

110. W. M. DION, A. CARILLI, G. SERMONTI e E. B. CHAIN. — L'effetto della agitazione meccanica sulla morfologia del *Penicillium chrysogenum* Thom in fermentatori agitati.

Riassunto. — Sono riportate osservazioni sulla morfologia del *Penicillium chrysogenum*, ceppo 47.1564, in cultura sommersa sottoposta ad intensità variabili di agitazione meccanica, sia con il sistema di aereazione a mezzo di diffusore d'aria in presenza di antivortici, che con il sistema di aereazione a vortice.

In condizioni di leggera agitazione si sono prodotte ife lunghe, sottili e poco ramificate, mentre in condizioni di forte agitazione si sono avute ife corte, ispessite e molto ramificate. Il grado di accorciamento e di ramificazione è risultato dipendente, fino ad un certo limite, dall'intensità dell'agitazione. La sostituzione dell'aria con ossigeno, insufflato nei fermentatori in condizioni di leggera agitazione, ha anche causato accorciamento ed ispessimento delle ife.

L'autolisi del micelio si è prodotta regolarmente, tanto in condizioni di leggera agitazione, per insufficiente aereazione, quanto in condizioni di forte agitazione, a causa di un eccessivo danno meccanico. I migliori rendimenti nella produzione di penicillina sono stati ottenuti con micelio corto, in condizioni di aereazione adeguata e agitazione non sufficientemente forte da provocare un eccessivo danno meccanico al micelio.

Sono infine discusse le variazioni dei valori di aereazione e delle intensità di agitazione riscontrate nel passare di scala dai fermentatori di impianto pilota a quelli di dimensioni industriali.

Résumé. — On a étudié la morphologie de *P. chrysogenum*, souche 47.1564, en culture submergée avec des intensités variables de l'agitation mécanique, en se servant du système d'aération à chicane et à vortex. Lorsque l'agitation est modérée, les hyphes sont longues, atténuées et peu ramifiées, tandis que dans le cas d'agitation vigoureuse, les hyphes sont courtes, épaisses et très ramifiées. Jusqu'à un certain point, le degré de ramification et les courtes dimensions dépendent de l'intensité de l'agitation. L'introduction d'oxygène dans les cuves de fermentation avec une agitation moyenne a aussi comme résultat de raccourcir les hyphes et de les rendre plus épaisses.

L'autolyse du mycelium a lieu régulièrement avec une agitation moyenne en raison de l'aération insuffisante; il en est de même avec une très forte agitation, l'effort mécanique étant excessif. Les meilleurs rendements en pénicilline ont été obtenus avec un mycelium court quand

l'aération est suffisante et l'agitation pas assez intense pour causer des dommages mécaniques excessifs.

On expose les changements des taux d'aération et des intensités d'agitation observés, en passant de l'échelle de l'installation pilote à celle des cuves de fermentation de dimensions industrielles.

Summary. — The morphology of *P. chrysogenum* strain 47.1564 was studied in submerged culture with varying intensities of mechanical agitation, in both the baffled and vortex systems of aeration. When the agitation was mild the hyphae were long, attenuate and little branched, whereas with vigorous agitation the hyphae were short, thickened and very branched. The degree of shortening and branching, up to a certain limit, was dependent upon the intensity of the agitation. The introduction of oxygen gas into fermenters with mild agitation also resulted in a shortening and thickening of the hyphae.

Mycelial autolysis occurred regularly with mild agitation, due to insufficient aeration, and with very high intensities of agitation, due to excessive mechanical damage. The penicillin yields were found to be best with a short mycelium when the aeration was adequate and the agitation not sufficiently intense to cause excessive mechanical damage.

Changes in aeration rates and intensities of agitation found in scaling up from pilot plant to industrial size fermenters are discussed.

Zusammenfassung. — Der mechanische Effekt der Rührungsintensität in verschiedenen Belüftungssystemen (Vortexsystem und Belüftung durch Luftverteiler in Gegenwart von Prallblechen) auf die morphologische Formbildung von *P. chrysogenum* Stamm 47-1564 in Tiefenkultur wurde untersucht. In Gegenwart langsamer Rührung waren die Hyphen lang, dünn und wenig verzweigt, in Gegenwart starker Rührung hingegen waren die Hyphen kurz, verdickt und stark verzweigt. Der Grad der beobachteten Verkürzung und Verzweigung der Hyphen war bis zu einem bestimmten Grenzwert abhängig von der Rührungsintensität. Belüftung mit reinem Sauerstoff in Gegenwart langsamer Rührung hatte den gleichen Effekt wie intensive mechanische Rührung, nämlich die Bildung von kurzen und verzweigten Hyphen.

Autolyse des Mycels erfolgte regelmässig in Gegenwart langsamer Rührung als eine Folge des Sauerstoffmangels; sie trat ebenfalls auf in Gegenwart intensiver Rührung als eine Folge der zu starken mechanischen Schädigung. Die höchsten Penicillinausbeuten wurden mit der kurzen, verzweigten Hyphenform erhalten, in Gegenwart ausreichender Belüftung

und einer Rührungsintensität von nicht so hohem Grade dass mechanische Schädigung des Mycels eintrat.

Aenderungen der Sauerstoffdiffusionsgeschwindigkeit und der Rührungsintensität, die beim Uebergang von Fermentergefässen von Laboratoriums und Versuchsanlagedimensionen zu Fermentern industrieller Ausmasse auftreten, werden diskutiert.

INTRODUZIONE

In una precedente nota ⁽¹⁾ sono state riferite osservazioni sull'organizzazione del *P. chrysogenum* Thom in cultura sommersa in recipienti agitati. In particolare sono state stabilite le condizioni per ottenere la crescita miceliale in forma di palette o in forma filamentosa.

Durante le ricerche in corso in questo reparto sui fattori che influenzano la produzione biologica della penicillina in fermentatori sottoposti ad agitazione meccanica, fu notato che la crescita miceliale presentava aspetto morfologico diverso, in dipendenza, tra gli altri fattori, del grado di intensità dell'agitazione meccanica (*).

In considerazione delle notevoli differenze osservate nella struttura morfologica del micelio, si è pensato che le differenti forme ifali avrebbero anche potuto presentare un differente comportamento metabolico.

Inoltre, poichè l'efficacia dell'aereazione nei fermentatori agitati è proporzionale alla turbolenza prodotta dalle pale dell'elica, cioè all'intensità dell'agitazione, e poichè l'intensità dell'agitazione modifica la morfologia del micelio, è chiaramente impossibile valutare correttamente l'effetto biochimico dell'aereazione, senza tener conto dell'effetto dell'agitazione meccanica sul tipo di micelio prodotto.

Nei fermentatori aerati per mezzo di agitazione si sarebbe potuto attendere dei risultati biochimici riproducibili — e la loro corretta interpretazione — solamente se si fosse potuto stabilire le condizioni per la formazione dei diversi tipi di micelio.

A questo scopo, e al fine di correlare le osservazioni micologiche e

⁽¹⁾ CAMICI L., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Bull. World Hlth. Org., 6: 265-276 (1952).

(*) Le prime osservazioni dell'influenza di una forte agitazione meccanica sull'aspetto morfologico del micelio di *P. chrysogenum* furono fatte in collaborazione con S. Paladino, durante i primi esperimenti sulla produzione di penicillina con il sistema di aereazione a vortice.

biochimiche, fu considerato essenziale intraprendere uno studio sistematico delle differenti forme miceliali che si producono nei fermentatori agitati.

DUCKWORTH ed HARRIS (2) si sono occupati dello sviluppo del micelio di *P. chrysogenum* in cultura sommersa in un fermentatore agitato; le osservazioni riportate nella loro nota riguardano, tuttavia, soltanto una condizione di agitazione.

METODI

Ceppo. — E' stato usato il ceppo 47.1564 (3) di *P. chrysogenum* Thom. Le culture originali erano conservate in terra sterile e ogni mese erano trasferite su agar. Sospensioni di conidi delle culture su agar sono state usate per inoculare piccole beute contenenti 5-10 gr. di farina di granturco inumidita con 1-2 ml di una soluzione contenente 0,1% di asparagina e 3% di glicerina in acqua distillata (4).

Quando la sporulazione era ben avanzata, dopo circa due settimane, alla beuta erano aggiunti 50 ml di H₂O distillata sterile e la risultante sospensione di conidi era usata per l'inoculo del primo fermentatore.

CONDIZIONI DI CRESCITA

1) *Fermentatori.* — Il micelio fu fatto crescere in fermentatori agitati di acciaio inossidabile, precedentemente descritti (5).

La maggior parte delle osservazioni morfologiche furono compiute su micelio sviluppatosi in fermentatori da 10 litri, contenenti 5 litri di mezzo culturale, mentre alcune esperienze sono state compiute in un fermentatore della capacità di 3.000 litri, contenente 2.200 litri di mezzo culturale, e in fermentatori della capacità di 12.000 litri con 10.000 litri di mezzo.

2) *Aereazione.* — L'aereazione nei fermentatori agitati è ottenuta con la dispersione dell'aria in minute bollicine per mezzo di un'elica. L'aria era in alcuni casi immessa nel terreno culturale attraverso un diffusore e in altri casi succhiata dentro da un vortice formato da un'elica rotante ad alta velocità.

(2) DUCKWORTH R. B. e HARRIS G. C. M. - Trans. Brit. Myc. Soc., 32: 224 (1949).

(3) Ricevuto dall'Università di Wisconsin, Madison, Wis.

(4) WHIFFEN A. J. e SAVAGE G. M. - Jour. Bact., 53: 231 (1947).

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

Quando si usa un diffusore possono essere inserite nel liquido culturale dei setti antivortice per facilitare la dispersione dell'aria.

I fattori che influenzano l'efficacia dell'aereazione e numerose misure di velocità di aereazione in differenti condizioni di agitazione sono state riferite in altre comunicazioni (⁶, ⁷).

a) *Sistema con diffusore d'aria.* — Nei fermentatori da 10.000 litri con diffusore d'aria e in presenza di antivortici fu usata un'elica ad 8 pale di tipo a disco (vedi CHAIN *et al.*, 1952, 1954), di 75 mm. di diametro e tre differenti velocità di agitazione. Nella tavola 1 sono raccolte le velocità di aereazione e di agitazione, in presenza e in assenza di micelio, con un passaggio di aria attraverso il diffusore di 2,5 litri per minuto ed una sovrappressione di 0,5 atm. Esse sono state determinate con il metodo amperometrico per mezzo di un elettrodo rotante di platino (CHAIN e GUALANDI 1954).

TAVOLA 1

Valori di aereazione in fermentatori contenenti 5 litri di terreno di cultura, con elica a pale del tipo a disco di 75 mm di diametro, con un passaggio di aria di 2,5 litri per minuto ed una sovrappressione di 0,5 atm.

Velocità di agitazione g. p. m.	Valori di aereazione (ml O ₂ /100 ml terreno/ora)	
	in assenza di micelio	in presenza di micelio (peso secco 1.5%)
360	60	45
600	185	90
830	360	190

Nei fermentatori da 3.000 litri in assenza di antivortici fu usata un'elica di 300 mm di diametro con una velocità di agitazione di 350 g.p.m. e un passaggio d'aria attraverso il diffusore di 1 volume d'aria per volume di mezzo per minuto. Queste condizioni davano una velocità di aereazione di 326 ml O₂/100 di mezzo di cultura per ora alla pressione di 1 atmosfera.

Nel fermentatore da 12.000 litri fu usata un'elica a disco di 600 mm di diametro con una velocità di agitazione di 160 g.p.m.; passaggio

(⁶) CHAIN E. B., PALADINO S., CALLOW D. S. UGOLINI F. e VAN DER SLUIS J. - Bull. World Hlth. Org., 6: 73-97 (1952).

(⁷) CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 1109 (1954).

d'aria attraverso un diffusore ad un ugello di 10 m³ per minuto e sovrappressione di 1 atm. Queste condizioni fornivano una velocità di aereazione di 400 ml O₂/100 ml di mezzo culturale per ora.

b) *Sistema a vortice.* — Per i fermentatori da 10 litri furono usate due eliche a disco con 8 pale di 65 e 90 mm di diametro, rispettivamente.

La velocità di agitazione impiegata durante gli esperimenti e le corrispondenti velocità di aereazione sono elencate nella tavola 2.

TAVOLA 2

Valori di aereazione in fermentatori contenenti 5 litri di terreno di cultura ottenuti con sistema a vortice; passaggio di aria di 2,5 litri per minuto sulla superficie del liquido di cultura.

Diametro della elica a pale (mm)	Velocità di agitazione g. p. m.	Sovrapressione d'aria atm.	Valori di aereazione (ml O ₂ /100 ml di terreno/ora)	
			in assenza di micelio	in presenza di micelio (peso secco 1.5%)
65	900	0.5	105	65
	1200	0.5	175	105
	1450	0.5	230	45
	1850	0.5	315	210
90	560	1.5	150	100
	750	1.5	275	225

Le velocità di agitazione ed aereazione nei fermentatori da 3000 litri sono raccolte nella Tavola 3.

TAVOLA 3

Valori di aereazione in fermentatore da 3.000 litri contenente 2.200 litri di terreno di cultura, ottenuti con sistema a vortice; passaggio di aria di 300 litri per minuto sulla superficie del liquido di cultura e sovrappressione di 1 atm.

Diametro dell'elica a pale (mm)	Velocità di agitazione g. p. m.	Valori di aereazione (ml O ₂ /100 ml di terreno/ora) (in assenza di micelio)
350	720	140
200	1460	160

3) *Terreno di cultura.* — E' stato usato un mezzo di cultura contenente 3% di *corn steep* solido, 3% di lattosio, 0,7% di carbonato di calcio e 0,1% di solfato di sodio. Alcune fermentazioni sono state condot-

te con il terreno sintetico di JARVIS e JOHNSON ⁽⁸⁾: per le osservazioni morfologiche sul micelio sviluppato in questo terreno, vedi CHAIN, PIRT e MILLER ⁽⁹⁾.

La schiuma fu controllata con l'aggiunta di 0,5% di olio di vinaccioli, contenente il 3% di alkaterge C., ogni 6 ore.

In successivi esperimenti il contenuto di alkaterge fu portato al 30%, ma ciò non ebbe effetto sulla morfologia del micelio.

4) *Crescita dell'inoculo.* — Il micelio per l'inoculo dei piccoli fermentatori da 10 litri fu fatto sempre sviluppare in un fermentatore da 10 litri, contenente 5 litri di terreno; sistema di aereazione a vortice, velocità di agitazione di 900 g.p.m. (diametro dell'elica 65 mm) e passaggio d'aria in cupola di 2,5 litri per minuto, con una sovrappressione di 1,5 atm.

Dopo 35-40 ore di crescita in queste condizioni, quando il peso secco del micelio era intorno a 0,8% veniva trasferita nei fermentatori sperimentali una quantità di cultura da inoculo, corrispondente al 5% del contenuto del fermentatore.

Il micelio per l'inoculo dei fermentatori da 3.000 litri fu fatto crescere in un fermentatore con antivortici, della capacità di 300 litri, con elica di 250 mm di diametro rotante ad una velocità di 190 g.p.m. ed un passaggio d'aria di 1 volume di mezzo per minuto, ad 1 atm. di pressione.

L'inoculo per i fermentatori da 12.000 litri fu fatto crescere in un fermentatore della capacità di 500 litri, con un'elica di 360 mm di diametro rotante ad una velocità di 190 g.p.m. ed un passaggio d'aria di 1 volume per volume di mezzo culturale per minuto, ad 1 atm. di pressione.

RISULTATI

I due principali tipi di micelio di P. chrysogenum prodotti nei fermentatori agitati.

Nonostante sia difficile descrivere in termini precisi il micelio del *Penicillium*, tanto variabile nelle particolari condizioni della cultura sommersa, è stato possibile tuttavia distinguere chiaramente due tipi principali di crescita, prodotti nei fermentatori agitati a seconda dell'intensità dell'agitazione meccanica.

⁽⁸⁾ JARVIS F. G. e JOHNSON M. J. - J. Am. Chem. Soc., 69: 3019 (1947).

⁽⁹⁾ CHAIN E. B., PIRT S. J. e MILLER G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: in corso di stampa. stampa

1) *Micelio lungo, filamentoso* (fig. 1). — Esso è considerato come la forma di crescita normale per il *P. chrysogenum* in cultura sommersa, in assenza di forte agitazione meccanica. Le unità miceliali, costituite da un'ifa e dalle sue ramificazioni, sono sempre più lunghe di 250 μ . Il diametro delle ife è di circa 2-3 μ e i setti distano 30-40 μ l'uno dall'altro. La ramificazione è scarsa; le ife laterali sono anch'esse lunghe e si assottigliano gradualmente verso gli apici.

Mentre questo tipo di micelio è molto più lungo del micelio « corto » descritto più avanti, le sue ife raggiungono raramente la lunghezza di quelle che si sviluppano su mezzo solido o in beute agitate.

2) *Micelio corto, frammentato* (figg. 2, 3 e 4). — Questo tipo di micelio è caratteristico della crescita in condizioni di vigorosa agitazione meccanica. Le ife sono brevi, ramificate e ispessite, tanto da formare piccole unità rigide. Il grado di accorciamento e ispessimento è notevolmente dipendente dal grado di agitazione. Le ife variano da circa 40 μ a 50 μ in lunghezza, e da 2,5 μ a 4 μ in diametro; le ramificazioni sono numerose, con un pronunciato assottigliamento verso l'apice, specialmente nel micelio giovane.

Sviluppo miceliale in fermentatori agitati, aereati attraverso diffusori.

1) *Fermentatori sperimentali da 10 litri, provvisti di antivortici.* — Sono state usate tre differenti velocità di agitazione (Tavola 1), Con la velocità più bassa, 350 g.p.m., il micelio era sempre di tipo lungo, filamentoso. Nei primi stadi della crescita dopo l'inoculo, le ife continuavano ad allungarsi e a ramificarsi formando una intricata rete di ife lunghe, sottili. I rami laterali erano molto distanziati e circa dello stesso diametro delle ife da cui erano prodotti.

Erano presenti alcune delle « wide forms » descritte da DUCKWORTH e HARRIS, consistenti in ife leggermente ispessite e talvolta contorte, ma esse erano rare e generalmente scomparivano dopo il primo giorno (*).

In queste fermentazioni un certo numero di cellule erano sempre in stato di autolisi, ma non fu mai osservato un completo collasso seguito da nuova crescita.

(*) Le ife ispessite apparivano irregolarmente in queste esperienze ed erano più numerose alle più alte velocità di agitazione. Esse erano talvolta formate da cellule ingrossate che sopravvivevano nelle ife lunghe e sottili dopo la rottura di queste, e talvolta si originavano da ife ispessite già presenti nell'inoculo al momento del trasferimento. Poichè queste ife ispessite non rappresentavano mai più dell'1% del micelio totale, non sono state oggetto di particolari osservazioni, ma, nelle poche occasioni in cui tali forme furono trasferite su mezzo agarizzato, esse dettero sempre luogo ad ife sottili, indistinguibili da quelle normali.

Circa 70 o 80 ore dopo il trasferimento, le ife lunghe cominciavano a presentarsi — talvolta — rotte in corti frammenti non ramificati, composti di cellule vive spesso collegate dalle pareti di ife svuotate. Questi brevi frammenti di ife, benchè rientrassero nelle misure di lunghezza di un micelio corto, differivano nel modo di formazione, nel diametro e nella lunghezza delle cellule da un vero micelio corto e non furono caratterizzati come tali.

Quando la velocità di agitazione saliva a 600 g.p.m. l'andamento dello sviluppo miceliale risultava notevolmente alterato. Per 20 ore dopo il trasferimento le ife rimanevano lunghe, ma si ispessivano leggermente con un diametro variabile da $2,7 \mu$ a $4,0 \mu$ e con setti molto più ravvicinati.

Nel primo periodo di crescita esse producevano un gran numero di rami laterali, generalmente formati in ciuffi, una stessa cellula dell'ifa principale producendo due o tre ramificazioni che spesso erano a loro volta ramificate. Questi ciuffi erano composti di brevi ife rigide (fig. 5), spesso di diametro più sottile delle ife originarie, e tutte fortemente assottigliate agli apici.

Tra le 30 e le 40 ore dopo il trasferimento, le ife principali più lunghe si rompevano e svuotavano, lasciando liberi i ciuffi di brevi ife laterali e formando così un micelio corto (fig. 2). Tra queste ife erano evidenti formazioni « a scopa ».

Le pareti vuote delle ife principali lunghe erano un aspetto caratteristico della cultura fortemente agitata. Esse persistevano talvolta per 70 ore, come frammenti attaccati ad una o più ife laterali non svuotate.

Le ife corte, alla suddetta velocità di agitazione, mostravano molto raramente segni di danno meccanico. Non c'è alcuna prova che dimostri che esse siano formate dalla rottura di ife lunghe in brevi frammenti, in seguito all'azione meccanica dell'elica. Esse sono, in effetti, ramificazioni laterali prodotte in abbondanza sotto l'influenza meccanica dell'agitazione dei primi stadi di crescita.

Dopo lo sviluppo del micelio corto, intorno alla 36^a ora generalmente si avevano solo leggere modificazioni nelle ife: esse si arrotondavano agli apici perdendo la caratteristica forma appuntita del primo periodo di crescita, ma rimanevano brevi per tutta la fermentazione. Apparentemente il loro allungamento era impedito dall'intensa agitazione meccanica.

Si aveva generalmente un aumento nel numero delle cellule vuote con l'invecchiare della cultura. Le ife divenivano vacuolizzate, e spesso il contenuto cellulare fuoriusciva dalle pareti. In questo tipo di fermentazione

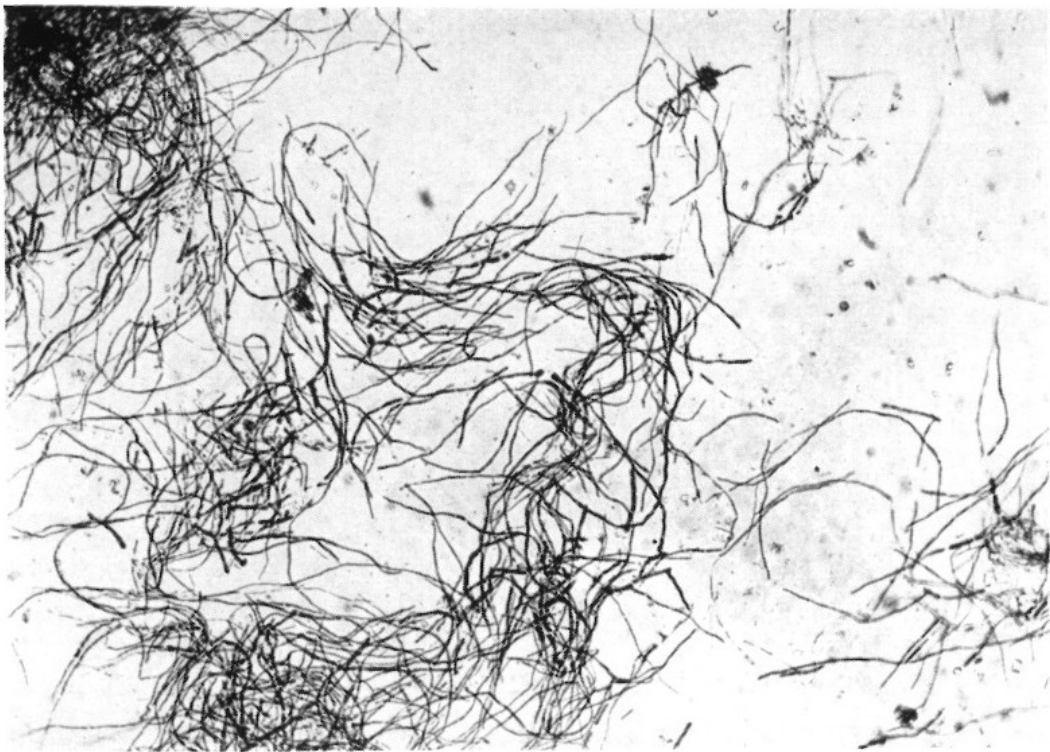


Fig. 1. - Micelio lungo, filamentoso dopo 58 ore di sviluppo. (Sistema con antivortici, 360 g. p. m., 75 mm ϕ) \times 150.



Fig. 2. - Micelio corto, ramificato dopo 36 ore di sviluppo. (Sistema con antivortici, 600 g. p. m., 75 mm ϕ) \times 150.

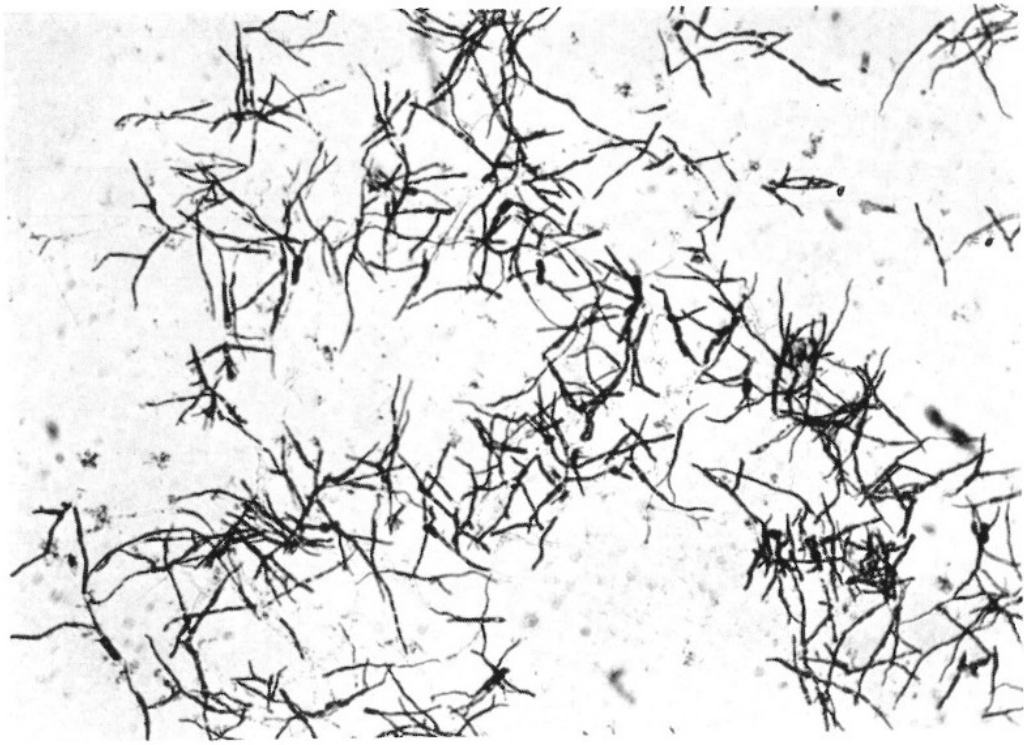


Fig. 3. - Micelio corto, ramificato dopo 48 ore di sviluppo. (Sistema a vortice, 750 g. p. m., 90 mm ϕ) \times 150.



Fig. 4. - Micelio corto dopo 72 ore di sviluppo mostrante cellule vuote nel centro delle unità ifali. (Sistema a vortice, 750 g. p. m., 90 mm ϕ) \times 450.



Fig. 5. - Produzione laterale in una cultura fortemente agitata di 24 ore di sviluppo. (Sistema con antivortici, 620 g. p. m., 75 mm ϕ) \times 150.



Fig. 6. - Micelio prodotto in condizioni di leggera agitazione quando la corrente di aria è sostituita con ossigeno. (Sistema con antivortici, 350 g. p. m., 75 mm ϕ) \times 150.

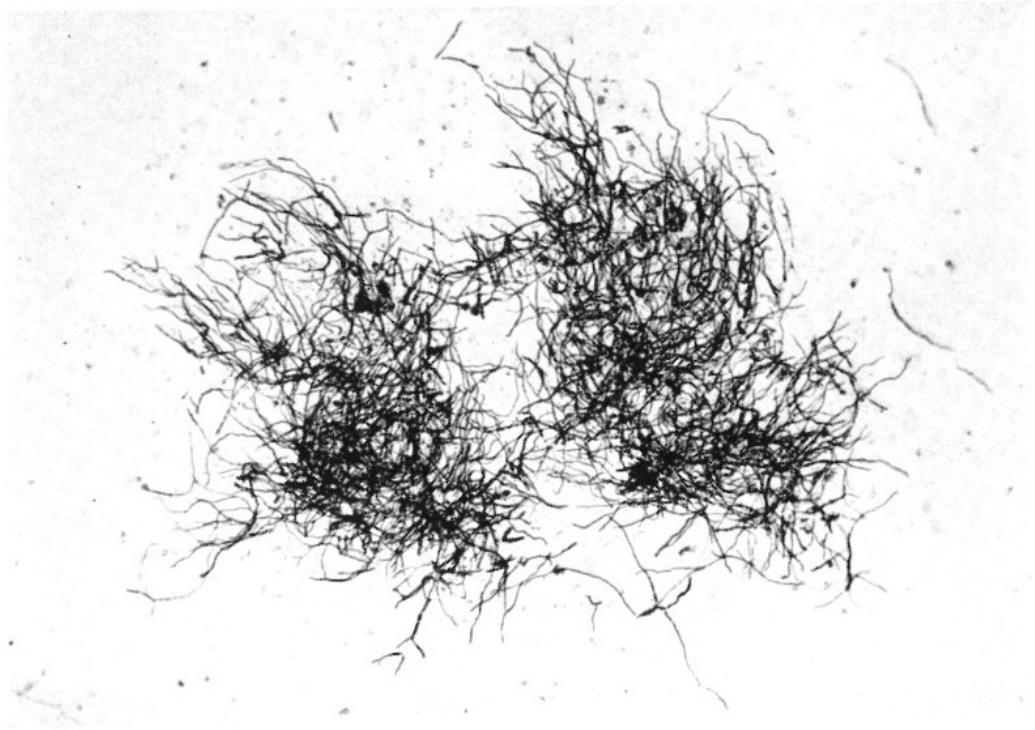


Fig. 7. - Micelio lungo, filamentoso dopo 72 ore di sviluppo in fermentatore da 3.000 litri. (Sistema con diffusore di aria, 350 g. p. m., 350 mm ϕ) \times 150.



Fig. 8. - Micelio lungo, filamentoso e palletta dopo 47 ore di sviluppo in fermentatore da 12.000 litri. (Sistema con antivortici, 160 g. p. m., 600 mm ϕ) \times 150.

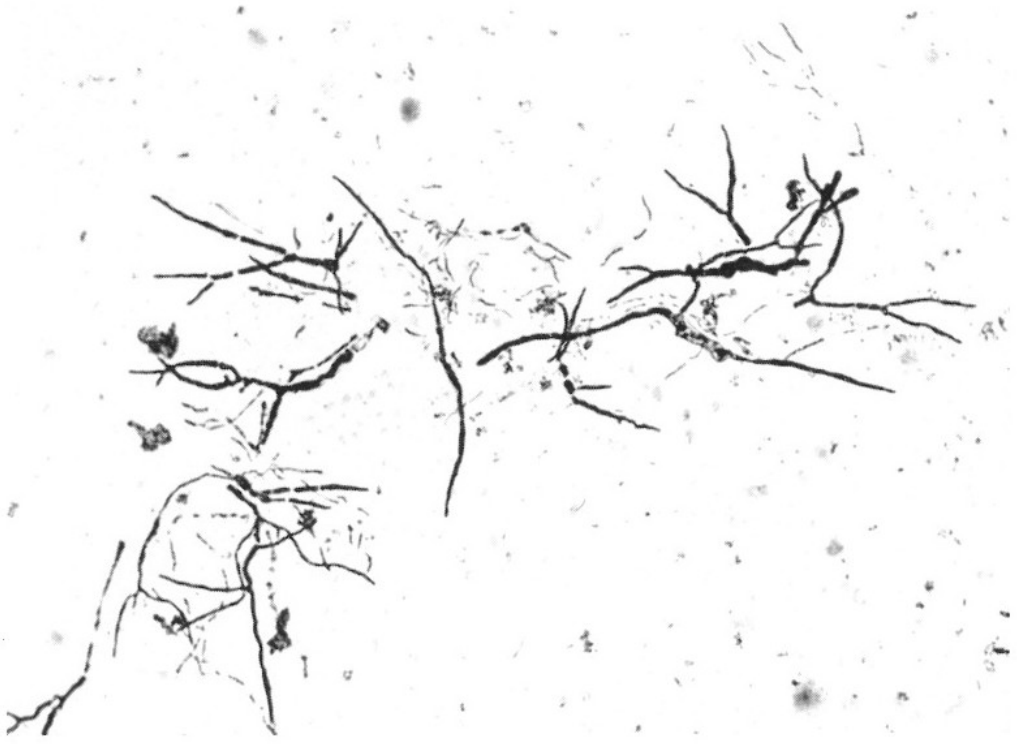


Fig. 9. - È visibile l'effetto dell'eccessiva agitazione meccanica dopo 46 ore di sviluppo. (Sistema a vortice, 1850 g. p. m., 65 mm ϕ) \times 300.



Fig. 10. - Nuova crescita di ife ispessite, ramificate dopo repentina e completa autolisi della cultura. (Sistema a vortice, 750 g. p. m., 90 mm ϕ) \times 300.

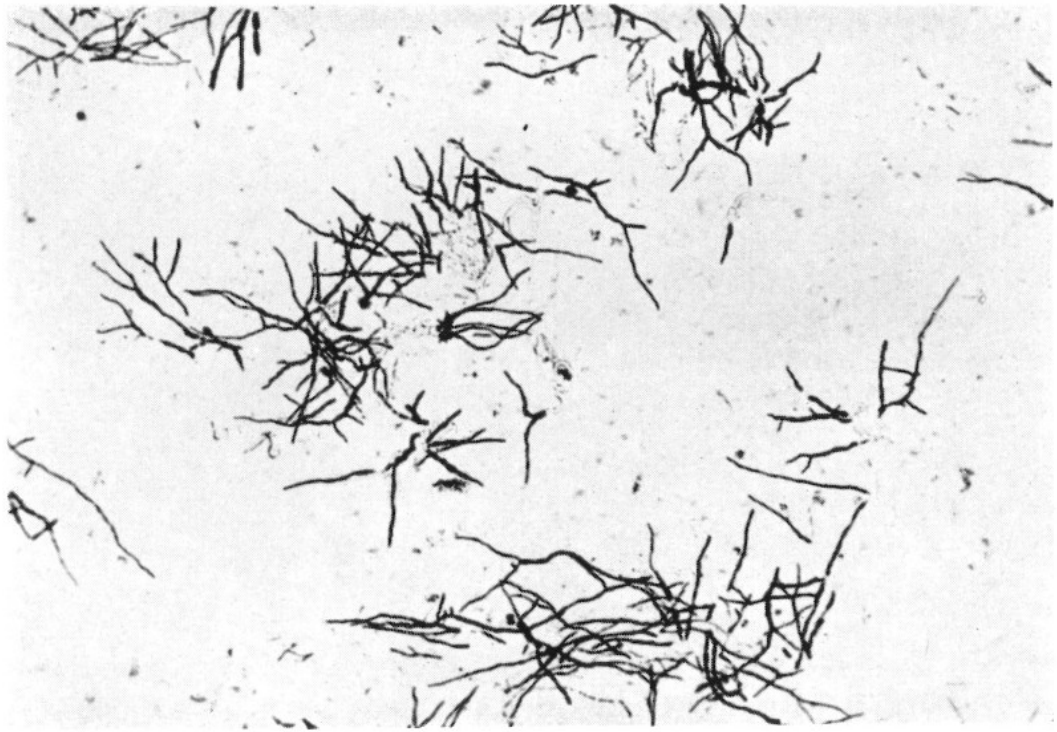


Fig. 11. - Micelio corto, ramificato dopo 72 ore di sviluppo in fermentatore da 3.000 litri con intensa agitazione. (Sistema a vortice, 760 g. p. m., 350 mm ϕ) \times 225.

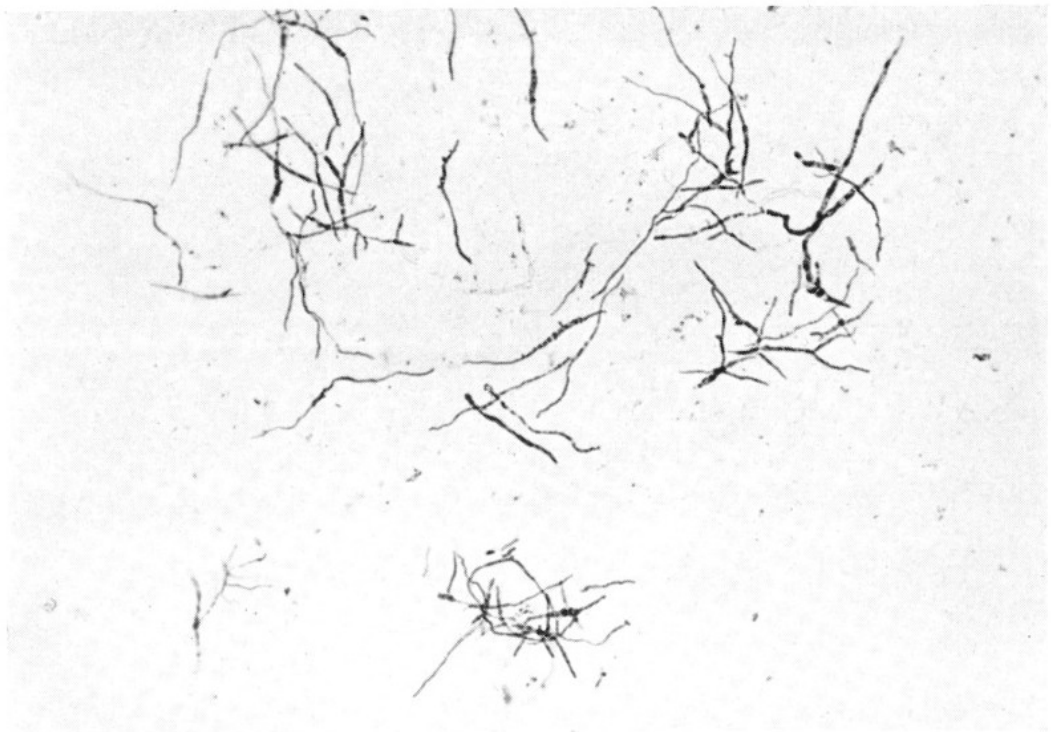


Fig. 12. - Micelio corto, sottile, poco ramificato dopo 72 ore di sviluppo in fermentatore da 3.000 litri. Questo micelio era cresciuto con lo stesso valore di aerazione di quello mostrato in fig. 11 ma con differenti condizioni di agitazione. (Sistema a vortice, 1460 g. p. m., 200 mm ϕ) \times 225.

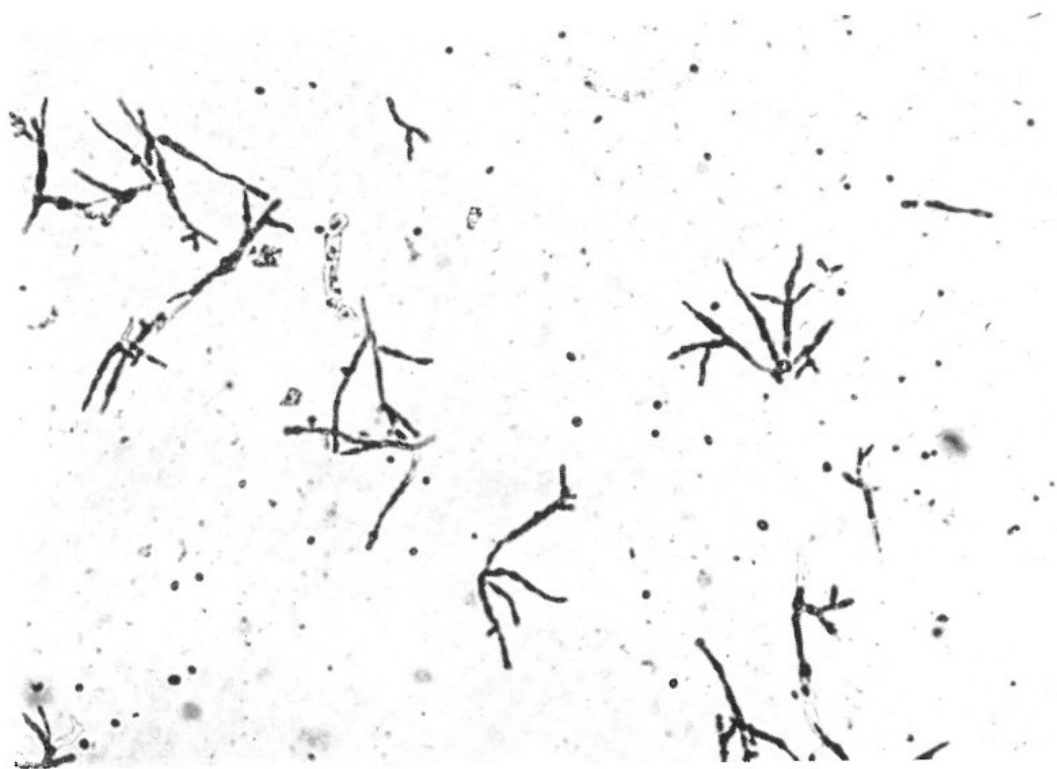


Fig. 13. - Produzione di conidi in condizioni di intensa agitazione. Le fialidi sono inserite direttamente sul micelio frammentato. (Sistema a vortice, 750 g. p. m., 90 mm ϕ) \times 250.

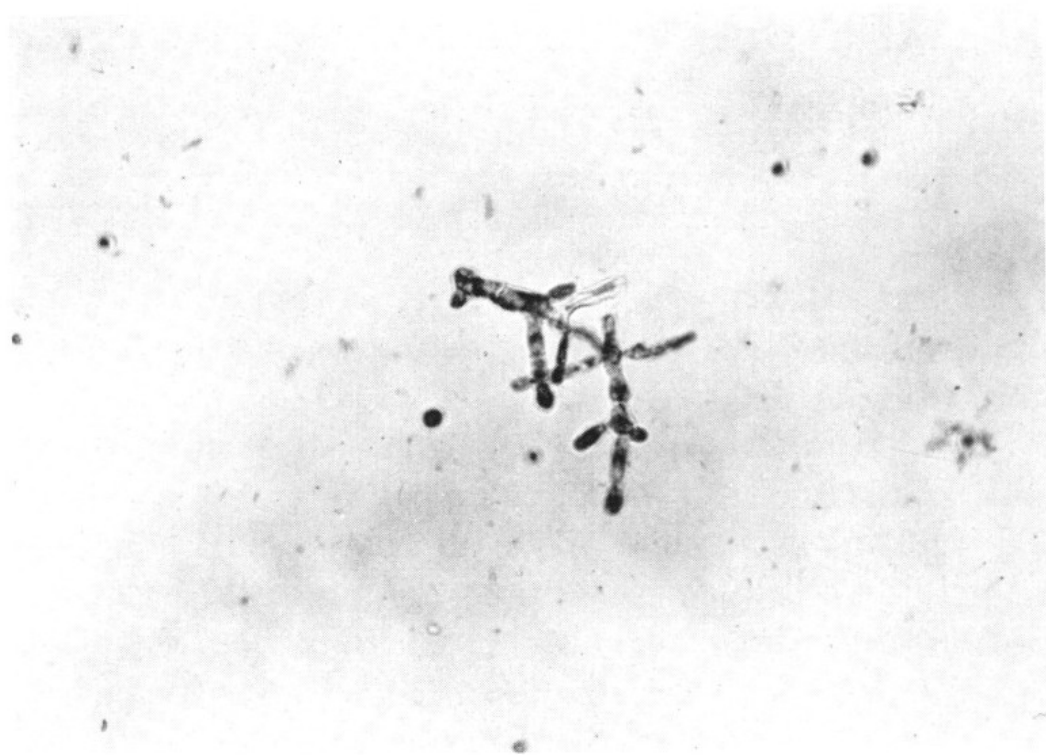


Fig. 14. - Corta unità ifale produttrice conidi. (Sistema a vortice, 750 g. p. m., 90 mm ϕ) \times 450.

tazioni non si osservava, in genere, autolisi nelle culture giovani, in contrasto con la leggera ma continua autolisi rivelata a 350 g.p.m.

Quando l'agitazione era intensa, con velocità di rotazione della elica di 800 g.p.m., il micelio era corto e ramificato dopo il primo giorno. Tuttavia, in queste culture era sempre presente una notevole quantità di ife in autolisi; esse erano già evidenti 24 ore dopo il trasferimento e il loro numero aumentava sempre più, finchè a 74 ore la metà circa delle ife erano vuote e quelle vive erano rotte in brevi frammenti non ramificati e sottili. Da tali frammenti si aveva un accenno di nuova crescita, ma le culture rimanevano generalmente in non buone condizioni.

L'effetto di una forte agitazione meccanica non era solo quello di accorciare le unità ifali, ma anche di accorciare la lunghezza delle singole cellule entro ciascuna unità. Questo è stato messo in evidenza attraverso misure micrometriche della lunghezza totale delle unità ifali e delle distanze tra i setti entro le unità stesse; i risultati di tali misure sono riportati nella tavola 4.

TAVOLA 4

Effetto dell'agitazione sulle dimensioni delle unità ifali (fermentatori da 10 litri, sistema con antivortici e diffusore d'aria).

Diametro dell'elica a pale	g. p. m.	Caratteristiche miceliali					
		24 ore dopo l'inoculo			72 ore dopo l'inoculo		
		Tipo di micelio	Lunghezza delle unità ifali	Lunghezza delle cellule	Tipo di micelio	Lunghezza delle unità ifali	Lunghezza delle cellule
75 mm	360	lungo	> 250 μ	35.28 μ	lungo	> 250 μ	32.76 μ
75 mm	600	lungo	250 μ	27.38 μ	corto	170 μ	17.01 μ

Con leggera agitazione in presenza di antivortici la lunghezza cellulare, di circa 35 μ , rimaneva quasi costante per 72 ore: con più alte velocità di agitazione, la lunghezza cellulare era già inferiore dopo 24 ore e risultava ulteriormente ridotta dopo 72 ore di crescita.

La frequenza delle ramificazioni è un'altra caratteristica miceliale che è fortemente influenzata dall'intensità dell'agitazione. Ciò è difficile a valutarsi quantitativamente; in un micelio lungo è quasi impossibile osservare il numero delle ramificazioni su una lunga ifa intricata, ma in condizioni di leggera agitazione era normale per le unità ifali della lunghezza di 250-300 μ non presentare ramificazioni, in una cultura di 70 ore. Con un'agitazione più intensa, unità ifali lunghe 170 μ dopo 72 ore di crescita avevano una media di 4,5 ramificazioni per unità, mentre

unità ifali della stessa età lunghe 80 μ presentavano, con sistema di agitazione a vortice, una media di 2,4 ramificazioni per unità.

La frequenza delle ramificazioni aumenta quindi con l'aumentare di intensità dell'agitazione.

E' ovvio che, poichè non vi sono differenze significative tra le velocità di crescita di culture sviluppate con leggera o forte agitazione, le modificazioni prodotte dall'agitazione meccanica nell'aspetto del micelio vanno dal semplice allungamento con formazioni di poche ramificazioni, alla produzione di molte ife brevi con abbondante ramificazione.

Effetto dell'ossigeno sullo sviluppo miceliale in fermentatori agitati.

Per studiare lo sviluppo miceliale in presenza di un eccesso di ossigeno, ma in condizioni di leggera agitazione, furono condotte delle esperienze nei fermentatori da 10 litri con antivortici, insufflando ossigeno anzichè aria nel liquido culturale, mentre la velocità dell'elica (75 mm di diametro) era ridotta a 350 g.p.m.

Si sperava in tal modo di ottenere, in condizioni di adeguata aereazione, un micelio di tipo lungo, filamentoso, come quello che si sviluppa a questa velocità di agitazione, cui corrisponde un valore di aereazione inferiore alla richiesta minima.

Si osservò una notevole differenza nell'aspetto del micelio in confronto alle condizioni normali, quando cioè l'aereazione era fornita a mezzo di una corrente d'aria: le ife erano ispessite e intensamente colorate, più brevi e più appuntite, e somigliavano alle ramificazioni cespugliose delle culture intensamente agitate. Dopo 48 ore di crescita il micelio si spezzettava in brevi frammenti irregolari, che erano più spessi e ramificati di quelli prodotti nelle normali condizioni (fig. 6). E' quindi evidente che l'ossigeno ha un effetto simile a una vigorosa agitazione meccanica.

Lo scopo principale per cui l'esperienza era stata progettata, il conseguimento cioè di un micelio lungo in condizioni di adeguata aereazione, non fu dunque raggiunto nei piccoli fermentatori. E non sembra in effetti possibile ottenere queste condizioni se non in fermentatori di maggiori dimensioni.

L'effetto dell'ossigeno sull'aspetto morfologico del micelio di *P. chysogenum* è particolarmente evidente nel mezzo sintetico di Jarvis e Johnson (vedi CHAIN e PIRT, 1954).

Queste esperienze mostrano che la sostituzione dell'aria con ossigeno in una fermentazione può avere conseguenze che non sono necessariamente limitate all'aumento della velocità di aereazione, e che il forte

aumento della concentrazione di saturazione dell'ossigeno in soluzione, dovuto all'aumentata pressione parziale, può causare cambiamenti particolari di natura più o meno profonda nel metabolismo dell'organismo in esame.

Non è quindi sempre possibile aumentare la velocità di aereazione aumentando semplicemente la tensione di ossigeno senza causare imprevedibili alterazioni nel metabolismo; si deve accertare in ogni singolo caso se tali alterazioni si producono o meno.

Fermentatore da 3.000 litri. — In generale, in più grandi volumi di mezzo culturale le unità ifali erano meno uniformi in lunghezza che nei piccoli fermentatori.

Nel fermentatore da 3.000 litri il micelio era preminentemente di tipo lungo, filamentoso (fig. 7). Esso conteneva, tuttavia anche molti brevi e sottili frammenti non ramificati.

Con l'invecchiare della cultura, le ife tendevano ad accorciarsi e cominciavano a rendersi evidenti autolisi e vacuolizzazione, che divenivano notevoli dopo 72 ore.

Si è eccezionalmente osservata una tendenza alla formazione di pallette.

Fermentatori da 12.000 litri. — In questi fermentatori l'aereazione era alta, cosicchè il mezzo di cultura conteneva un eccesso di ossigeno in soluzione per tutta la durata della fermentazione.

Le ife formate erano sempre del tipo lungo, filamentoso, sia in presenza che in assenza di setti antivortici (fig. 8). Dopo 48 ore di crescita si rendeva evidente un inizio di autolisi, che aumentava di intensità con l'invecchiare della cultura.

Un aspetto caratteristico delle culture sviluppate in questi grandi fermentatori era la formazione di pallette, una piccola proporzione delle quali è risultata di natura scleroziale (GOPALKRISHNAN e THIRUMALACHAR, osservazioni non pubblicate) mentre la maggior parte è simile per natura e morfologia alle pallette formate in beute agitate (CAMICI, SERMONTI e CHAIN, 1952). Il numero e le dimensioni delle pallette variava notevolmente nelle diverse fermentazioni, e i fattori responsabili della loro formazione non sono ancora completamente conosciuti.

E' stato dimostrato⁽¹⁰⁾ che nei piccoli fermentatori le pallette scleroziali appaiono in particolari e ben definite condizioni. Esse comportano una leggera agitazione meccanica che non interferisca con la formazione

⁽¹⁰⁾ THIRUMALACHAR M. J. e GOPALKRISHNAN K. S. - Atti Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci., 14: 691 (1953).

delle colonie e, allo stesso tempo, il mantenimento di una adeguata aereazione nel liquido culturale.

Tali condizioni sono soddisfatte nei fermentatori da 10 litri, quando la velocità di agitazione (con eliche del diametro di 75 mm) è ridotta a 350 g.p.m., mentre una buona aereazione è realizzata disperdendo l'aria (un ugual volume d'aria per volume di liquido per minuto) attraverso grandi diffusori di acciaio inossidabile di diametro pari a quello del fermentatore. In queste condizioni appaiono in cultura un gran numero di pallette miceliali che sono state riconosciute quali forme vegetative di natura scroziale.

L'efficienza di aereazione E_r è circa la stessa per piccoli e grandi fermentatori; cioè la potenza totale assorbita per unità di volume per l'aereazione dei fermentatori da 10 litri con antivortici, nelle condizioni di agitazione ed aereazione in cui compare la forma miceliale corta, è circa la stessa di quella totale assorbita per unità di volume per l'aereazione di un fermentatore di 12.000 litri, in cui il micelio cresce nella forma filamentosa ed a pallette (CHAIN e GUALANDI, 1954).

La potenza totale richiesta per produrre una data aereazione si compone di due frazioni: l'energia richiesta per la produzione di aria, e quella richiesta per la dispersione dell'aria nel liquido culturale, mediante agitazione meccanica. Benchè la potenza totale assorbita per unità di volume di fluido culturale non cambi molto con l'aumentare del volume, il rapporto tra la potenza assorbita per l'agitazione meccanica e la potenza assorbita per la produzione dell'aria diminuisce con l'aumento del volume del fermentatore. Questo significa che, aumentando i volumi di un liquido culturale, a parità di flusso d'aria, una maggiore proporzione dell'energia spesa per l'agitazione meccanica è utilizzata per la dispersione dell'aria e minor energia è assorbita dal mezzo culturale. Quindi, l'intensità di agitazione per unità di volume è ridotta con l'aumento del volume del fermentatore, e con essa l'intensità delle forze taglienti nel mezzo di cultura, cui il micelio è esposto, e che sono responsabili dell'accorciamento delle ife, della loro frammentazione e di altri effetti morfologici descritti sopra come risultati di agitazione intensa.

Sviluppo miceliale in fermentatori agitati con sistema di aereazione a vortice.

1) *Fermentatori da laboratorio da 10 litri.* — Sono state usate due eliche con differenti velocità di rotazione, come indicato nella Tavola 2.

Con l'elica di diametro inferiore (65 mm) e un'agitazione di 900

g.p.m. si sviluppava un micelio corto, molto simile a quello osservato nei fermentatori con antivortici, a una velocità di agitazione di 600 g.p.m.

Per le prime 24 ore dopo l'inoculo le ife rimanevano lunghe. Durante questo periodo esse producevano molte branche laterali; quindi le ife lunghe si rompevano, liberando le brevi ramificazioni laterali. Il micelio era così trasformato nella forma « corta ».

A 48 ore la lunghezza media delle unità ifali era 128 μ e le ife erano molto sottili, con diametro di 2-3 μ . In esse si osservava una limitata continua autolisi.

Le singole cellule erano già molto corte dopo 27 ore di crescita e diminuivano ancora di lunghezza dopo 72 ore.

Quando l'intensità dell'agitazione saliva a 1.200 g.p.m. e oltre, il corso dello sviluppo miceliale nei primi stadi fermentativi era simile a quello che si osservava a 900 g.p.m., ma lo stabilirsi del tipo morfologico caratteristico negli ultimi stadi della fermentazione era prevenuto dall'autolisi del micelio.

Il grado di autolisi diveniva sempre più pronunciato con l'aumentare della velocità di agitazione ed era molto elevato a 1450 e 1850 g.p.m. La metà delle ife erano continuamente in autolisi a 1850 g.p.m.

A questa alta velocità il micelio aveva aspetto rotto e frammentato (fig. 9), con frammenti che variavano da 10 μ a 200 μ di lunghezza, e spesso mostravano estremità frastagliate nei punti di rottura.

Il micelio inoltre era composto di un insieme di ife sottili ed ife ispessite. Le ife ispessite rappresentavano nuova crescita dai frammenti svuotati; molte di esse presentavano estremità claviformi e grosse cellule sferiche intercalari.

Con un'elica di 90 mm di diametro e una velocità di agitazione di 500 g.p.m. le ife lunghe, dopo trasferimento dal primo fermentatore, producevano numerosi ramuli laterali assottigliati. Questi, in seguito alla rottura delle ife originali, formavano il micelio corto; le unità miceliali erano lunghe 110 μ a 48 ore e le ife avevano il diametro di circa 2-3 μ . Successivamente si produceva un leggero allungamento, ma il micelio rimaneva sempre corto. Con l'invecchiare della cultura si osserva un aumento di cellule vuote, ma una autolisi generale non si osservava, in genere, prima di 90 ore dal trasferimento.

Portando il numero dei giri dell'elica a 750 p.m. la produzione di rami laterali nei primi stadi della crescita aumentava moltissimo e si potevano spesso osservare formazioni « a scopa ».

Quando si formava il micelio corto la lunghezza media dei frammenti era di 80 μ a 72 ore, cioè meno della metà della lunghezza delle unità

che si formavano quando la velocità di agitazione era di 360 g.p.m. (fig. 2). Queste unità ifali contenevano una media di 2,4 rami per unità, le ife erano leggermente ispessite, con un calibro da 3 μ a 4 μ e talvolta continuavano a crescere, formando sottilissimi prolungamenti del calibro di 1 μ agli apici dei frammenti ispessiti.

Vi era un aumento nel numero di cellule svuotate, particolarmente al centro delle unità ifali, ma, in genere, non si osservava autolisi in queste culture.

L'accorciamento delle singole cellule entro una unità ifale era ancora un aspetto caratteristico del micelio cresciuto sotto tali condizioni (v. Tav. 5).

TAVOLA 5

Effetto dell'agitazione sulle dimensioni delle unità ifali (sistema di aereazione a vortice).

Diametro dell'elica a pale	g. p. m.	Caratteristiche miceliali					
		24 ore dopo l'inoculo			72 ore dopo l'inoculo		
		Tipo di micelio	Lunghezza delle unità ifali	Lunghezza delle cellule	Tipo di micelio	Lunghezza delle unità ifali	Lunghezza delle cellule
90 mm	750	lungo	250 μ	15.33 μ	corto	80 μ	9.13 μ

Fermentatori da 3.000 litri. — Con una velocità di agitazione di 700 g.p.m. e un'elica del diametro di 350 mm, il micelio era breve ed ispessito, e si sviluppa come quello dei piccoli fermentatori, benchè le unità ifali fossero meno uniformi in lunghezza.

Nonostante che la ramificazione fosse intensa, non si osservavano le formazioni « a scopa ». Il micelio era un tipico micelio corto con ife ispessite e appuntite e con lunghezza media di 98 μ a 72 ore.

Queste culture mostravano, con l'invecchiare, un numero crescente di cellule svuotate, caratteristica del micelio corto.

Quando le dimensioni dell'elica erano ridotte ad un diametro di 200 mm, e la velocità di agitazione era portata a 1460 g.p.m., l'aereazione era identica a quella della precedente esperienza (Tav. 3), ma il micelio formato era più lungo, con unità ifali della lunghezza media di 113 μ (fig. 12).

In queste culture le ife erano molto sottili, meno ramificate, e non avevano la caratteristica forma appuntita del micelio corto.

Le produzioni di penicillina erano molto basse, dell'ordine di 400 u/ml, contro circa 1000 u/ml prodotte dal micelio più corto e ramificato.

Autolisi e nuova crescita. — In tutte le culture, con l'invecchiare del micelio, vi era un graduale aumento nel numero di cellule svuotate, in seguito alla migrazione del citoplasma negli apici delle ramificazioni ifali. Ciò era particolarmente evidente nel micelio « corto ».

In contrasto con questo processo, in alcune culture l'intero contenuto ifale si disorganizzava e scompariva, lasciando le pareti svuotate con appena alcuni frammenti di contenuto cellulare: questo fenomeno è stato chiamato autolisi.

Nelle esperienze con fermentatori da 10 litri, dove l'agitazione era stata regolata in modo da avere una sufficiente aereazione senza eccessivo danno meccanico (cioè con l'elica da 90 mm rotante a 750 g.p.m.) l'autolisi era minima.

In altre esperienze con più alte velocità di agitazione, una certa proporzione di ife andava costantemente soggetta all'autolisi, benchè il peso secco miceliale fosse in continuo aumento. In qualche raro caso l'intero micelio si autolizzava improvvisamente nel corso di poche ore.

In alcuni casi di completa autolisi, ma non sempre, aveva luogo una nuova crescita, rappresentata da ife spesse, claviformi che crescevano lentamente e spesso aggregate in pallette (fig. 10).

DUCKWORTH e HARRIS (1949) hanno osservato fasi alterne di crescita e di autolisi e le hanno considerate come un aspetto caratteristico delle fermentazioni in cultura sommersa in fermentatori agitati, in terreno a base di corn-steep. Gli autori hanno tuttavia osservato lo stesso fenomeno solo in casi eccezionali in terreni contenenti *corn-steep*, benchè esso abbia luogo in mezzi sintetici (CHAIN e PIRT, 1954).

Produzione di spore. — La produzione di spore è stata relativamente rara in queste esperienze ed è stata osservata solo quando il micelio era molto corto.

Da un micelio corto non sono mai state prodotte spore nei fermentatori da 10 litri, durante il corso di queste esperienze, che non durarono generalmente più di 140 ore, benchè si siano prodotti pochi conidi in fermentatori da 12.000 litri, in presenza di antivortici.

La produzione di spore è stata più frequente col sistema a vortice nei fermentatori da 10 litri con elica da 90 mm e velocità di agitazione pari a 750 g.p.m., ma ha avuto luogo anche in fermentatori con antivortici, con un'elica da 75 mm, ruotante a 600 g.p.m.

In queste condizioni erano assenti sia conidiofori, sia tipici penicilli, e il micelio produceva direttamente sterigmi di 5-10 μ di lunghezza e 2,5-3,5 μ di diametro (figg. 13-14), isolati, o — eccezionalmente — in gruppi di due o tre.

Il contenuto del micelio parrebbe essere gradualmente impiegato nella produzione delle spore; in una vecchia fermentazione fu possibile osservare due o tre sterigmi attaccati a frammenti miceliali completamente svuotati.

I conidi avevano dimensioni normali e in un caso furono prodotti in numero tale da rendere il mezzo verdastro.

TAVOLA 6

Correlazione tra intensità di agitazione e produzione di penicillina in fermentatori da 10 litri.

g. p. m.	Diametro dell'elica	Produzione massima di penicillina unità ml
	<i>Sistema con antivortici</i>	
360	75 mm	460
530	75 mm	785
600	75 mm	1330
830	75 mm	1020
	<i>Sistema a vortice</i>	
900	65 mm	625
1200	65 mm	510
1450	65 mm	400
1850	65 mm	390
560	90 mm	565
750	90 mm	1435

Correlazione tra intensità di agitazione e produzione di penicillina.

La Tavola 6 mostra la correlazione tra l'intensità dell'agitazione e la produzione di penicillina.

Come si può vedere, le produzioni di penicillina sono basse ad alte velocità di rotazione, sia nel sistema di aereazione a vortice sia in quello con antivortici. Ciò è probabilmente dovuto al danno subito dal micelio.

Nello scegliere le più appropriate velocità e dimensioni delle eliche è evidentemente necessario contemperare l'esigenza di un'agitazione bassa che non causa danno meccanico alle cellule ma dà un'insufficiente aereazione, con quella di un'agitazione alta, che produce una forte aereazione ma causa danno alle cellule.

Nei sistemi di aereazione a vortice le più alte produzioni di peni-

cillina sono state ottenute nei fermentatori da 10 litri con elica da 90 mm e velocità di rotazione di 750 g.p.m. In queste condizioni l'aereazione era circa la stessa di quella ottenuta con elica da 65 mm e velocità di rotazione di 1450 g.p.m., ma l'elica rotante più velocemente causava una maggiore autolisi e le produzioni di penicillina risultavano basse.

DISCUSSIONE

Le ricerche sopra riferite mostrano che l'azione di rottura prodotta da un'intensa agitazione meccanica ha un notevole effetto sull'aspetto morfologico del micelio di *P. chrysogenum*, ceppo 47.1564 Wis., fatto sviluppare in fermentatori agitati.

Gli effetti più evidenti dell'agitazione meccanica sono l'accorciamento delle unità ifali, l'accorciamento e l'ispessimento delle singole cellule entro l'unità ifale, e la stimolazione della ramificazione.

I cambiamenti sono tanto più pronunciati quanto più intensa è l'agitazione, ma quando l'intensità di agitazione supera certi limiti interviene una completa autolisi.

Benchè la crescita globale, risultante dalla misura del peso secco, sia la stessa per culture sviluppate con differenti intensità di agitazione, la proporzione di ife giovani per unità di peso secco è più grande nel micelio corto, ramificato, sviluppato sotto l'influenza di una forte agitazione, che nel micelio lungo e filamentoso sviluppato quando l'agitazione è bassa. Ci si deve quindi attendere che l'attività metabolica del micelio sviluppato in condizioni di intensa agitazione meccanica sia quantitativamente e qualitativamente diversa da quella di un micelio sviluppato in condizioni di agitazione meccanica bassa o completamente assente.

Questo è un fattore importante di cui si deve tener conto nell'interpretazione delle differenze osservate nel corso di fermentazioni fungine condotte in fermentatori di diverse grandezze.

Esso può, ad esempio, essere responsabile del fatto frequentemente osservato, che certi prodotti metabolici, ottenuti in alte produzioni in piccoli fermentatori da laboratorio, si ottengono in produzioni molto più basse in fermentatori su scala industriale, benchè tutte le variabili controllabili, come la composizione del terreno di cultura e l'intensità dell'aereazione, fossero mantenute rigorosamente identiche.

D'altro lato, poichè l'intensità di aereazione dipende dal grado di agitazione meccanica, può non essere sempre possibile raggiungere il grado di aereazione desiderato in piccoli fermentatori, senza eccessivo danno al micelio e conseguenti profondi cambiamenti nel suo metabolismo.

In tali casi possono aversi risultati soddisfacenti solo adottando fermentatori di maggiore capacità, ove un'alta intensità di aereazione si può raggiungere con un'intensità di agitazione meccanica per unità di volume più bassa di quella necessaria per ottenere la stessa aereazione nei piccoli fermentatori.

Benchè queste esperienze abbiano dimostrato le generali modificazioni morfologiche che si verificano durante la cultura sommersa con varie intensità di agitazione meccanica, gli autori si rendono conto che le reali dimensioni delle unità ifali e il grado di ramificazione sono influenzati altresì da altri fattori, quali la composizione del mezzo e la quantità e il tipo di olio usato come agente antischiuma.

Si è anche notato che i vari ceppi di *P. chrysogenum* differiscono notevolmente nella loro risposta all'agitazione meccanica.

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