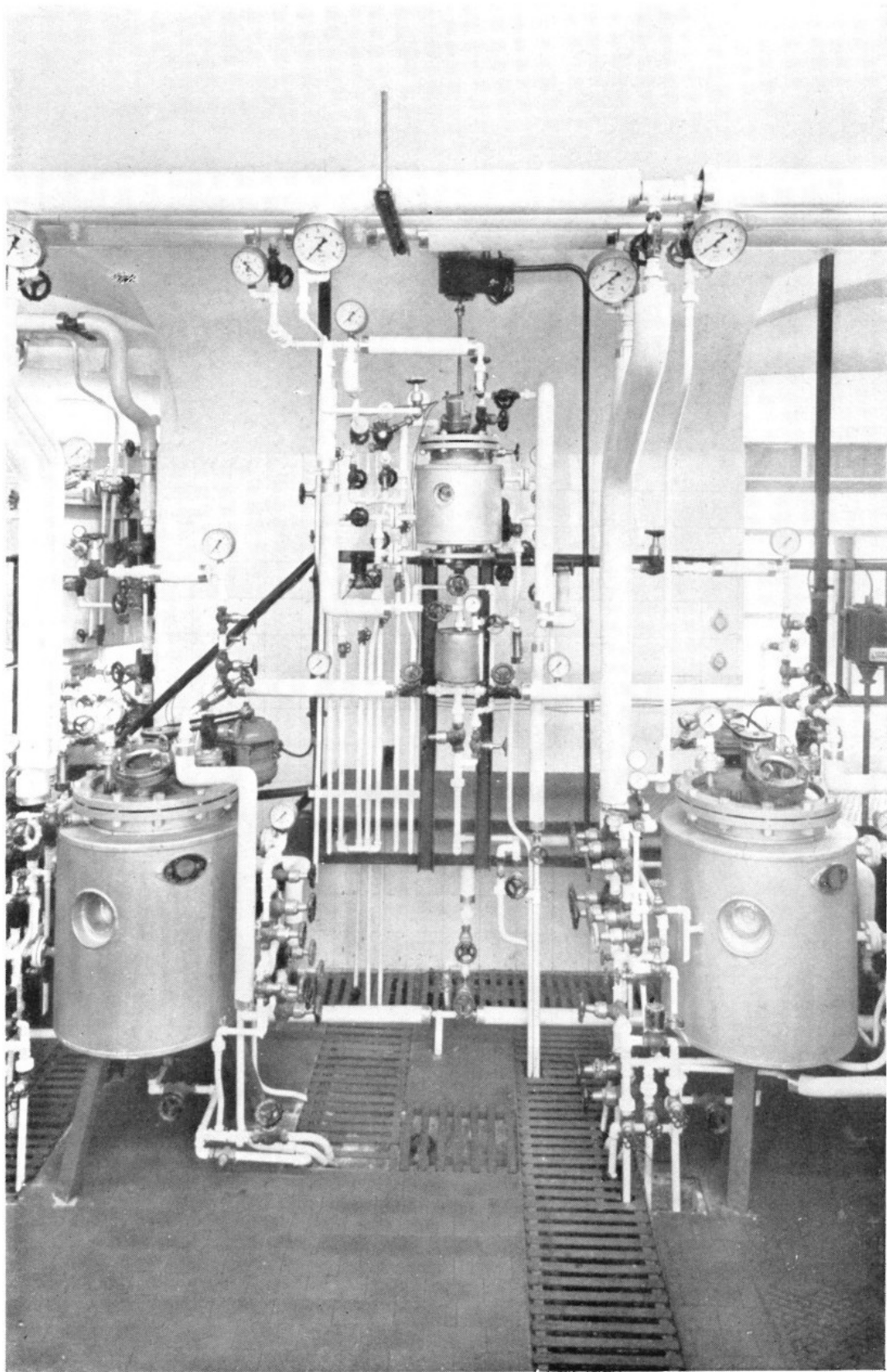


Fig. 8. - Due fermentatori da 90 litri completi del loro fermentatore di « semina » da 10 litri.

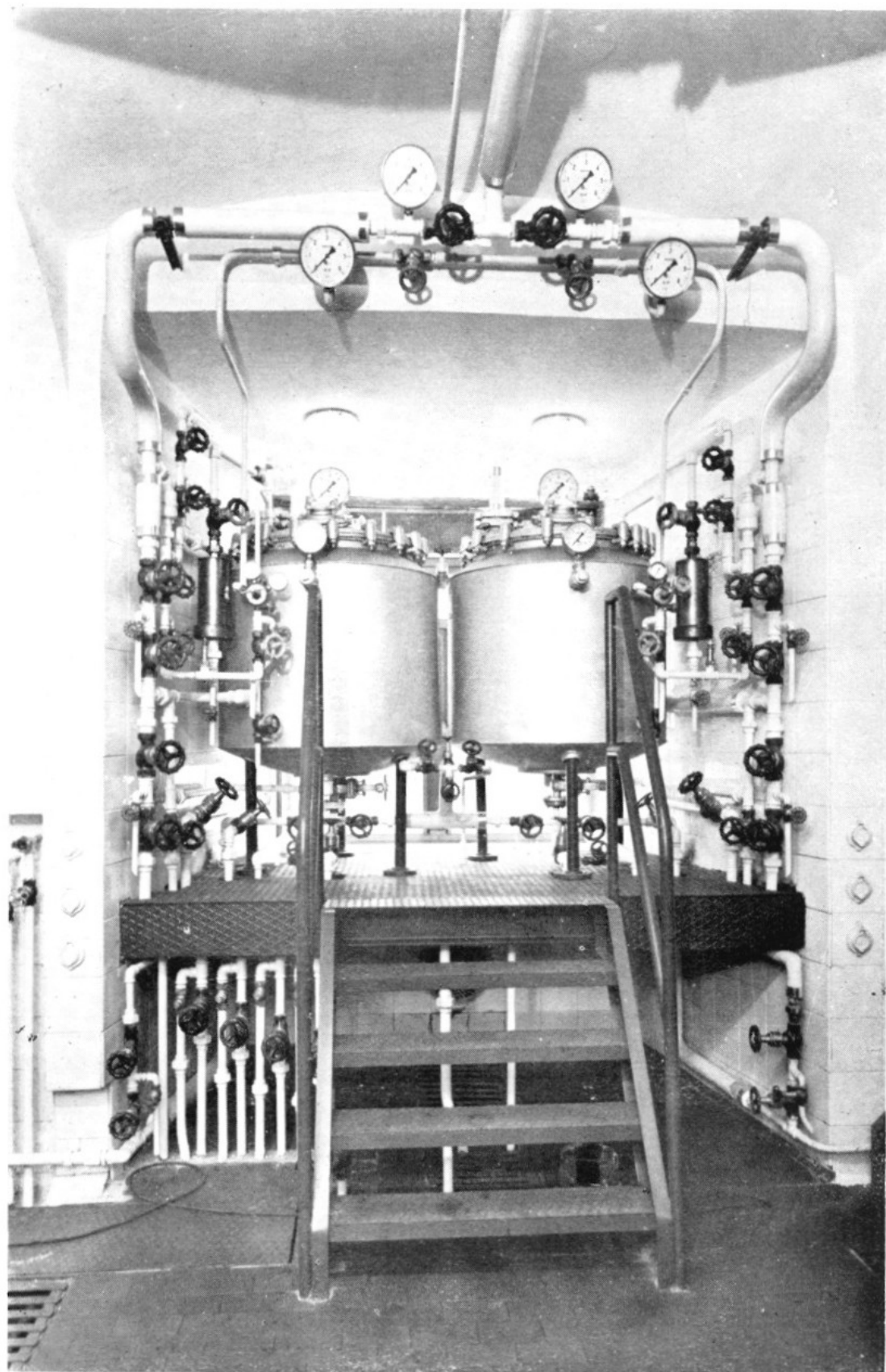


Fig. 9. - Il gruppo dei due sterilizzatori.

chimico dei microrganismi in studio, come è il caso, per esempio, del *Penicillium Grysogenum*, [DION, CARILLI, SERMONTI e CHAIN (6)] questa influenza diviene sempre meno evidente man mano che aumenta il volume del terreno di cultura in lavorazione e ciò in special modo se si usano sistemi di aerazione privi di antivortici. La spiegazione sta nel fatto che, aumentando il volume del « terreno di cultura » in lavorazione, cioè man mano che si aumentano i volumi dei fermentatori, nell'unità di tempo i microrganismi della cultura in lavorazione ritornano sempre meno frequentemente nel campo d'azione meccanica, generato dal sistema adoperato nel fermentatore per la diffusione dell'aria. *A causa di ciò è impossibile a volte poter riprodurre in fermentatori di piccole dimensioni le condizioni esistenti in quelli di dimensioni maggiori e viceversa*

Un altro inconveniente dei piccoli fermentatori è la impossibilità d'installare su di essi dei dispositivi automatici per l'aggiunta di soluzioni durante la fermentazione necessari per es. per il controllo automatico del pH a causa della mancanza di spazio utile sulla testata e delle piccole quantità di liquido da aggiungere. L'esperienza ha dimostrato che per poter installare convenientemente vari dispositivi automatici su un fermentatore, la sua capacità non dovrebbe essere inferiore a 90 l. E' da tenere presente, sempre trattandosi del pH, che se questo deve essere mantenuto costante contemporaneamente in parecchi fermentatori è ovvio che la operazione manuale diviene sempre più un problema difficile, man mano che aumenta il numero dei fermentatori da controllare, a causa del tempo e del lavoro richiesto per tale operazione. Di conseguenza si potranno creare delle condizioni tali per cui l'automatizzazione della misura e del controllo del pH diventerà una necessità inderogabile.

d) *Fermentatore da 3000 litri*

Oltre i fermentatori da 90 e da 300 litri, gli A.A. dispongono di un fermentatore del volume complessivo di circa 3.000 litri, ubicato in un'altra costruzione dell'Istituto; esso si è dimostrato un utile complemento dell'« impianto pilota » specialmente per lo studio dimensionale degli effetti degli organi diffusori nel passaggio dai fermentatori da laboratorio a quelli di dimensioni industriali.

e) *Disposizione planimetrica dei fermentatori*

La Tav. II illustra la disposizione planimetrica dei vari fermentatori; quelli da 10 l. sono stati ubicati in parte nella sala di fermentazione (A

(6) DION W. M., CARILLI A., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Rend Ist. Sup. Sanità, 17, 1304 (1954).

Tav. II, fig. 1) e in parte nel corridoio (9 Tav. II, fig. 7), addossati alla parete. I fermentatori da 90 e 300 litri sono alloggiati nella sala di fermentazione e collegati fra di loro con una tubazione in acciaio inossidabile, in modo da poter effettuare trasferimenti di culture da un fermentatore all'altro.

Ogni gruppo di due fermentatori da 90 l. è alimentato, per il « primo stadio », da un fermentatore da 10 l. in acciaio inossidabile, munito di camicia e di termoregolazione automatica.

I fermentatori da 300 litri vengono inoculati sia direttamente, con spore, sia con la cultura di un « primo stadio », ottenuta in un fermentatore di acciaio inossidabile da 90 l. (Tav. III, fig. 6).

f) *Sterilizzatori*

Il « terreno di cultura » può essere sterilizzato direttamente nei fermentatori o separatamente da questi ultimi, in appositi sterilizzatori; a tale scopo nella sala di fermentazione sono state installate due unità sterilizzatrici della capacità complessiva di l, 200 (Tav. III b), fig. 9. La disponibilità di questi sterilizzatori è molto utile e per di più indispensabile per alcuni processi, come per es. per sostituire il terreno di cultura nei fermentatori durante la fermentazione, onde effettuare cicli di fermentazione continua, oppure per sterilizzare alcuni componenti dei « terreni di cultura » sperimentali, che verrebbero ad alterarsi se sterilizzati insieme agli altri, ecc.

I due sterilizzatori sono di ferro, rivestiti internamente con sostanze vetrificate e muniti di camicia per gli scambi termici necessari alla sterilizzazione ed al successivo raffreddamento; essi sono collegati fra loro ed a loro volta con tutti i fermentatori mediante tubazione in acciaio inossidabile. Ogni sterilizzatore ha, ad eccezione dell'acqua calda, i medesimi servizi previsti per i fermentatori da 90 e 300 l., comandati da analogo gruppo di valvole, [PALADINO ed altri (5)].

L'agitazione del terreno di cultura durante la sterilizzazione è un fattore importante, specialmente se in esso è presente del materiale solido in sospensione, per es. Ca CO_3 . Nei due sterilizzatori dell'« impianto pilota » l'agitazione è provvisoriamente effettuata mediante gorgogliamento di aria sterile sul fondo di essi. E' in allestimento l'installazione dell'agitazione meccanica che si è dimostrata la più efficace; essa sarà ottenuta con un agitatore del tipo usato per i fermentatori, installato centralmente sulla cupola dello sterilizzatore ed alloggiato nell'apposita sede attualmente chiusa da una flangia, munita di apposita guarnizione.

La tecnica della sterilizzazione è la stessa di quella descritta per i fermentatori da 90 e 300 l. [PALADINO ed altri (5)].

g) *Valvole e tubazioni*

La distribuzione delle valvole relative ai servizi di ogni fermentatore è stata descritta dettagliatamente in un precedente lavoro [PALADINO ed altri 1954 tav. XVII] ⁽⁵⁾; essa, riprodotta nella tav. III, è applicata integralmente in ciascun fermentatore. I gruppi « standardizzati », che comandano i vari servizi, sono montati sui fermentatori in modo da essere facilmente accessibili. La distribuzione generale delle tubazioni, che collegano i vari fermentatori, è riportata nella tav. III. Tutte le tubazioni attraversate dal vapore, dalla salamoia refrigerata e dalle « culture » sono in acciaio inossidabile. Si è preferito adoperare quest'ultimo metallo anche per le tubazioni di adduzione del vapore in seguito alle esperienze fatte sull'« impianto precedente » nel quale il vapore veniva distribuito con tubazioni di ferro. L'esperienza ha dimostrato che le tubazioni di ferro non sono assolutamente adatte a causa della eccessiva formazione di ruggine che si deposita, anche durante il funzionamento dell'« impianto », nei fermentatori e nelle sedi delle valvole, mettendoli in poco tempo fuori uso.

LOCALE PER LA PREPARAZIONE DEI TERRENI DI CULTURA E PER LA STERILIZZAZIONE DEI FERMENTATORI DA 10 LITRI

In questo locale (M tav. I) sono sistemati: un banco di marmo per la preparazione dei « terreni di cultura »; un lavello in acciaio inossidabile a tre scomparti per la pulizia della vetreria; un armadio essiccatoio a circolazione di aria riscaldata elettricamente per asciugare la vetreria; uno sterilizzatore a secco di circa 500 l. ed un autoclave orizzontale di acciaio inossidabile di circa 1000 l. Quest'ultima, progettato principalmente per la sterilizzazione dei piccoli fermentatori da 10 l. unitamente al loro contenuto, è munito nel suo interno cilindrico, di rotaie sulle quali scorre uno speciale telaio nel quale sono alloggiati 8 piccoli fermentatori.

TRASFERIMENTO STERILE DEL « TERRENO DI CULTURA » DAGLI STERILIZZATORI AI FERMENTATORI

a) *Attraverso il recipiente di misura K (per es. da ST_1 a T_2 , Tav. III b).*

1) Si aumenta la pressione interna dell'aria sterile dello sterilizzatore ST_1 , portandola a circa 2 atm., manovrando opportunamente la

valvola riduttrice R (Gruppo D) dell'aria compressa e la valvola (40) (Gruppo E) dello scarico dell'aria; si controllano poi le valvole del gruppo D, tenendo presente che le (32) - (33) - (34) - (62) e (30) devono essere aperte e le (29) - (31) e (35) chiuse.

2) Si escludono i « tagli di vapore » chiudendo le valvole seguenti: (70) e (71) dello scarico di fondo dell'(ST₁); (46) e (43) dello scarico di fondo del fermentatore S₁; (54) e (55) dello scarico del misuratore K.

3) Si escludono i « tagli di vapore » esistenti sulla tubazione di travaso, che allaccia lo sterilizzatore ST₁, tramite il misuratore K, con il fermentatore T₂ e precisamente i « tagli » indicati nello schema (tav. IIIb) con numeri I, II, IV.

4) Si toglie il vapore nel misuratore K mediante la chiusura delle valvole (51) e (52) e della (53) relativa al « sigillo di sicurezza ». Chiusa la valvola (80) del « taglio di vapore », che separa l'ST₁ dall'ST₂ si apre maggiormente la (49) dello scarico di aria del misuratore K per agevolare la fuoriuscita del vapore esistente nell'intero complesso per il travaso.

5) Si approntano le tubazioni di travaso per il passaggio del contenuto dello sterilizzatore ST₁ al misuratore (K) e da quest'ultimo al fermentatore T₂; a tale scopo si aprono le valvole (73), (74), (41), (44), (58) e quelle dei « tagli di vapore » I e II del primo tratto di tubazione, che allaccia ST₁ con K e le valvole (57) e (37) del secondo tratto, che allaccia il misuratore K con T₂. Infine si stringe il cappellotto I, per la immissione di soluzioni T₂, durante la fermentazione.

6) Appena dalla saracinesca (49) non fuoriesce più vapore si può effettuare l'operazione di travaso senza attendere il raffreddamento di tutto il complesso. A tale scopo, aperta gradualmente la valvola (72) dello scarico di fondo dello sterilizzatore ST₁, s'invia il contenuto di quest'ultimo nel recipiente di misura K fino a raggiungere in esso il volume da traversare desiderato, che sarà mostrato dall'apposito indicatore elettrico (PALADINO ed altri, 1954) (5).

7) Travasato il volume di liquido desiderato nel misuratore K, si chiudono le valvole (72) e (49) e si regola il compressore D, in modo da inviare in K, attraverso la valvola (48) aria sterile fino a stabilizzare nel misuratore una pressione di 2 atm.

8) Si degrada la pressione interna del fermentatore T₂ fino a stabilizzare una pressione di circa 0,5 atm., regolando opportunamente l'apertura della valvola (40) o (62).

9) Controllate sugli appositi manometri le condizioni di pressione avanti indicate, si effettua il travaso aprendo completamente la valvola (39) del gruppo F del fermentatore T_2 .

10) Se il volume da travasare è superiore al volume del misuratore K (10 l.), si ripetono le operazioni descritte nei paragrafi 6), 7), e 9) dopo aver riportato il complesso di travaso nelle condizioni esistenti all'inizio del paragrafo 6)

11) Ultimate le operazioni di travaso, si ripristinano nel fermentatore, nel misuratore K, nello sterilizzatore ST_1 e nelle condotte di collegamento, le condizioni di lavoro esistenti prima dell'operazione di travaso ora descritta. Per la pulizia e la manutenzione dello sterilizzatore si rimanda a quanto è stato detto in merito ai fermentatori (PALADINO ed altri, 1954) (5).

b) *Trasferimento diretto (per es. da ST_1 a T_4 , tav. IIIb)*

Si precisa che il trasferimento del contenuto dello sterilizzatore ST_1 negli altri fermentatori dell'« impianto » si ottiene effettuando su ciascun fermentatore da rifornire le stesse manovre che saranno appresso descritte, per il T_4 .

1) Si stabilizza una pressione di aria sterile di circa 2 atm. nello sterilizzatore ST_1 secondo quanto già descritto in a), pgf. 1).

2) Si escludono i « tagli di vapore » dello scarico di fondo dell' ST_1 e del fermentatore T_4 chiudendo rispettivamente le valvole (70) e (71) e le (46) e (41).

3) Si escludono i « tagli di vapore » esistenti sulla tubazione di « travaso » che allaccia ST_1 con T_4 e precisamente quelli indicati nello schema (tav. III b), con il numero VII e quelli comandati dalle valvole (77), (74), (76), (79), (83) e (84) che a tale scopo vengono chiuse.

4) Si appronta la tubazione di travaso, che collega lo sterilizzatore ST_1 con il fermentatore T_4 aprendo le valvole (73) e (44).

5) Si degrada la pressione interna del fermentatore T_4 fino a stabilizzare una pressione di circa 0.5 atm., regolando opportunamente l'apertura della valvola (40) o (62).

6) Controllate le operazioni ora descritte, si apre completamente la valvola di fondo (45) del T_4 e si effettua il travaso regolando opportunamente la valvola di fondo (72) dello sterilizzatore in modo da in-

viare nel T_4 la quantità di liquido voluta. Essa è rilevabile, dall'aumento del livello del liquido nel T_4 , che man mano coprirà le piastrine di riferimento, saldate alla parete interna del fermentatore. Ultimato il travaso, si ripristinano nel fermentatore T_4 , nello sterilizzatore ST_1 e nelle condotte di collegamento le condizioni di lavoro esistenti prima dell'operazione descritta.

TRASFERIMENTO STERILE DEL CONTENUTO DI UN FERMENTATORE IN UN ALTRO QUALUNQUE DELL'IMPIANTO

Esempio: da T_4 a T_2 (tav. IIIb).

Tutti i fermentatori dell'impianto pilota sono collegati con una tubazione di acciaio inossidabile per rendere possibile il « trasferimento sterile » del contenuto da uno all'altro di essi; tale operazione nel caso dell'esempio riportato sopra, si effettua nel modo seguente:

1) Si stabilizza una pressione di aria sterile di circa 2 atm. nell'interno del fermentatore T_4 e si effettuano poi le manovre descritte nei capitoli precedenti al paragrafo (1) per lo sterilizzatore ST_1 .

2) Si eliminano i « tagli di vapore » degli scarichi di fondo del T_4 e del T_2 , chiudendo le valvole (46) e (41) e quelli del tratto di tubatura di collegamento fra T_4 e T_2 e precisamente i tagli di vapore indicati nello schema della tav. IIIb con i numeri V, VI, VII e VIII VIII.

3) Si chiudono le valvole (81) ed (83) in modo da isolare le tubazioni di collegamento con gli sterilizzatori ST_1 e ST_2 .

4) Si degrada la pressione interna del fermentatore T_2 , operando nel modo già descritto ed infine si effettua il trasferimento aprendo la valvola (45) dello scarico di fondo del T_4 e regolando il passaggio del liquido nel T_2 per mezzo della sua valvola di fondo (45). Il volume da attraversare nel T_2 viene controllato mediante le anzidette piastrine di riferimento, saldate sulla parete interna di ogni fermentatore.

5) Effettuato il travaso, si ripristinano le condizioni di lavoro, antecedenti all'operazione ora descritta.

SERVIZI

L'impianto pilota è dotato dei seguenti servizi:

1) vapore, 2) acqua fredda, 3) acqua calda, 4) aria compressa, 5) salamoia refrigerata, 6) gas, 7) energia elettrica.

1) *Vapore*

La tav. IV illustra l'impianto per la produzione e per la distribuzione del vapore occorrente alle varie necessità dell'« impianto pilota »; nello stesso schema sono riportate anche le caratteristiche dei generatori di « vapore saturo », che viene distribuito agli utilizzatori ad una pressione di 3 atm. I generatori di vapore sono due; uno a nafta e l'altro a riscaldamento elettrico; il primo, a funzionamento continuo, provvede all'alimentazione dei « sigilli di vapore » di tutti i fermentatori e all'alimentazione dei vari sterilizzatori esistenti nell'« impianto pilota », mentre il secondo entra in parallelo con il primo allorché è necessario sterilizzare contemporaneamente parecchi fermentatori ed i « terreni di cultura » in essi contenuti. In casi di emergenza il generatore di vapore a riscaldamento elettrico può sostituire ottimamente la caldaia a nafta e garantire in tal modo la continuità del lavoro. Con tutti i fermentatori in funzione, il consumo di vapore, fornito ad una pressione di 3 atm., si aggira attorno a 130 Kg/h. La disponibilità di vapore consente di sterilizzare comodamente, entro 30-40 minuti, l. 400 di « terreno di cultura » comunque distribuito nei fermentatori; di solito si preferisce sterilizzare contemporaneamente o due fermentatori da 300 litri, contenenti ciascuno 200 litri di « terreno di cultura » oppure un gruppo di quattro fermentatori da 90 litri, contenenti ciascuno 50 litri di « terreno di cultura ».

I piccoli fermentatori da 10 litri, in acciaio inossidabile raggruppati in numero di 8 unità, in uno speciale telaio vengono sterilizzati contemporaneamente nell'apposita autoclave installata nella camera destinata alla preparazione dei « terreni di cultura » (M tav. I). Per effettuare tale sterilizzazione, il consumo di vapore, fornito sempre a 3 atm., è di circa 150 Kg. partendo con autoclave fredda, mentre è di circa 40 Kg. allorché si trova già in una temperatura di circa 80°C.

2) *Acqua fredda*

La temperatura dell'acqua disponibile nell'« impianto pilota » oscilla fra i 13° ed i 18°C. a seconda della stagione. Il consumo è di due tipi: uno « continuo », necessario per l'alimentazione dei generatori di vapore e per la termoregolazione dei fermentatori ed uno « discontinuo », necessario per la preparazione dei terreni di cultura e della salamoia, per il raffreddamento dei compressori generatori di freddo e dei fermentatori dopo la sterilizzazione ed infine per le operazioni di lavaggio e pulizie varie. Il raffreddamento dei compressori di aria viene effettuato mediante acqua distillata che circola in circuito chiuso. La temperatura nella

sala di fermentazione oscilla, normalmente, fra i 30 e 35°C. Il consumo massimo di acqua, per tutte le esigenze dell'« impianto pilota » raggiunge i 3 m³/h durante la stagione più calda, mentre diminuisce del 10% nella stagione invernale.

3) *Acqua calda*

Essa viene prodotta utilizzando, in appositi scambiatori di calore, il vapore degradato dell'« impianto pilota »; a seconda delle condizioni di lavoro si ha a disposizione acqua calda ad una temperatura che oscilla fra i 40 e 70°C. L'« acqua calda » viene utilizzata nell'« impianto pilota » per la termoregolazione dei fermentatori ad una temperatura superiore ai 28°C. e per le operazioni di pulizia.

4) *Aria compressa.*

L'impianto di aria compressa è alimentato da due compressori alternativi, raffreddati ad acqua, capaci ognuno di erogare 1000 l/m. a 3 atm.; tale erogazione corrisponde largamente al fabbisogno di aria compressa di tutto l'« impianto pilota ». Il funzionamento dei due compressori, collegati in parallelo, è alternato in modo che ogni compressore non lavori più di 48 ore consecutive. Il circuito dell'aria compressa è riportato nello schema della tav. VI.

5) *Salamoia refrigerata*

Essa è adoperata per il blocco enzimatico delle fermentazioni e per le operazioni di concentrazione e di estrazione, per le quali la temperatura dei liquidi deve essere portata a circa 2°C. Il volume di salamoia refrigerata è di circa 1000 l. con una disponibilità di circa 10.000 frig./ora. Il circuito della salamoia è riportato nello schema della tav. VII.

6) *Gas illuminante*

Ogni coppia di fermentatori è dotata di una presa per il gas alla quale, mediante « attacco rapido » si innesta un tubo di gomma che porta un « Bunsen » necessario al « flambamento » della uscita dei dispositivi della « presa di campione » e degli innesti dei recipienti che contengono le soluzioni sterili da aggiungere ai fermentatori. Il consumo medio giornaliero di gas illuminante è di circa 2 m³.

7) *Energia elettrica*

a) *Usi industriali*

Nei vari locali dell'impianto sono disponibili derivazioni trifase a 225 V., bifase a 225 V. e monofase a 125 V., tutte a 50 Hz.

Una linea trifase a 225 V., da 1000 Amp. alimenta i compressori d'aria, i compressori per il freddo, la caldaia per la produzione di vapore a riscaldamento elettrico e una saldatrice. Quest'ultima è di grande importanza in un « impianto pilota » perchè indispensabile alle riparazioni e alle frequenti modifiche da apportare all'impianto.

b) *Illuminazione*

L'illuminazione dei vari locali dell'« impianto pilota » è effettuata con corrente monofase a 125 V., 50 Hz, mentre l'illuminazione dell'interno dei fermentatori è effettuata per motivi di sicurezza, con linea a bassa tensione, 24 V., sempre a 50 Hz.

Il consumo totale dell'energia elettrica per gli usi industriali e per l'illuminazione, escluso quello del generatore di vapore, si aggira sui 30 Kw/h.

SEZIONE DI FILTRAZIONE ED ESTRAZIONE

In questa sezione, dotata dei medesimi servizi a disposizione di quella di fermentazione, avvengono le elaborazioni delle culture ottenute nei vari fermentatori. Il complesso delle tubazioni di adduzione e di recupero dei « servizi » è sostenuto da mensole infisse in prossimità del soffitto e si sviluppa lungo l'intero perimetro del locale; ad intervalli di due metri sono installate derivazioni comandate da valvole munite di « attacco rapido » per l'innesto di idonee tubazioni di gomma con le quali si alimentano le varie apparecchiature. Questa sala è dotata: di vari tipi di filtri per l'eliminazione dei miceli delle muffe tra i quali un filtro « Sparker », un « filtro pressa », un « filtro a sacco » e uno « rotativo » di piccole dimensioni in acciaio inossidabile, del tipo « Bird-Jong »; di due centrifughe « Sharples » per la raccolta dei batteri ed infine di un piccolo estrattore di contro-corrente, tipo « Popp », della « Podbielniak », munito di pompe di alimentazione, per l'estrazione con solventi organici. Completano l'attrezzatura di questo reparto numerosi recipienti di acciaio inossidabile della capacità di 25, 50, 200 e 500 litri muniti di camicia, per la circolazione della salamoia refrigerata o del vapore in modo da poter portare i liquidi contenuti nei recipienti a temperature comprese fra i 2 e 100°C.

Le culture della sala di fermentazione arrivano nei filtri o nei vari recipienti per mezzo di pompaggio o per pressione di aria.

Tutti gli impianti elettrici, compresi i motori, sono del tipo « anti-deflagrante ».

IMPIANTO RECUPERO SOLVENTI

Questo impianto (fig. 4) completamente in acciaio inossidabile, è composto dalle consuete attrezzature degli impianti di distillazione e serve per il recupero, la rettifica e la distillazione sotto vuoto dei solventi organici, in quantitativi semi-industriali. La capacità della caldaia è di 80 l. e la colonna di frazionamento ha 28 piatti teorici. Nello stesso locale è in corso il montaggio di un « climbing film concentrator » per le soluzioni acquose.

ORGANIZZAZIONE DEL PERSONALE

Come è stato accennato, condizione essenziale di un funzionamento altamente produttivo dell'« impianto pilota » è l'organizzazione efficiente dei servizi.

Il personale dell'impianto è costituito da operai specializzati (meccanici, elettricisti, tubisti) divisi in tre turni di 8 ore ciascuno, in modo da assicurare il lavoro continuo dell'impianto. Ogni turno è composto da una squadra costituita da tre operai alle dipendenze di un capo-squadra; detta squadra è praticamente sufficiente al normale lavoro di controllo dell'impianto con tutti i fermentatori in lavorazione. E' necessario avere a disposizione, almeno per i due turni di giorno, il personale per la preparazione dei « terreni di cultura », per il lavaggio della vetreria e per le pulizie generali.

Per la maggior parte degli studi sul metabolismo dei microrganismi occorre effettuare, durante la fermentazione e ad intervalli regolari, varie analisi chimiche e biologiche della cultura. E' pertanto indispensabile che i ricercatori abbiano a disposizione un reparto analitico, per gli esami chimico-microbiologici, perfettamente funzionante ed efficiente, costituito da un numero di analisti adeguato alle analisi da effettuare.

E' da tenere presente che un tecnico non può eseguire a regola d'arte, più di 20 o 30 normali analisi chimiche in doppio, di ogni variabile dei costituenti i terreni di cultura (zuccheri, azoto, ecc.). Cioè, se in un ciclo di fermentazioni si debbono prelevare da ciascun fermentatore dei campioni 2 volte al giorno, un solo tecnico potrebbe assolvere al compito delle analisi, relative ad una variabile (per es. zuccheri) in non più di 15 fermentatori. Questo nel caso che le fermentazioni si

susseguano senza sosta fra una fermentazione e l'altra e allorchè a causa della loro instabilità è impossibile accumulare i campioni prelevati.

Nei riguardi dei controlli biologici degli antibiotici, mediante i sistemi di diffusione, si deve tener conto che un tecnico non può effettuare più di 48 al giorno.

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