

108. D. GHOSH e S. J. PIRT. — **Preparati antischiuma nelle fermentazioni aerobiche. Valutazione dell'attività dei preparati antischiuma.**

**Riassunto.** — 1) Si descrive un semplice metodo di laboratorio per valutare qualitativamente e quantitativamente l'attività di agenti che inibiscono la formazione di schiuma in terreni culturali contenenti corn steep-lattosio, aerati con il sistema vortice (agitazione libera).

2) I preparati antischiuma per la fermentazione consistono ordinariamente in un agente antischiuma disperso in un veicolo. Si è dimostrata l'importanza di una buona dispersione dell'agente antischiuma.

3) Si è trovato che la rapidità della soppressione della schiuma e la durata dell'azione di un agente antischiuma dipendono molto dalla natura del veicolo.

4) Sono state studiate le attività dei vari preparati antischiuma contenenti Alkaterge C, Siotol AF, antischiuma silicone A, ottadecanolo, olio di vinaccioli e olio di lardo. Si sono stabilite le concentrazioni adatte per un efficace controllo della formazione di schiuma per un periodo di almeno 6 ore in un terreno di corn steep agitato sia con il sistema vortice che con quello ad antivortici.

5) Si sono discusse le differenze fra il sistema di aerazione ad antivortici e quello ad agitazione libera dal punto di vista della inibizione della schiuma.

**Résumé.** — 1) Les auteurs décrivent une méthode simple de laboratoire pour l'estimation qualitative et quantitative des activités d'agents anti-mousse; les expériences ont été faites en milieux lactosés et additionnés de corn steep en présence du système vortex d'agitation (aération par agitation libre).

2) Les préparations d'agents anti-mousse destinées aux fermentations consistent en agents anti-mousse dispersés sur un support. On a démontré l'importance d'une bonne dispersion de l'agent anti-mousse.

3) On a constaté que la vitesse de suppression de la mousse et la durée de l'efficacité de l'agent anti-mousse dépendent en large mesure de la nature du support.

4) On a étudié divers agents: l'Alkaterge C, le Siotol AF, la Silicone anti-mousse A, l'octodécanol, l'huile de pépins de raisin et l'huile de lard.

On a déterminé les concentrations efficaces au contrôle de la formation de mousse, valables pour une période de 6 heures au moins, sur un terrain de corn steep tant en présence d'agitation libre (vortex) qu'en système turbulent (panneaux de turbulence).

5) On discute les différences du point de vue de l'inhibition de la formation de mousse, entre le système vortex et le système à panneaux de turbulence.

**Summary.** — 1) A simple laboratory method for evaluating qualitatively and quantitatively the activities of antifoam agents has been described, using the vortex system (aeration by free agitation) with corn steep lactose medium as the foaming liquid.

2) Antifoam preparations for fermentation usually consist of an antifoam agent dispersed in a carrier. The importance of good dispersion of the antifoam agent has been shown.

3 The speed of foam suppression and duration of action of antifoam have been found to be influenced greatly by the nature of the carrier.

4) The activities of various antifoam preparations containing Alkaterge C, Siotol AF, silicone Antifoam A, octadecanol, grape seed oil and lard oil, have been studied. Suitable concentrations of these preparations have been established for an effective control of foaming in corn steep medium for a period of at least 6 hours in both baffled and vortex systems of aeration and agitation.

5) The differences between the baffled and free agitation systems of aeration from the point of view of foam inhibition have been discussed.

**Zusammenfassung.** — 1) Eine einfache Laboratoriumsmethode für die qualitative und quantitative Auswertung von Antischaummitteln wird beschrieben, in der als Belüftungsmethode das Vortexsystem und als schaubildene Flüssigkeit das gewöhnlich für die Penicillinproduktion benutzte Cornsteep-Laktosemedium verwendet wird.

2) Antischaummittel bestehen im allgemeinen aus einem Antischaumwirkstoff und einer Trägerlösung. Die Bedeutung einer guten Dispersion des Antischaummittels in der schäumenden Flüssigkeit für seine Antischaumwirksamkeit wird gezeigt.

3) Die Geschwindigkeit und Dauer der Antischaumwirkung ist weitgehend von der Natur der Trägerlösung abhängig.

4) Die relative Wirksamkeit verschiedener Antischaummittel wie Alkaterge, Siotol A F, Silicone Antifoam A, Octadecanol, Traubensameoil und Specköl, wird untersucht. Die Konzentrationen, in denen diese Antischaummittel ihre Antischaumwirkung zum mindesten 6 Stunden lang in Cornsteep-Laktose-Kulturflüssigkeit bei Belüftung durch das Vortexsystem und durch Luftverteiler ausüben, werden bestimmt.

5) Die Unterschiede zwischen Vortex- und Luftverteilerbelüftung vom Standpunkte der Schaumverhinderung werden erörtert.

---

### INTRODUZIONE

Nei processi di fermentazione aerobica, particolarmente qualora si impieghi un grado rilevante di agitazione ed aerazione, è della più grande importanza un adeguato controllo della produzione di schiuma. Una eccessiva produzione di questa può infatti causare, sia (a) una fuoriuscita della cultura attraverso la camera di tenuta dell'asse dell'elica, ovvero attraverso i filtri, con conseguente contaminazione; sia (b) un trasporto di buona parte della massa dei microorganismi dalla fase liquida alla schiuma sovrastante e loro deposizione sulle pareti del recipiente al di sopra del livello liquido; sia infine, ma non per questo di secondaria importanza, (c) una riduzione della efficacia della aerazione (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>).

Nella produzione industriale di antibiotici come la penicillina, implicate processi di fermentazione aerobica, vengono comunemente impiegati per inibire la formazione di schiuma, vari preparati quali l'Alkaterge C e l'ottadecanolo assieme ad olii animali, vegetali o minerali usati come veicoli. La procedura usuale consiste nell'aggiungere alla cultura una quantità, determinata in modo del tutto empirico, di questi preparati, con operazioni manuali, ad intervalli regolari, ovvero con mezzi automatici.

Per quanto riguarda il controllo della schiuma, tali metodi sono in genere considerati efficienti fin quando questa non si sollevi tanto da derivarne minaccia di contaminazione per effusione al di fuori della camera di tenuta od altre possibili uscite.

Fino ad oggi, non risulta siano disponibili dei dati sistematici per

---

(<sup>1</sup>) CHAIN E. B., PALADINO S., CALLOW D. S., UGOLINI F. e VAN DER SLUIS J. - Bull. World Hlth. Org. 6, 73 (1952).

(<sup>2</sup>) CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17, 1109 (1954).

quanto riguarda l'azione qualitativa e quantitativa dei preparati chimici antischiama, specie poi per quanto concerne il grado di inibizione della schiuma per tutto il periodo della fermentazione.

Per studiare questo problema è stato di somma importanza il provvedersi di un metodo capace di misurare il potere inibitore sulla produzione di schiuma dei vari preparati esaminati, il tutto, per quanto possibile, in condizioni simili a quelle del sistema di fermentazione adoperato. In questo lavoro viene descritto un semplice metodo di laboratorio adatto a questo scopo. Con le necessarie modifiche dipendenti dalla natura del mezzo, e dalle condizioni di agitazione ed aerazione, tale procedimento può essere applicato a qualsiasi altro tipo di fermentazione aerobica.

#### MATERIALI E METODI

##### MATERIALI.

Il liquido produttore di schiuma consisteva in una soluzione acquosa di corn-steep (3,5% circa) e lattosio (3%), portata a pH 7 con idrato di sodio. Le sostanze usate come preparati antischiama, furono le seguenti: Alkaterge C (Commercial Solvents Corp. U. S. A.), Siotol AF (Imperial Chemical Industries, England), Antischiama Silicone A (Dow Chemicals, U. S. A.), ottadecanolo, olio di vinaccioli, olio di lardo, paraffina (bianca medicinale purissima) ed etere di petrolio (P. E. oltre 120°C).

##### SISTEMA A VORTICE.

a) *Apparecchiatura.* — Furono usati e paragonati due diversi sistemi di aerazione produttori schiuma; (i) ad agitazione libera o sistema a vortice, in cui la aerazione viene effettuata senza un distributore d'aria, ma aspirando l'aria nella soluzione per mezzo di un'elica rotante ad alto numero di giri e (ii) un sistema agitatore ad antivortici con distributore d'aria (CHAIN e coll., 1952; CHAIN e GUALANDI, 1954). Il sistema ad agitazione libera, che si può osservare nella fotografia 1, consisteva in un recipiente cilindrico trasparente A di 18 cm di  $\phi$  della capacità di circa 10 litri. Esso era munito di un'elica B mossa da un motore (turbina a disco ad 8 lame,  $\phi$  75 mm, altezza di ogni lama 15 mm). Il recipiente era graduato in cm (quello mostrato nella figura ha dimensioni leggermente diverse di quello usato in realtà per gli esperimenti). Il motore C era provvisto di un tachimetro D per indicare l'andamento dell'agitazione, che era a sua volta controllata da un trasformatore Variac E.

b) *Determinazione della minima quantità di preparato necessario a prevenire la formazione di schiuma.* — Cinque litri del mezzo produttore di schiuma vennero versati nel recipiente e sottoposti ad un agitazione di 900 giri al minuto. Il liquido produsse schiuma molto rapidamente ed il livello di questa raggiunse quasi subito un punto massimo che poi tale restava per ore qualora non venisse aggiunto un preparato antischiama. Il potere schiumante della soluzione risultava proporzionale all'altezza raggiunta dal liquido agitato ovvero dallo strato di schiuma con liquido a riposo (Fotografie 2 e 3). La massima altezza raggiunta, e cioè la capacità schiumante del liquido, variava, di un certo grado, da un campione all'altro di corn steep. Non appena veniva raggiunto il livello massimo e cioè la condizione di massimo schiumeggiamento (in 10-15 minuti circa), ne veniva notata l'altezza. Con l'aggiunta di un agente antischiama, tale livello calava bruscamente e col raggiungimento del completo controllo sulla produzione della schiuma, l'altezza del liquido, praticamente, veniva ad essere pari a quella ottenuta con la sola acqua, naturalmente nelle identiche condizioni di agitazione ed aerazione. Nella figura 1 viene mostrata una tipica determinazione della quantità minima di un agente antischiama, come per esempio, l'Alkaterge C, richiesta per inibire la formazione della schiuma. La linea tratteggiata (curva B) sottostante, indica l'altezza del liquido schiumante a riposo, altezza determinata bloccando l'agitazione momentaneamente e leggendo il livello della schiuma dopo 20 secondi da che il liquido si era fermato. Tale livello, a causa dell'assenza di movimento, poteva essere letto ben più precisamente che non quello del liquido schiumeggiante durante l'agitazione (curva A). Ad ogni modo le due curve hanno un andamento praticamente parallelo e pertanto ciascuna delle due può essere usata per la valutazione dell'attività antischiama.

c) *Durata dell'azione antischiama.* — Per considerazioni di ordine pratico risultava necessario determinare non solo l'ammontare minimo di un agente antischiama capace di effettuare la completa inibizione della schiuma stessa, ma anche l'ammontare minimo di questo, capace di mantenere tale inibizione per un sufficiente periodo di tempo (almeno 6-8 ore). Pertanto, una volta soppressa completamente la schiuma, si continuava l'agitazione per almeno 6 ore, eseguendo ulteriori aggiunte dell'agente antischiama se il sistema iniziava a schiumeggiare nuovamente (vedi fig. 4). Veniva allora segnata la quantità totale di sostanza antischiama richiesta e si ripeteva l'esperimento aggiungendo questa quantità tutta in una volta e all'inizio, e si controllava la durata dell'inibizione per almeno 6 ore. L'ammontare di un agente antischiama così

determinato veniva considerato come la quantità minima raccomandabile per una completa soppressione della formazione di schiuma per almeno 6 ore, alle specificate condizioni di aerazione, agitazione e composizione del mezzo.

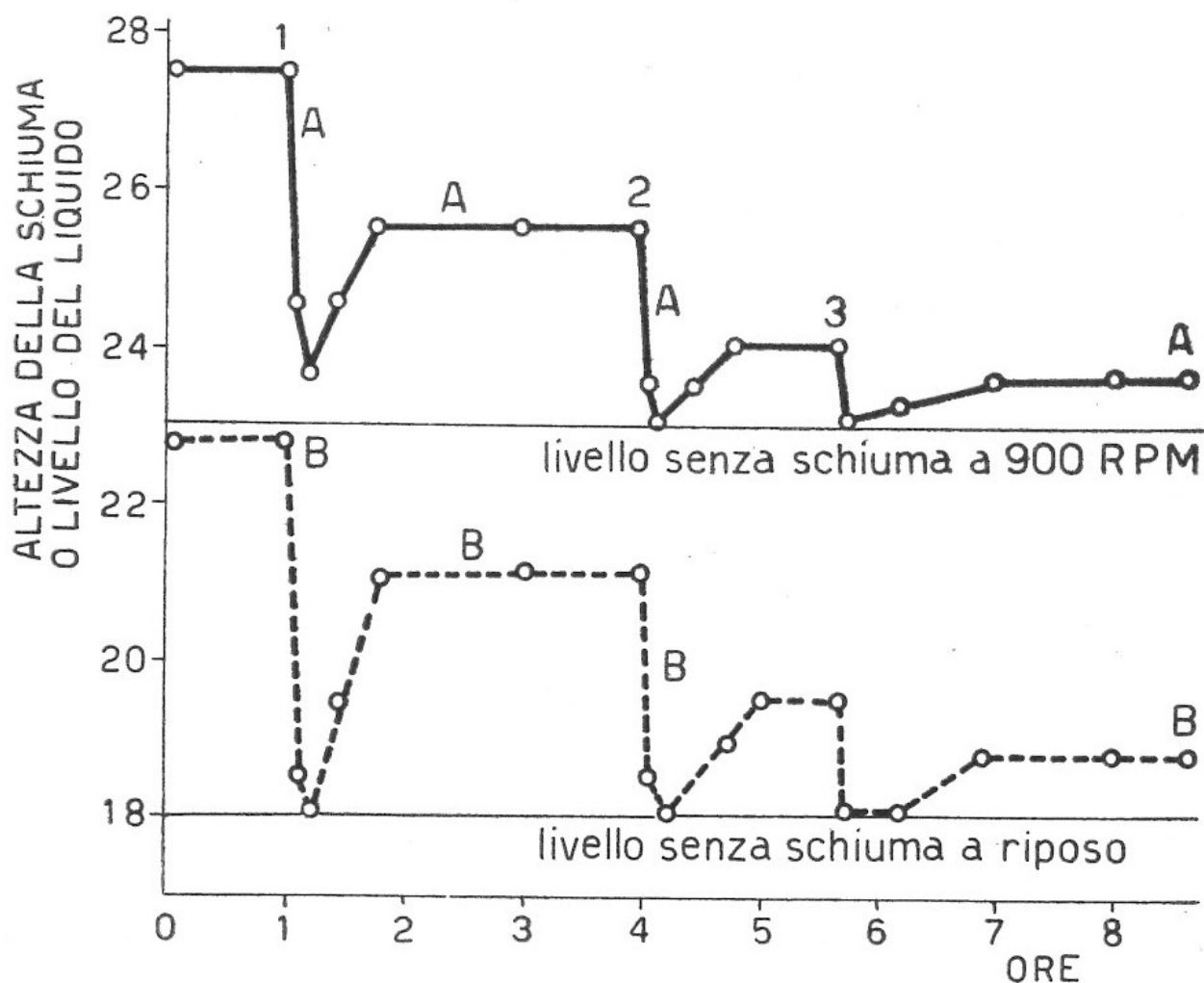


Fig. 1. - Inibizione della schiuma per mezzo di graduali quantità di Alkaterge C (determinazione della minima quantità di antischiama per la completa soppressione della schiuma). Aerazione e agitazione; sistema a vortice: 900 RPM (giri al minuto. Liquido schiumeggiante: sol. di corn steep (pH 7), 5 litri. Aggiunta dell'Alkaterge C (una volta raggiunta la massima produzione di schiuma): alla posizione 1, 0,1 ml; alla posizione 2, 0,2 ml; alla posizione 3, 0,2 ml:

A = livello del liquido schiumeggiante registrato durante l'agitazione.

B = livello della schiuma con liquido a riposo (dopo aver fermato momentaneamente l'agitazione).

d) *Determinazione della rapidità d'azione del potere antischiama.* — La velocità con la quale veniva soppressa la produzione della schiuma veniva determinata nel sistema a vortice, rilevando l'altezza del livello liquido nel tempo, dopo l'aggiunta del preparato antischiama. A scopo

comparativo, per produrre la schiuma veniva usato lo stesso campione di materiale.

#### SISTEMA AD ANTIVORTICI

E' stato studiato il comportamento dei più comuni preparati antischiama anche nel sistema ad antivortice (Fotografia 4), avendo pertanto messo nello interno del recipiente cilindrico, 4 lamine antivortice F (altezza 20,5 cm larghezza 1,5 cm) egualmente distanziate ed inviando l'aria attraverso un distributore di aria G in vetro con un unico orifizio. Il volume di aria filtrante attraverso il mezzo schiumeggiante per minuto, era regolato con un misuratore di flusso H. Veniva usata una velocità di agitazione di 500 g.p.m. con 0,5 vol. d'aria/minuto; ciò bastava a fornire all'incirca lo stesso grado di diffusione di ossigeno nel liquido pari a quello ottenuto con la velocità di 900 g.p.m. nel sistema a vortice (CHAIN e GUALANDI, 1954). La stessa quantità minima di un preparato antischiama, determinata precedentemente nel sistema a vortice, veniva usata per determinare la durata della inibizione della schiuma nel sistema ad antivortice, naturalmente a paragonabili velocità di diffusione dell'ossigeno. Venivano eseguite ulteriori aggiunte se il sistema riprendeva a schiumeggiare entro le 6 ore. Come per la precedente esperienza, tale durata veniva confermata se necessario, con un secondo esperimento.

#### RISULTATI

##### EFFETTO DEI VEICOLI OLEOSI.

a) *Effetti potenziatori o inibitori dei veicoli.* — I preparati antischiama sono in genere, prima dell'uso, diluiti con qualche olio. E' stato visto che il diluente oleoso possedeva una notevole influenza sull'attività del preparato. Lo stesso olio di paraffina, di per sè privo di qualsiasi azione antischiama, aveva un effetto marcatamente sinergico sull'attività dell'Alkaterge C. Ciò è chiaramente dimostrato nella figura 2, dove si può osservare che l'aggiunta di paraffina prolunga l'azione dell'Alkaterge. L'olio di paraffina non solo prolunga l'effetto di una data quantità di Alkaterge, ma inoltre aumenta molto la velocità d'azione dell'antischiama. Effetto contrario fu osservato invece, usando come diluente l'olio di vinaccioli. Questi effetti potenziatori o inibitori che rispettivamente possiedono l'olio di paraffina e l'olio di vinaccioli sull'azione antischiama dell'Alkaterge C, risultano evidenti dagli esperimenti ripor-

tati in grafico nelle figg. 3 e 4. Con l'uso del sistema a vortice (fig. 3) non appena il livello del liquido schiumeggiante raggiungeva la massima altezza (33 cm) venivano aggiunte, rispettivamente a 0, 2, e 5 minuti, identiche quantità di Alkaterge solo e di Alkaterge al 50% in olio di paraffina ed in olio di vinaccioli. Laddove l'Alkaterge disperso in paraffina dimostrava un'azione pressochè immediata, effettuando una completa inibizione della schiuma in 5 minuti, identiche quantità di Alkaterge in olio di vinaccioli, erano prive di qualsiasi attività nei primi 5 minuti, mentre oltre 20 minuti dovevano passare prima della completa soppressione del-

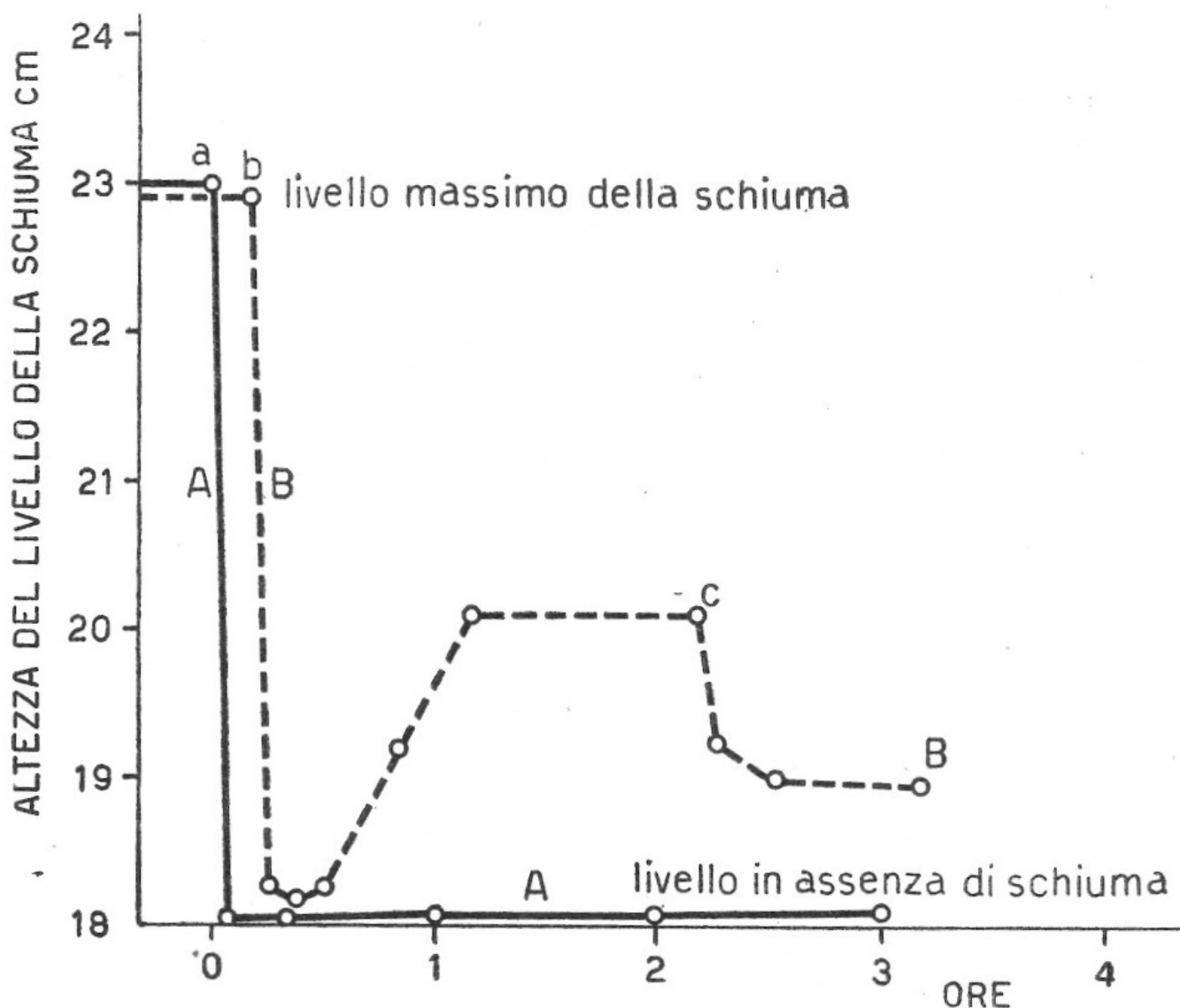
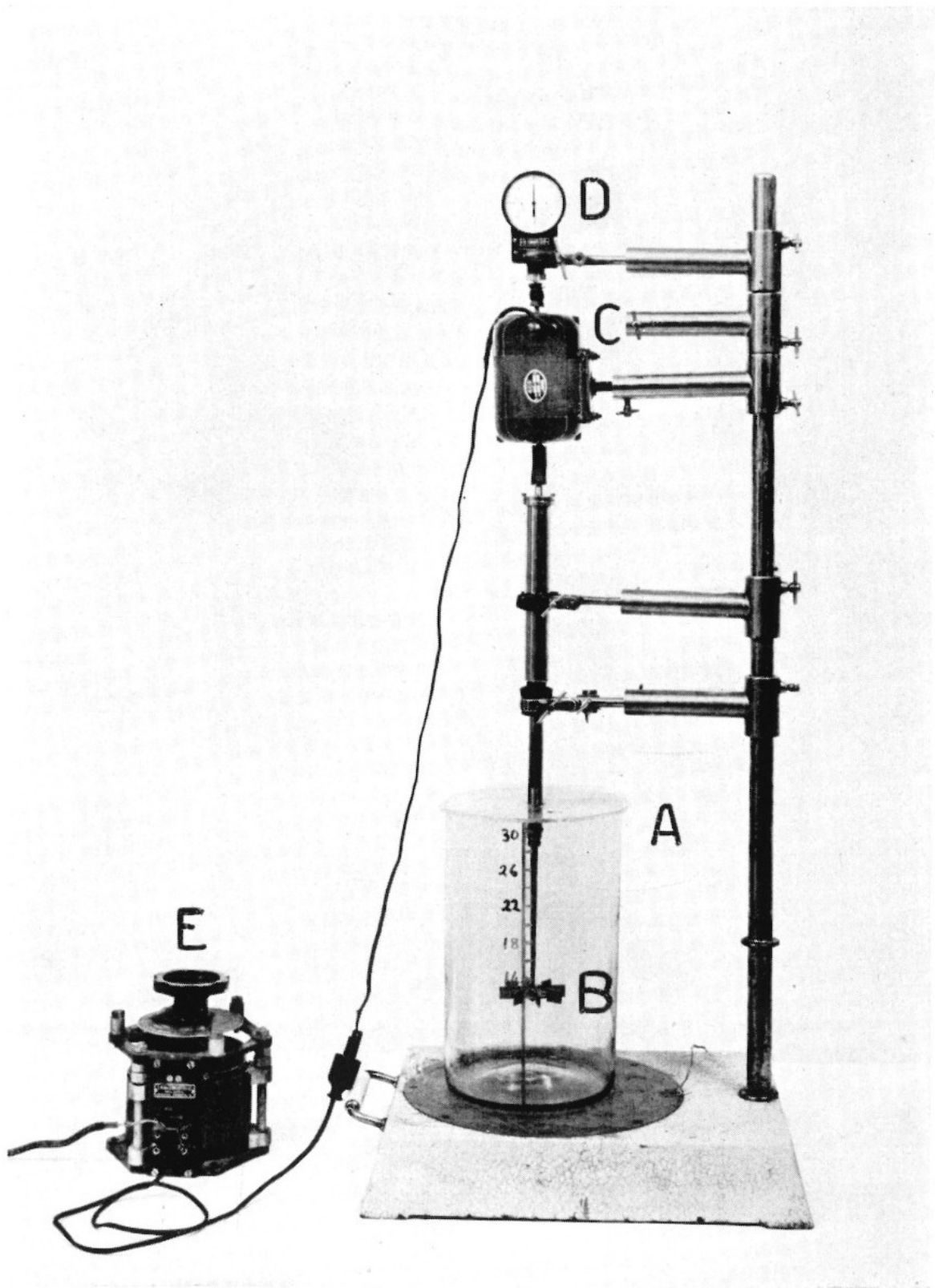


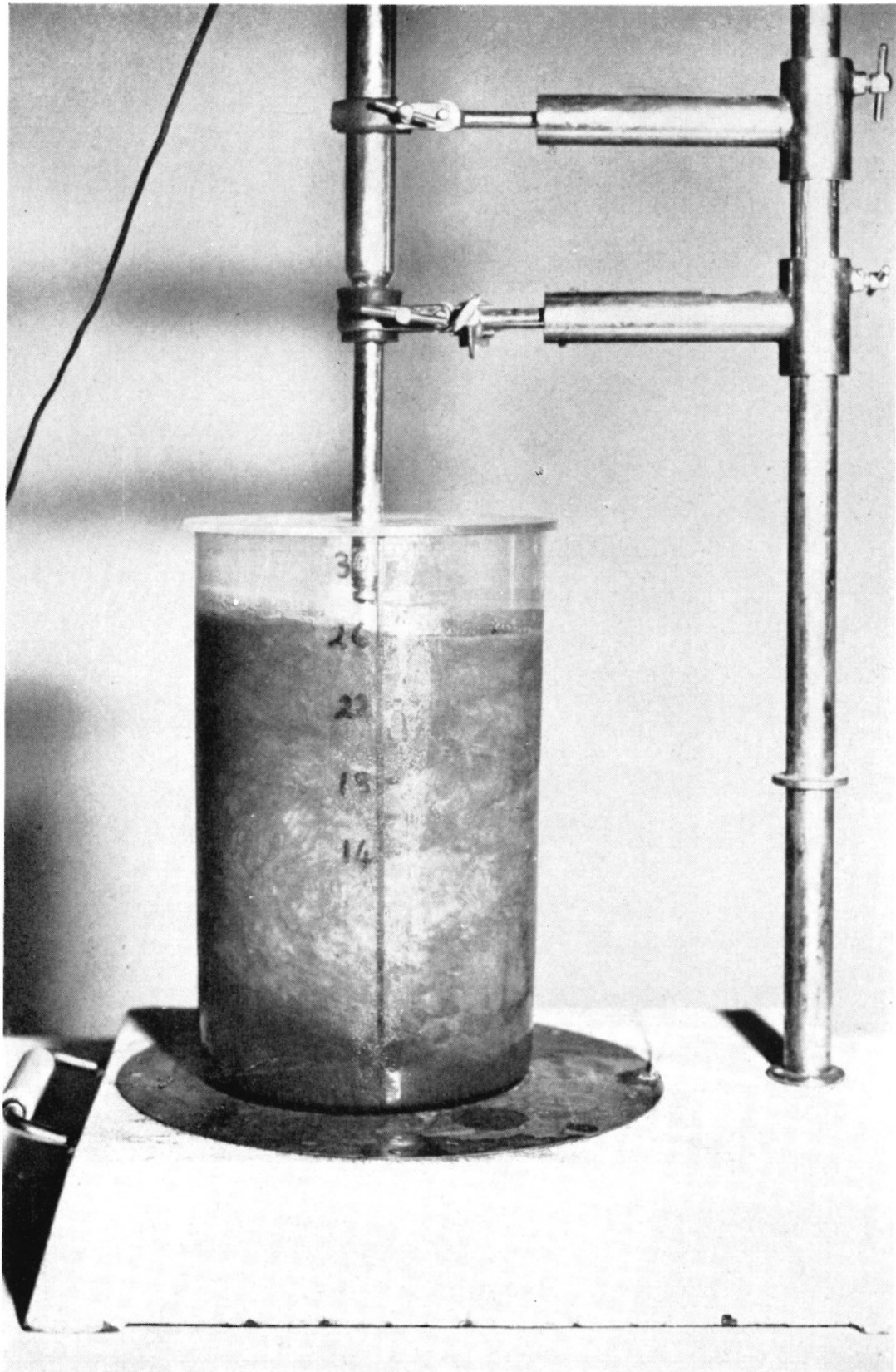
Fig. 2. - Effetto dell'olio di paraffina sul potere antischiuma dell'Alkaterge C. Aerazione ed agitazione: sistema a vortice, 900 giri al minuto. Liquido schiumeggiante terreno al corn steep (pH 7), 5 litri. I livelli della schiuma venivano registrati al momento in cui il liquido si fermava (20 secondi circa) dopo aver sospeso momentaneamente l'agitazione:

A = livello con 0,2 ml di Alkaterge + 1 ml di olio di paraffina aggiunto al punto a;  
 B = livello con 0,2 ml Alkaterge aggiunti al punto b e 1 ml di olio di paraffina al punto c.

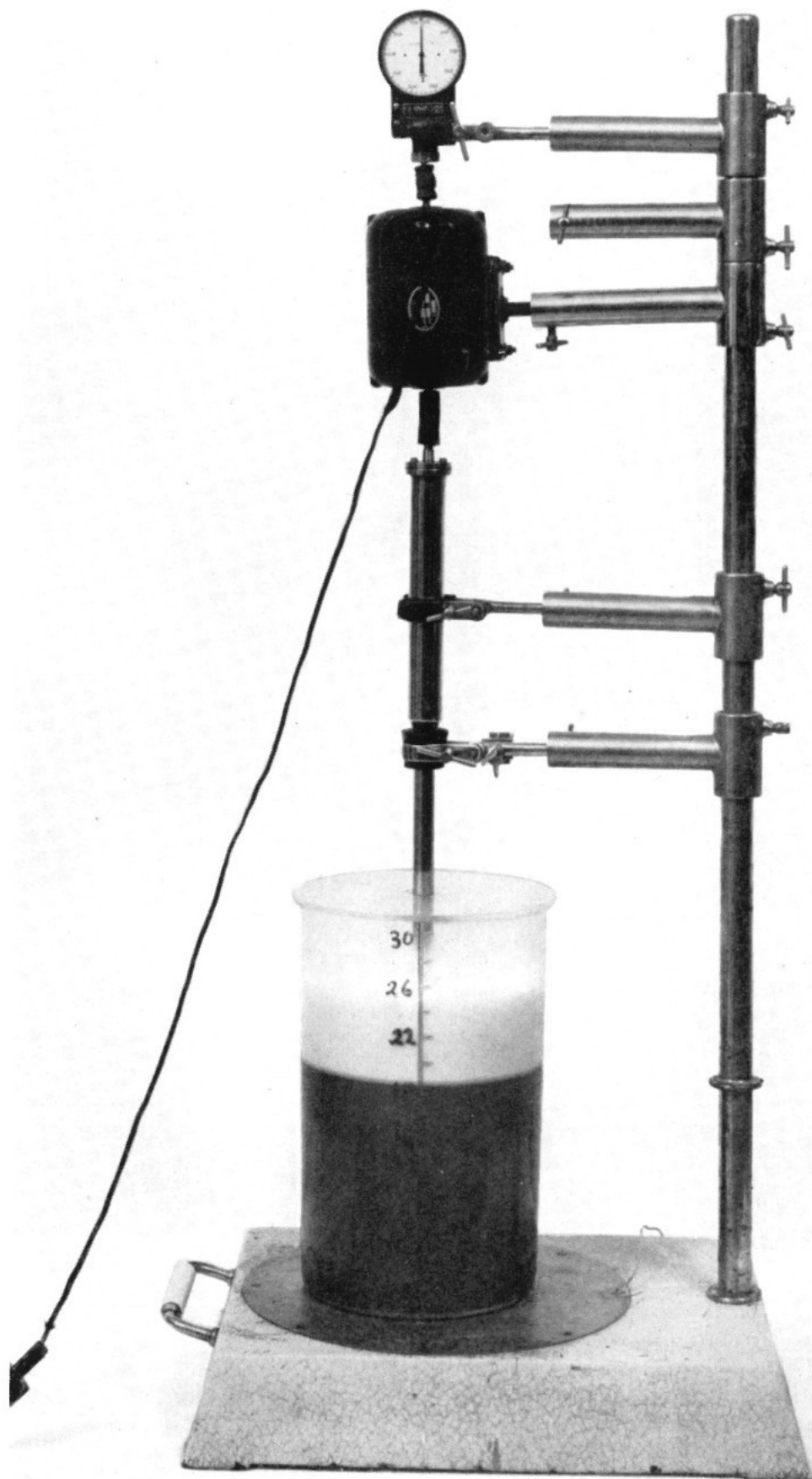
Le aggiunte vennero iniziate dopo che il livello della schiuma aveva raggiunto la massima altezza.



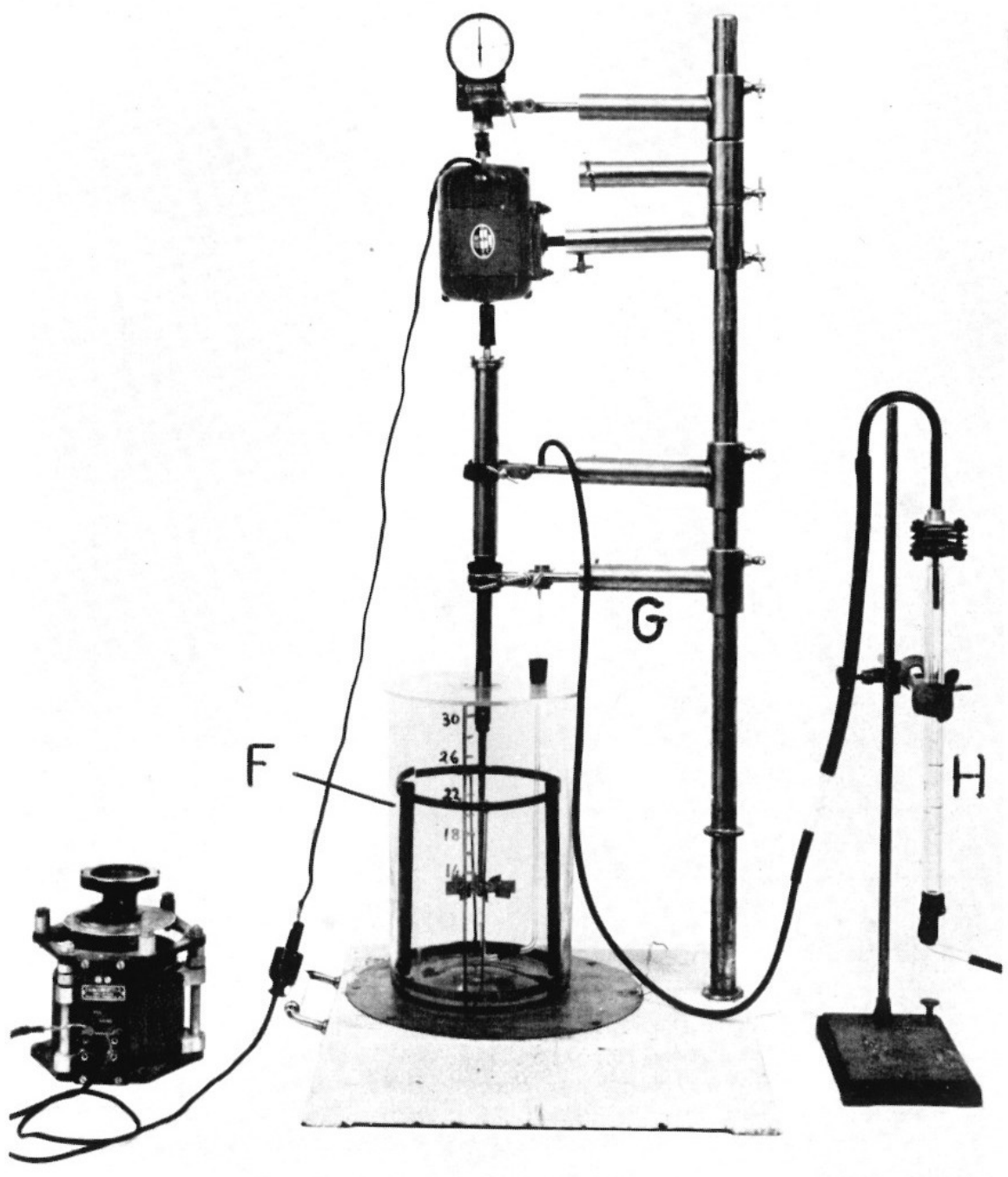
Fot. 1. - Apparecchio con aerazione ad agitazione libera (sistema a vortice) per valutare le attività di preparati antischiuma.



Fot. 2. - Liquido produttore di schiuma durante l'agitazione nel sistema a vortice.



Fot. 3. - Liquido produttore di schiuma nel sistema a vortice appena interrotta l'agitazione: è visibile lo strato di schiuma soprastante.



Fot. 4. - Apparecchio con sistema ad antivortici per valutare le attività di preparati antischiuma.

la schiuma. L'Alkaterge da solo come prevedibile, dimostrò un'azione intermedia in quanto a velocità d'azione.

Anche l'olio di vinaccioli, da solo, agiva molto lentamente come antischiuma. Usato come agente antischiuma nel sistema a vortice, alla

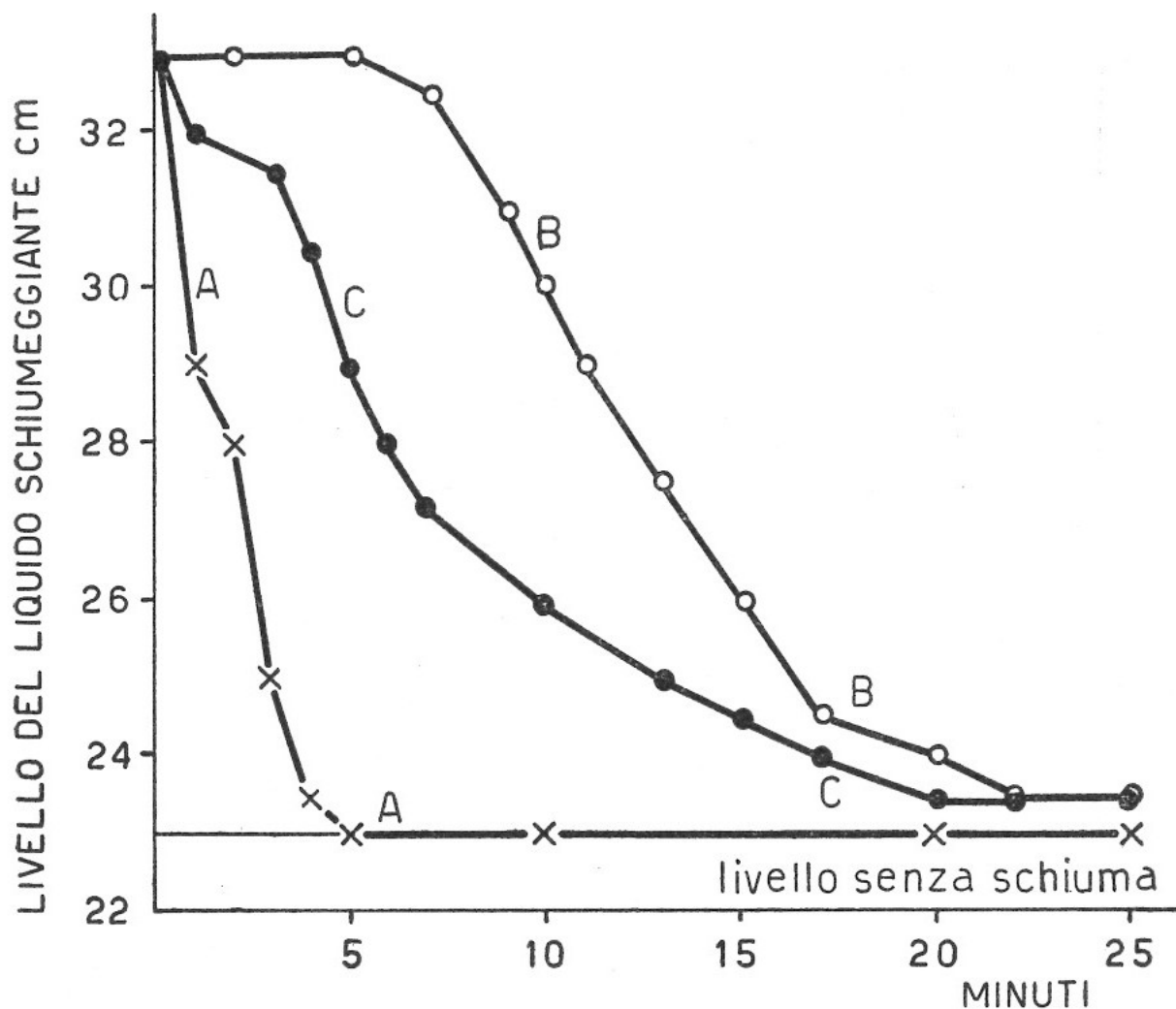


Fig. 3. - Effetto dell'agente disperdente sulla rapidità della azione antischiuma dell'Alkaterge C (nel sistema a vortice). Aerazione ed agitazione: sistema a vortice, 900 giri al minuto. Liquido schiumeggiante terreno al corn steep (pH 7), 5 litri. I livelli venivano registrati durante l'agitazione. L'aggiunta dei preparati antischiuma venne iniziata dopo il raggiungimento della massima produzione di schiuma:

- A = livello col 50% di Alkaterge in olio di paraffina aggiunto nelle quantità di 0,2 ml, 0,2 ml e 0,4 ml; rispettivamente a 0, 2 e 5 minuti;
- B = livello col 50% di Alkaterge in olio di vinaccioli aggiunto nelle stesse quantità del precedente;
- C = livello di 0,1 ml, 0,1 ml e 0,2 ml; rispettivamente a 0, 2 e 5 minuti.

concentrazione del 0,1%, inibiva completamente la schiuma, ma richiedeva circa 25 minuti per raggiungere il massimo effetto. L'olio di paraffina non accelerava affatto l'azione dell'olio di vinaccioli. Nel sistema ad antivortici (fig. 4), le differenze nella rapidità di azione erano ancor

più pronunciate e ciò meritava particolare attenzione a causa dell'importanza pratica del problema. Identiche quantità delle 3 preparazioni di Alkaterge (0,4 ml), furono aggiunte al mezzo prima dell'inizio della agitazione ed aerazione. Con l'Alkaterge al 50% in olio di vinaccioli

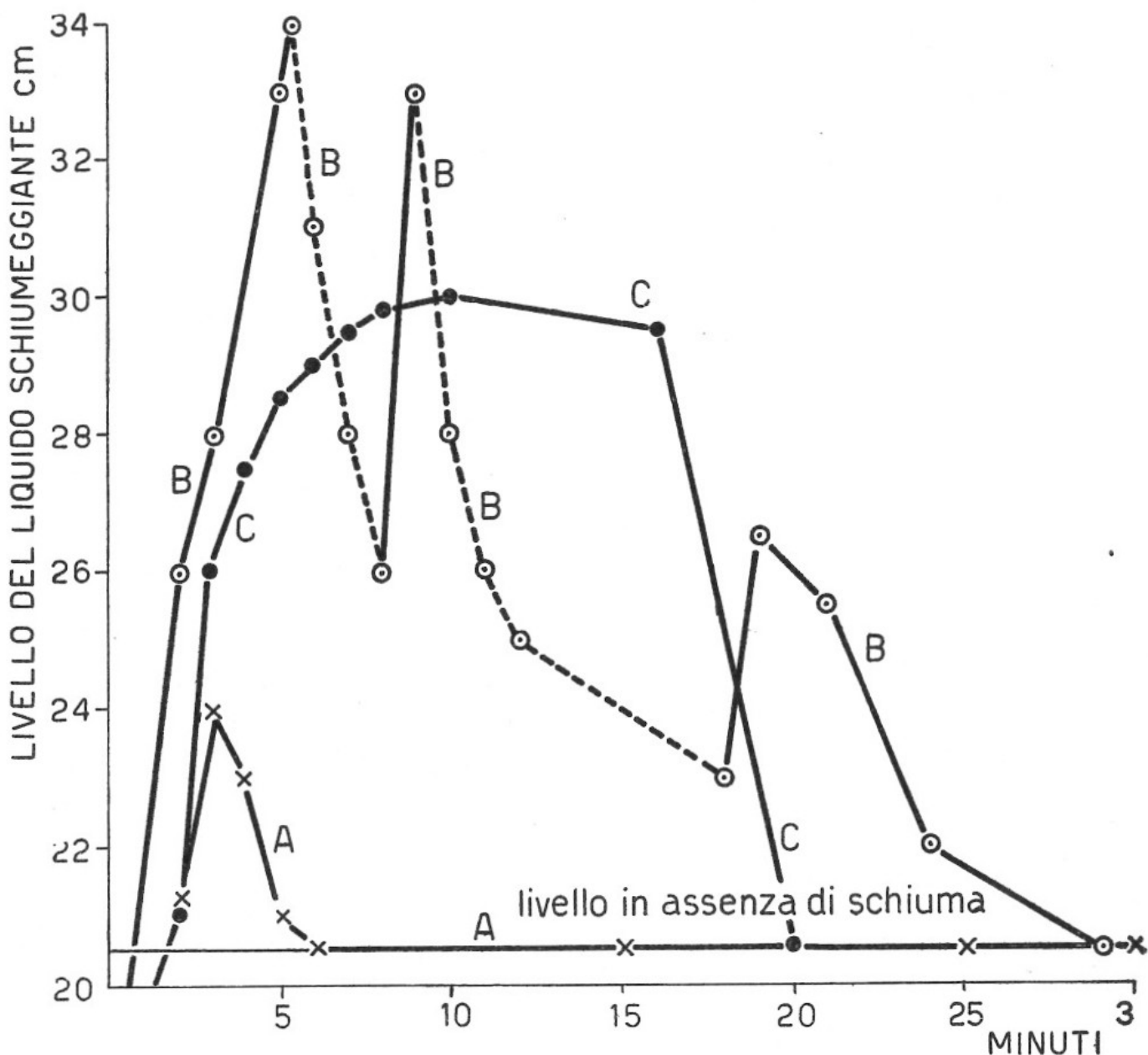


Fig. 4. - Effetto dell'agente disperdente sulla rapidità dell'azione antischiama dell'Alkaterge C (nel sistema ad antivortici con distributore d'aria). Aerazione e agitazione: sistema ad antivortici 550 giri al minuto 0,5 vol. aria/vol. liq./min. Liquido schiumeggiante terreno al corn steep (pH 7), 3 litri. I livelli venivano registrati durante l'agitazione. I preparati antischiama venivano aggiunti prima di iniziare l'agitazione e l'aerazione:

- A = livello con 0,8 ml di Alkaterge al 50% in olio di paraffina;
- B = livello con 0,8 ml di Alkaterge al 50% in olio di vinaccioli;
- C = livello con 0,4 ml di Alkaterge solo.

(La parte tratteggiata della curva B indica i periodi in cui veniva sospeso il flusso dell'aria).

(curva B), l'azione antischiuma si instaurava molto lentamente ed entro 4 minuti il liquido, schiumeggiando eccessivamente, arrivava quasi al punto di traboccare dal recipiente. La formazione di schiuma poteva pertanto essere tenuta sotto controllo solamente interrompendo di quando in quando l'afflusso dell'aria.

La linea tratteggiata, indica il livello della schiuma in assenza di

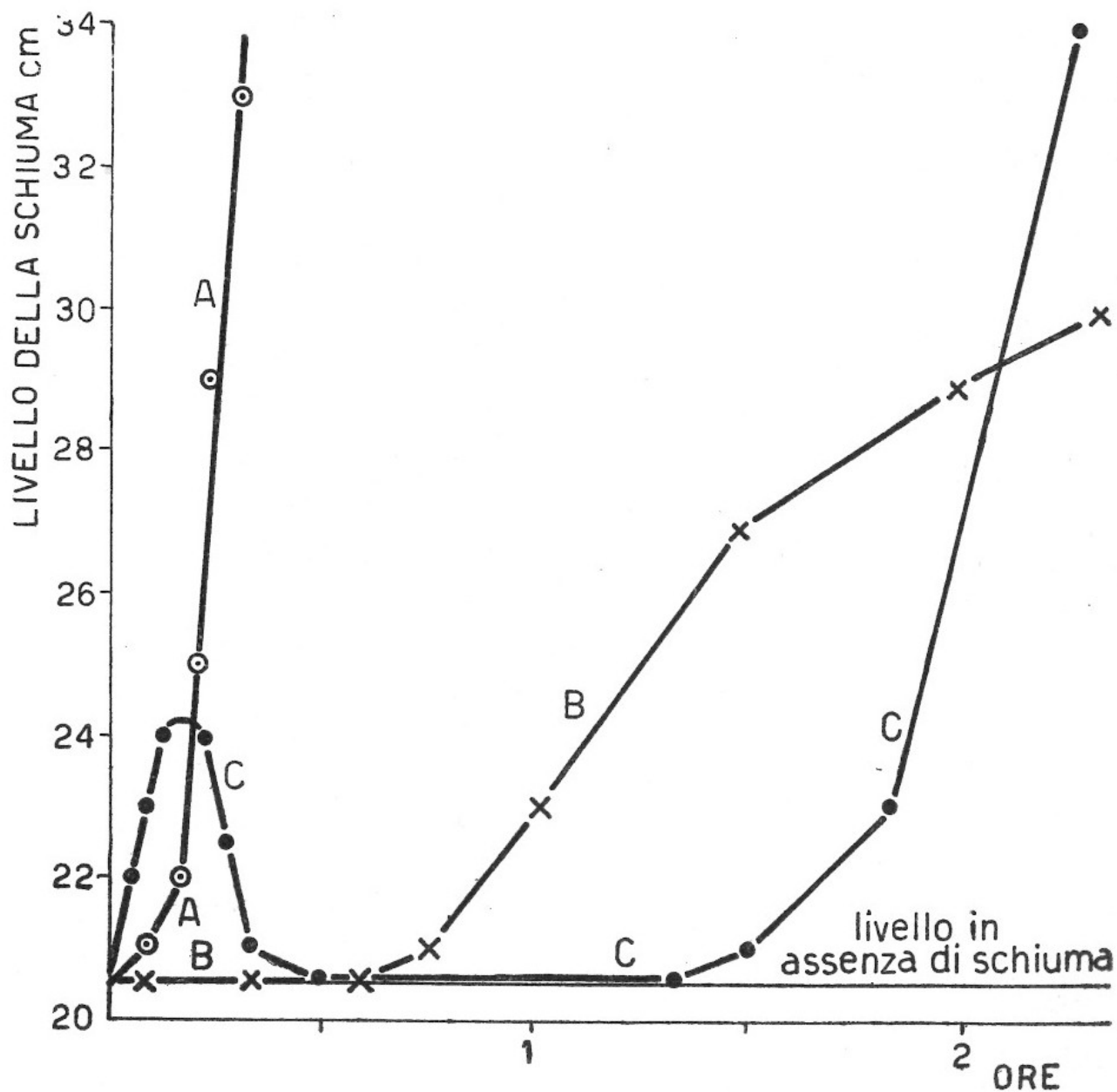


Fig. 5. - Effetto dell'agente disperdente sull'attività antischiuma dell'ottadecanolo. Aerazione e agitazione: sistema ad antivortici, 530 giri al minuto, 0,5 vol. aria/vol. liq./min. Liquido schiumeggiante terreno al corn steep (pH 7), 5 litri. I livelli venivano registrati durante l'agitazione. I preparati antischiuma venivano aggiunti prima di iniziare l'agitazione e l'aerazione:

- A = livello con 2,5 ml di ottadecanolo al 6% in olio di paraffina;
- B = livello con 2,5 ml di ottadecanolo al 6% in olio di vinaccioli;
- C = livello con 2,5 ml di ottadecanolo al 6% in olio di lardo.

rifornimento d'aria. Ci vollero circa 30 minuti prima che si raggiungesse un completo controllo della schiuma. Con Alkaterge in olio di paraffina, la produzione iniziale di schiuma risultò subito modesta, del resto essa fu poi nettamente inibita entro solo 5 minuti (curva A). L'Alkaterge da solo, come nel sistema a vortice, dimostrava una rapidità di azione intermedia (curva C).

b) *Potere di dispersione del supporto.* — Furono incontrate notevoli difficoltà per ottenere una efficace dispersione dell'ottadecanolo e dell'antischiama Silicone A. Nelle fermentazioni per la produzione di penicillina vengono spesso adoperati preparati antischiama contenenti fino al 6% di ottadecanolo in olio, quale ad esempio l'olio di lardo. E' stata pertanto esaminata la convenzione dei 3 veicoli, olio di paraffina, olio di vinaccioli e di lardo con questi due preparati. L'ottadecanolo risultava essere modestamente solubile in questi olii a temperatura ambiente. Rapidamente solubile a caldo, precipitava non appena la soluzione calda veniva aggiunta al mezzo di coltura. Nella figura 5 viene paragonata l'azione di questi 3 agenti disperdenti sull'azione antischiama dell'ottadecanolo. L'antischiama Silicone A si discioglie rapidamente in etere di petrolio, non del tutto invece in olio di paraffina. La migliore inibizione di schiuma è ottenuta con l'uso di una miscela di olio di paraffina e etere di petrolio (nelle proporzioni di 1:1) come agenti dispersori. L'influenza del tipo della dispersione sulla inibizione della schiuma da parte dell'antischiama Silicone A è visibile nella Tabella I.

TABELLA I

Effetto del veicolo sull'azione antischiama del silicone.

Veicolo	Concentrazione del Silicone		Tempo occorrente per la completa eliminazione di 6,5 cm di schiuma nel sistema a vortice (4).
	Nel veicolo (‰)	Nel mezzo (ppm)	
Etere di petrolio (1)	50	5	nessuna azione
Olio di paraffina (2)	20	20	10 minuti
Miscela di etere di petrolio-paraffina (1:1) (3)	20	10	30 secondi
id. id. id.	2.5	5	30 secondi

(1) Buona dispersione, molto vischiosa.

(2) Dispersione scarsa, il silicone lasciato a sè si depositava.

(3) Dispersione eccellente, di bassa viscosità.

(4) Volume della schiuma con liquido fermo, approssimativamente litri 1,65.

CONFRONTO FRA DIFFERENTI PREPARATI ANTISCHIUMA.

Usando la tecnica descritta, sono state eseguite le valutazioni dell'attività di preparati antischiuma contenenti le seguenti sostanze: Alkaterge C, Siotol AF, antischiuma Silicone A, ottadecanolo, olio di vinaccioli e olio di lardo. I risultati ottenuti sono riportati nelle Tabelle II e III.

TABELLA II

Concentrazioni ottimali di preparati antischiuma per il completo controllo della schiuma in un terreno di corn steep-lattosio per un periodo di almeno 6 ore.

Preparati antischiuma	Sistema a vortice 900 g.p.m.			Sistema ad antivortice, 550 g.p.m. o.5 vol. aria min.		
	Conc. %	Anti-schiuma (ppm)	Note (*)	Conc. %	Anti-schiuma (ppm)	Note (*)
<b>I. ALKATERGE C</b>						
Alkaterge solo	0.01	100	I	0.02	200	S
Alkaterge al 33% in olio di paraffina	0.024	80	I	0.024	80	I
Alkaterge al 50% in olio di paraffina	0.016	80	I	0.02	100	I
Alkaterge al 50% in olio di vinaccioli	0.02	100	S	—	—	U
<b>II. SIOTOL AF</b>						
Siotol solo	0.02	200	I, F	—	—	U
Siotol al 50% in olio di paraffina	0.04	200	I, F	0.16	800	I, F
<b>III. SILICONE</b>						
Silicone al 2,5% in miscela etere di petrolio-paraffina (1:1)	0.16	40	I, F	0.16	40	I, F
<b>IV. OTTADECANOLO</b>						
Ottadecanolo al 6% in olio di vinaccioli	0.05	30	I	—	—	U
Ottadecanolo al 6% in olio di lardo	0.05	30	I	—	—	U
Ottadecanolo al 6% in olio di paraffina	0.33	200	I, F	—	—	U
<b>V. OLIO DI VINACCIOLI</b>						
	0.10	1000	VS	—	—	U

(\*) I = Azione antischiuma istantanea.

S = Azione antischiuma lenta.

VS = Azione antischiuma molto lenta.

U = Non adatto all'uso (vedi il testo per spiegazione).

F = Lieve, persistente produzione di schiuma nel periodo dell'esperienza ma trascurabile dal punto di vista pratico.

EFFETTO DEL MICELIO E DI SAPONI.

L'aggiunta fino alla misura dell'1% di micelio di *P. Chrysogenum*, lavato con acetone anidro non influenzava l'azione antischiuma, almeno nei pochi casi studiati. L'uso di olii di origine animale o vegetale nelle

TABELLA III

Paragone delle attività di preparati antischiuma nei sistemi a vortice e ad antivortice in terreni al corn steep-lattosio.

Preparati antischiuma	Quantità del preparato per 5 litri del mezzo	Agente antischiuma	Mantenimento di una completa inibizione della schiuma	
			Vortice 900 g.p.m.	Antivortice 500 g.p.m. o 5 vol. (&)
			Ore	Ore
<b>I. ALKATERGE C</b>	ml.	ppm. (*)		
Alkaterge solo	0.4	80	> 6.5	2
Alkaterge al 20% in olio di paraffina	1.0	40	> 2.5	1
Alkaterge al 50% in olio di paraffina	0.8	80	> 7.5	7.5
Alkaterge al 50% in olio di vinaccioli	1.0	100	> 8.5	0
<b>II. SIOTOL AF (I.C.I.)</b>				
Siotol solo	1.0	200	> 7	0.5
Siotol solo	4.0	800	—	1.75
Siotol al 50% in olio di paraffina	8.8	800	—	> 6
<b>III. SILICONE</b>				
Silicone al 2,5% in etere di petrolio	8.0	40	> 6	> 6
<b>IV. OTTADECANOLO</b>				
Ottadecanolo al 6% in olio di vinaccioli	2.5	30	> 6	0.75
Ottadecanolo al 6% in olio di lardo	2.5	30	> 6	1.5
Ottadecanolo al 6% in olio di paraffina	2.5	30	0.5	0
Ottadecanolo al 6% in olio di paraffina	33.0	200	> 6	1.5
Ottadecanolo al 6% in olio di paraffina	66.0	400	—	2
<b>V. OLIO DI VINACCIOLI</b>	5.0	1000	> 9	0

(\*) Parti per milione in peso di ottadecanolo e silicone; in volume per gli altri.

(&) Con un flusso d'aria di 1 vol./min., nel sistema ad antivortici i tempi di durata erano: Alkaterge C (0,1%) solo, 40 min.; Alkaterge C al 50% in olio di paraffina (0,02%) almeno 8 ore

fermentazioni per la produzione di penicillina, può rendere possibile la formazione di saponi, come risultato di una idrolisi dell'olio per azione di lipasi. Vennero quindi eseguiti alcuni esperimenti in cui al mezzo venne aggiunto dell'oleato di sodio, per vedere quale effetto questo sapone potesse avere sullo schiumeggiamento. Nel sistema a vortice ed usando un terreno al corn steep-lattosio a pH 7, l'oleato di sodio dimostrò una blanda azione antischiuma; rinforzava invece considerabilmente la produzione di schiuma nel sistema ad antivortici. Lo schiumeggiamento poteva peraltro essere contenuto aumentando la quantità del preparato. In un esperimento nel sistema ad antivortici, l'aumento della schiuma dovuto all'aggiunta di una soluzione di oleato sodico equivalente a 1,0 ml di acido oleico per 5 litri del mezzo, poté essere tenuto completamente sotto controllo da una quantità di 160 ppm di Alkaterge in olio di paraffina. Uno studio completo sull'effetto di questo sapone era comunque al di fuori dello scopo di questo lavoro.

#### PERDITA DEL POTERE ANTISCHIUMA.

E' stato osservato che in assenza di olio di paraffina, l'azione antischiuma dell'Alkaterge diminuisce rapidamente, probabilmente in dipendenza del fatto che, andando l'agente antischiuma a depositarsi sulle pareti del recipiente al di sopra del livello del liquido, esso veniva automaticamente allontanato dal sistema. Difatti nel sistema ad antivortici, col cessare dell'ibizione della schiuma da parte di un'efficace dose iniziale di Alkaterge, l'azione inibente poteva essere riattivata aggiungendo al liquido il materiale depositatosi sulle pareti del recipiente, purchè vi si aggiungesse anche dell'olio di paraffina (1 ml/5 litri di mezzo).

#### ESPERIMENTI DI FERMENTAZIONE.

In fermentazioni nell'impianto pilota su scala di 50 litri, si è trovato che l'Alkaterge C (0,3 ml/l) misto con paraffina (2 ml/l) inibiva completamente la produzione di schiuma per circa 2 giorni, in un mezzo di corn steep, ed usando il sistema di aerazione ad antivortici. In una fermentazione simile anche l'antischiuma A ad una concentrazione di 50 ppm, inibiva la schiuma per circa 2 giorni. Tentativi su scala maggiore sono in corso per determinare la minima quantità necessaria di preparato antischiuma, per le fermentazioni nell'impianto pilota. L'ottadecanolo e lo Alkaterge C, con olio di vinaccioli come veicolo, risultarono del tutto privi di efficacia nel sistema ad antivortici con forte grado di aerazione.

## DISCUSSIONE

### IL PROBLEMA DEL CONTROLLO DELLA SCHIUMA.

La gran parte dei mezzi di coltura biologici formano emulsioni stabili con i gas dispersi, con il risultato di formare schiuma alla superficie. Sono stati suggeriti un certo numero di mezzi meccanici e chimici per la distruzione di questa schiuma. Con i mezzi chimici è possibile ottenere la rottura delle bolle d'aria non appena esse raggiungono la superficie. Non è a conoscenza degli AA. la descrizione di alcun mezzo meccanico efficace per l'eliminazione della schiuma. In un precedente lavoro eseguito in questo laboratorio da CHAIN e coll. (1952) era stato dimostrato che l'eliminazione della schiuma con metodo meccanico, secondo la tecnica usata nel fermentatore di Waldhof, non è molto efficace. Sia il fermentatore di Waldhof, sia quello descritto da H. HUMFELD e I. C. FEUSTEL<sup>(3)</sup> pure dotato di elementi meccanici per l'eliminazione della schiuma, sono in realtà dei sistemi a vortice modificati, e siccome è stato dimostrato più sopra che nel sistema a vortice la schiuma non fuoriesce dal recipiente, ma raggiunge ad un dato momento uno stato costante, si spiega come in questi sistemi, i mezzi meccanici per la eliminazione della schiuma non rivestono sostanziale valore.

E' già stato affrontato in varie maniere il problema del modo e del meccanismo d'azione dei preparati antischiama<sup>(4, 5)</sup>. E' necessario comunque sottolineare quanto detto recentemente da R. MATALON<sup>(6)</sup> che quanto si sa di fondamentale sulla inibizione della schiuma è veramente molto limitato, e vi è tuttora necessità di ulteriore lavoro al riguardo.

### IL PREPARATO ANTISCHIUMA IDEALE.

Le proprietà di un ideale preparato antischiama per le fermentazioni, sono le seguenti: *a)* capacità di sopprimere la schiuma istantaneamente; *b)* lunga durata di azione; *c)* assenza di indesiderabili effetti fisiologici. L'immediata azione da parte di un preparato antischiama è di somma importanza col sistema convenzionale di aerazione e di agita-

---

<sup>(3)</sup> J. Bact. 52, 229 (1945).

<sup>(4)</sup> ROSS S. - The Inhibition of Foaming, Rensselaer Polytechnic Institute. Bull. No. 63 (1950), Troy, New York.

<sup>(5)</sup> PATTLE R. E. - J. Soc. Chem. Ind. 69, 368 (1950).

<sup>(6)</sup> Nature 172, 49 (1953).

zione usando distributori d'aria e antivortici. Con questi sistemi, il livello del liquido schiumeggiante può elevarsi continuamente e fuoriuscire dal recipiente con rapidità. Per combattere l'eccesso di schiuma, in caso di emergenza, in questi sistemi ad antivortici, l'azione del preparato deve essere molto rapida altrimenti la schiuma può raggiungere il punto pericoloso prima che si sia instaurata l'inibizione. A causa del lento inizio della loro azione antischiuma alcuni preparati, come ad esempio l'Alkaterge C in olio di vinaccioli, non sono di generale applicazione. La scelta di un preparato antischiuma può essere condizionato anche dalla sua attività fisiologica. E' da evitare, ad esempio, il preparato che, a causa di una sua particolare azione sulla tensione superficiale, risulti tossico per i microorganismi. Il preparato antischiuma possiede anche un effetto fisiologico in quanto può essere metabolizzato dal microorganismo coltivato. Gli olii vegetali od animali, spesso usati nei preparati antischiuma per la fermentazione della penicillina, sono metabolizzati dalla muffa. Come risultato ne risente il pH del mezzo, presumibilmente a causa della liberazione di acidi grassi, per un'azione lipasica; inoltre i costituenti dell'olio sono utilizzati come sorgenti di carbonio, ed hanno quindi un marcato effetto sul metabolismo della muffa (<sup>7</sup>,<sup>8</sup>).

L'ideale combinazione di tutte le proprietà può essere realizzata solo disperdendo l'agente antischiuma in un adatto veicolo. Il veicolo stesso può anche accelerare l'inibizione della schiuma da parte del preparato e prolungare la sua durata d'azione, come per esempio, l'olio di paraffina con l'Alkaterge C, ovvero può dimostrare effetto opposto, come si vide con l'Alkaterge C in olio di vinaccioli. Il meccanismo d'azione della paraffina non è per altro ben chiaro e necessita ulteriore studio fisico-chimico. La dispersione è probabilmente uno dei fattori in causa, ma non il solo.

#### PARAGONE FRA I SISTEMI A VORTICE E AD ANTIVORTICI.

Nel sistema a vortice la formazione di schiuma è molto meno pronunciata che nel sistema ad antivortici, a parità di diffusione di ossigeno. Alle condizioni usate nel sistema a vortice, è sempre stato possibile raggiungere un punto stabile in cui la rottura della schiuma ne bilanciava la formazione, anche in assenza di qualsivoglia preparato antischiuma. Tale condizione non si realizzò mai nel sistema ad antivortici.

---

(<sup>7</sup>) GOLDSCHMIDT M. C. e KOFFLER H. - Ind. Eng. Chem. 42, 1819 (1950).

(<sup>8</sup>) ROLINSON G. N. e LUMB M. - J. gen. Microbiol. 8, 265 (1953).

La differenza, senza dubbio, è dovuta al fatto che per una determinata diffusione di ossigeno, il volume di aria che passa attraverso il sistema a vortice è molto minore di quella che attraversa il sistema ad antivortici. La scomparsa della schiuma nel sistema ad agitazione libera è facilitata dal fatto che la schiuma ed il liquido sono mescolati uniformemente, in contrasto con il sistema ad antivortici in cui la schiuma forma uno strato separato non agitato al di sopra del liquido. In genere, con i preparati antischioma adatti all'uso in ambedue i sistemi, la quantità minima di preparato capace di sopprimere la schiuma completamente nel sistema a vortice era sufficiente anche per il sistema ad antivortici, solo che la durata dell'inibizione era molto più breve in quest'ultima. Certi preparati antischioma ad azione lenta come l'olio di vinaccioli, e che con successo controllavano la formazione della schiuma nel sistema a vortice erano del tutto inefficaci nel sistema ad antivortici. Per paragonare le varie attività dei preparati antischioma, il sistema a vortice, a causa dello stato stabile della schiuma e dell'uniformità dell'agitazione, ha dei vantaggi sul sistema ad antivortici. In lavoro di fermentazioni, qualora la scelta non sia influenzata da altre considerazioni, è da preferirsi il sistema a vortice a quello ad antivortici, e per la molto minore intensità nella formazione di schiuma e per la conseguentemente più piccola quantità richiesta di preparato antischioma.

#### PARAGONE FRA I DIFFERENTI PREPARATI ANTISCHIUMA.

Nella Tabella III viene fatto il paragone della durata di azione di determinate quantità di preparati antischioma nei due sistemi a vortice e ad antivortici. Nella Tabella II sono riportate le quantità dei preparati antischioma capaci di inibire lo schiumeggiamento per almeno 6 ore nelle condizioni descritte. L'Alkaterge C, il Siotol AF, l'Antischioma Silicone A, inibiscono tutti completamente la formazione di schiuma nei due sistemi descritti, sempre che i veicoli siano adatti. L'Alkaterge ed il Siotol, danno ottimi risultati quando si usi come disperdente l'olio di paraffina; delle quantità leggermente superiori di Siotol sono richieste per ottenere risultati identici a quelli ottenuti con l'Alkaterge. Quest'ultimo può essere usato anche da solo nei due sistemi di aerazione, ma la sua azione è notevolmente rafforzata dall'aggiunta di olio di paraffina. L'Alkaterge disperso in olio di vinaccioli è assolutamente inadatto nel sistema ad antivortici, benchè possa essere invece usato nel sistema a vortice. Uno dei vantaggi dell'Alkaterge disperso in olio di paraffina è che a differenza degli olii vegetali od animali non influenza il pH del mezzo, in quanto essendo una ossazolina non può essere idrolizzato dalla

lipasi per dar luogo ad acidi grassi liberi. L'ottadecanolo si è dimostrato dotato di scarsissima azione antischiama. La fig. 5 dimostra il potere di controllo sulla schiuma espletato da questo preparato in vari veicoli, nel sistema ad antivortici. In questo sistema, usando ottadecanolo al 6% in olio di lardo, la formazione di schiuma non poteva essere controllata per più di 90 minuti indipendentemente dalle quantità usate. Con ogni nuova aggiunta infatti, la schiuma veniva soppressa solo momentaneamente, per riformarsi subito dopo, divenendo incontrollabile in breve tempo. Usando come disperdente l'olio di vinaccioli, la ripresa dello schiumeggiamento era lenta e graduale e con ripetute aggiunte del preparato la schiuma poteva essere tenuta sotto controllo. Per quanto riguarda la rapidità di azione, l'olio di lardo come agente disperdente sembra superiore all'olio di vinaccioli. Sostituito a questi due olii quello di paraffina, si poteva ottenere, nel sistema ad antivortici, un controllo della schiuma solo per breve periodo ed usando una eccessiva quantità del preparato (Tabella III). Nel sistema a vortice si poteva ottenere un buon controllo della schiuma con ottadecanolo in olio di lardo e olio di vinaccioli, ed anche in olio di paraffina, sia pure in quest'ultimo caso con quantità molto maggiori. Nei due primi casi, gli olii stessi possono aumentare il potere antischiama. Sia il comportamento dei preparati contenenti ottadecanolo sia il fatto che questo è così poco solubile nei veicoli da precipitarne, avvalorano l'ipotesi che la debole attività antischiama dell'ottadecanolo sia dovuta alla mancanza di adeguata dispersione. Forse l'ottadecanolo potrebbe venir utilizzato come antischiama se si trovasse un agente disperdente molto più efficace. Si è potuto stabilire che un olio come quello di vinaccioli può essere un buon agente antischiama in un sistema a vortice. L'olio agisce molto lentamente: è concepibile peraltro che si possa trovare un adatto veicolo il quale aumenti la velocità della sua azione antischiama come fa la paraffina nei riguardi dell'Alkaterge e che dia pertanto dei preparati di buona efficacia anche per i sistemi ad antivortici.

Gli autori ringraziano il prof. CHAIN F.R.S. per gli utili consigli e l'incoraggiamento ricevuto durante il corso di questo lavoro.

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