

19. Anna CAMPOSANO, E. B. CHAIN e G. GUALANDI. — Effetto dell'agitazione meccanica sulla produzione di acido kogico in coltura sommersa. (*)

Riassunto. — La morfologia e il metabolismo di *Aspergillus flavus* in coltura sommersa, sono marcatamente influenzati dalla agitazione meccanica.

La produzione di acido kogico da glucosio, da parte di *A. flavus* in coltura sommersa è inversamente proporzionale alla intensità dell'agitazione in condizioni di aerazione prossime al livello di saturazione. Quando l'intensità di agitazione è elevata, come nei fermentatori con sistema Vortex, il micelio formato è corto e molto ramificato; questo tipo di micelio non possiede la proprietà di produrre acido kogico, ma forma nell'interno delle ife una sostanza di riserva amido-simile.

Nelle normali beute agitate il micelio si organizza in pallette fiocose che producono acido kogico in quantità pari ad una conversione del 30-40%.

Nei fermentatori rotanti, di speciale costruzione, e nei fermentatori a colonna di vetro, il micelio si organizza in fiocchetti lassi; forma che può considerarsi intermedia tra le pallette fiocose e il micelio filamentoso; queste danno una produzione di acido kogico pari ad una conversione del 15%.

Summary. — The morphology of the mycelium of *Aspergillus flavus* in submerged culture and its metabolism is markedly influenced by mechanical agitation. Thus, the production of kojic acid from glucose by *Aspergillus flavus* submerged culture, is inversely related to the intensity of the mechanical agitation under aeration conditions giving nearsaturation levels. When the agitation intensity is high, such as in stirred vortex fermenters or in vigorously stirred baffled shake flasks, the mycelium formed is short and strongly branched; this type of mycelium does not possess the property of producing kojic acid but deposits large quantities of starch. In normal shake flasks the mycelium is organised in flocculent pellets which produce kojic acid in conversion yields of about 30-40%. In rotating fermenters of special construction and in sparger aerated tube fermenters the mycelium is organised in an intermediate

(*) Questo lavoro, è già stato pubblicato nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 224 (1959).

flocculent form not quite approaching the structural firmness of loosely packed pellets; these produce a conversion yield of about 15% of kojic acid.

La conversione di glucosio ad acido cogico da parte di *Aspergillus flavus* in coltura sommersa in beute agitate è stata oggetto di studi da parte di KLUYVER e PERQUIN i quali usarono un terreno sintetico semplicemente.

I tentativi per riprodurre la formazione di acido cogico in fermentatori agitati usando lo stesso terreno di coltura incontrarono qualche difficoltà.

Venne deciso allora di analizzare i fattori responsabili del differente comportamento della muffa in beute agitate e in fermentatori agitati; la presente pubblicazione è un rapporto di questo lavoro.

MATERIALI E METODI

Ceppo. — Un ceppo di *Aspergillus flavus* n. 10124 ottenuto originariamente dalla collezione americana A.T.C.C. designato come ceppo F144 nella collezione del nostro laboratorio, è stato usato per gli esperimenti.

Terreno di sporulazione e produzione della sospensione di spore. — Le spore per la preparazione del micelio vegetativo erano prodotte in bottiglie di Roux su uno strato di orzo sterilizzato e ammorbidito con la soluzione sporulante di WHIFFEN e SAVAGE ⁽¹⁾ (glicerina 3 g, asparagina 1 g, acqua distillata 100 ml), indi inoculato con una coltura di spore del ceppo F144 mantenute in terra sterile. La produzione di spore cominciava dopo il terzo giorno e si completava dopo il decimo. Le spore venivano quindi dilavate dalla superficie dell'orzo con 50 ml di acqua distillata, la sospensione veniva prelevata e conservata in frigorifero per non più di otto giorni.

Terreno per la produzione di acido cogico e per la preparazione dell'inoculo vegetativo. — E' stato usato il terreno sintetico di KLUYVER e PERQUIN ⁽²⁾ (glucosio 100 g; $MgSO_4$ 2 g; NH_4NO_3 0,56 g; KH_2PO_4 0,33 g; H_3PO_4 0,33 g; acqua distillata fino a 1 litro; pH 3,5) con l'aggiunta di 0,1% di estratto di lievito Difco. La soluzione di glucosio era sterilizzata separatamente da quella dei sali e dell'estratto di lievito. Per la preparazione del terreno dei fermentatori, il glucosio, sciolto in acqua, veniva sterilizzato nell'interno del fermentatore stesso mentre le soluzioni dei

sali e dell'estratto di lievito erano aggiunte dopo essere state sterilizzate separatamente.

Il micelio vegetativo era ottenuto inoculando una sospensione di spore in 100 ml di terreno di produzione, posto in beute Erlenmeyer da 500 ml; la concentrazione finale delle spore era di 100.000-150.000 per ml; le beute erano tenute su agitatore rotatorio per 24 ore ed il micelio sviluppatosi era usato per l'inoculo vegetativo.

Condizioni della coltura sommersa. — Tutte le fermentazioni erano effettuate a 30°C. Sono state studiate differenti condizioni di fermentazione per la produzione di acido cogico.

1. - BEUTE AGITATE SU AGITATORE ROTATORIO.

a) *Beute normali.* — Furono usate per il lavoro di routine beute pyrex da 500 ml di tipo Erlenmeyer a collo largo (38 mm) contenenti 100 ml di terreno culturale. Queste erano tenute in agitazione con un movimento rotatorio (PALADINO ⁽³⁾); in queste condizioni la diffusione dell'ossigeno determinato con il metodo del solfito era di 30 ml di O₂ per 100 ml di soluzione per ora.

Allo scopo di assicurare un'atmosfera gassosa di composizione costante nelle beute agitate durante la fermentazione un flusso d'aria, o di miscele varie di ossigeno-azoto, era fatto passare attraverso la beuta sulla superficie libera del liquido culturale. Il flusso di gas uscendo da un compressore o, nel caso di miscele ossigeno-azoto, da una bombola, passava attraverso un doppio filtro di cotone indi si distribuiva alle diverse beute per mezzo di un tubo di rame e più vie, fissato sul piano dell'agitatore. Le cannule di uscita del tubo distributore erano collegate alle beute mediante tubi di gomma, il cui deterioramento per frizione era evitato tenendoli corti il più possibile. Il flusso gassoso infine entrava nelle beute chiuse da un tappo di gomma attraversato da due corti tubi di vetro, di cui quello di entrata portava un filtro e quello di uscita un piccolo zaffo di cotone.

b) *Beute di acciaio inossidabile.* — Per studiare l'effetto dell'acciaio sull'andamento della fermentazione, furono costruite delle beute della stessa forma e dimensione di quelle normalmente adoperate, ma fatte in acciaio della stessa composizione di quello usato per i fermentatori agitati.

c) *Beute munite di antivortici.* — Pochi esperimenti furono effettuati con questo tipo di beute in cui turbolenza ed aerazione sono molto maggiori che non nelle normali beute agitate (CHAIN e GUALANDI) ⁽⁴⁾. Le

beute Erlenmeyer in vetro pyrex di 500 ml contenenti 100 ml del terreno di coltura avevano il collo di eguale diametro ma di altezza doppia di quelle normali onde evitare che gli spruzzi raggiungessero il tappo. Un antivortice di forma rettangolare (80 mm $\times$ 25 mm) era saldato alla parete interna e al fondo della beuta, la quale, dopo essere stata temperata in muffola per diversi giorni poteva essere adoperata senza pericolo di rottura.

2. - FERMENTATORI AGITATI.

Tra i fermentatori di acciaio inossidabile (CHAIN e al.) ⁽⁵⁾ furono impiegati quelli da 10 l e quelli di 90 l. Nei primi il volume della coltura fermentante era di 5 l, nei secondi di 50 l.

3. - FERMENTATORI ROTANTI.

Per studiare l'effetto sulla produzione di acido cogico di un sistema di aerazione, ottenuto mediante un meccanismo diverso da quello normalmente usato nei fermentatori aerati col sistema vortex o con sparger, è stato costruito un tipo di fermentatore simile per il principio a quello detto a tamburo rotante già usato da HERRICK e al. ⁽⁶⁾ e da GASTROCK e al. ⁽⁷⁾.

Il nuovo tipo di 15 l di capacità, è di aspetto simile ai fermentatori di acciaio inossidabile da 10 l ma posto orizzontalmente; esso rimane fermo, ma nel suo interno ruota un sistema di 4 gronde equidistanti fra loro fissate su due anelli perimetrali di acciaio inossidabile adiacenti ai due estremi interni di questo cilindro orizzontale. Le gronde di acciaio inossidabile, ruotando sollevano parte del liquido colturale fino al livello più alto e facendolo poi ricadere nella massa in forma di un velo d'acqua, determinano l'aerazione di esso attraverso la sua superficie largamente esposta. I dettagli di costruzione del fermentatore e delle gronde rotanti sono riportati in una nota separata (CHAIN, UGOLINI, UGOLINI) ⁽⁸⁾.

Le misure dell'aerazione effettuate col solfito secondo il metodo di COOPER, FERNSTROM, MILLER ⁽⁹⁾ sono esposte nella Tabella 1. Si è notato che la diffusione dell'ossigeno era indipendente dal flusso d'aria entro i limiti 2-5 l/minuto.

Per ridurre ulteriormente l'azione meccanica di attrito sul micelio del sistema di aerazione con le gronde rotanti, queste sono state sostituite da una spirale rotante. Questa è costituita da una lamina di acciaio

inossidabile larga 55-60 cm e lunga 90 cm, avvolta a spira sì da formare 3 giri. La spirale ruotando con una velocità di 17 r.p.m. dà una aerazione del valore di 33 ml O₂ e 46 ml O₂ per 100 ml di soluzione di solfito per ora.

TABELLA 1

Diffusione dell'ossigeno nel fermentatore a gronde rotanti.
Contenuto: 5 l di soluz. 0,5 N di solfito.

Velocità di rotazione delle gronde r. p. m.	ml O ₂ assorbiti per 100 ml solfito /h
12	43
40	185
80	272

4. - FERMENTATORI A COLONNA.

Numerose fermentazioni furono effettuate in cilindri di vetro alti 112 cm e del diametro di 8,5 cm; questi erano riempiti con 4 l di liquido colturale, che arrivava ad un livello di 73 cm dal fondo, e veniva aerato con un getto d'aria umidificata uscente da un ugello saldato sul fondo del cilindro. Le misure di aerazione effettuate con solfito, per ugelli di diversi diametri e flusso d'aria di 1 volume o 1/2 volume per volume di liquido per minuto sono dati nella Tabella 2.

TABELLA 2

Diffusione dell'ossigeno in fermentatori a cilindro.
(Contenuto totale della soluzione di solfito: 4 l).

Diametro dell'ugello in mm	Flusso di gas l per min.	ml O ₂ assorbiti per 100 ml soluz. di solfito per ora	
		aria	ossigeno
1.2	4	52	188
1.2	2	19	62
1.6	4	43	188
1.6	2	14.5	37
6.0	4	28	160
6.0	2	12	60

Da questi dati si rileva che i valori dell'aerazione con 1/2 volume di ossigeno per volume di solfito per ora sono più alti che non nelle beute.

METODI ANALITICI.

Acido cogico. — E' stato determinato colorimetricamente col metodo TAMYA modificato da ARNSTEIN (¹⁰). Le letture colorimetriche sono state fatte con colorimetro Hilger Spekker, usando il filtro 603 verde-blu.

Glucosio. — E' stato usato il metodo SOMOGY (¹¹). L'acido cogico è per sè stesso riducente in queste condizioni; 1 g di acido cogico corrisponde a 0,66 g di glucosio. Questo valore veniva sottratto dalla quantità totale di glucosio trovata.

pH. — I valori di pH erano determinati elettrometricamente con pH metro SIS.

Peso secco. — A fine fermentazione 100 g di brodocoltura veniva filtrata ed il micelio, lavato ed essiccato a 100°C per 12 ore, veniva pesato.

Osservazioni morfologiche. — Ogni 24 ore venivano effettuate le osservazioni morfologiche sul micelio sia a fresco sia colorato con bleu cotton al lattofenolo.

RISULTATI

La produzione di acido cogico in beute ed in fermentatori. — La produzione di acido cogico nelle normali beute agitate tappate con cotone nelle condizioni esposte sopra, cominciava intorno alla 48^a ora ed aumentava fino ad un valore massimo di 1,5-3 g/100 ml dopo 120 h, con una conversione del 24-34% del glucosio utilizzato. I valori che seguono rappresentano la produzione di acido cogico in beute in esperienze condotte in triplo e danno una idea della riproducibilità: 1.9; 1.44; 1.40; 2.8; 2.9; 2.2; 1.8; 2.0; 2.3; 3.5; 3.3; 3.4; 2.7; 3.1; 2.8.

Il peso secco variava tra 0,6 e 0,9 per cento. Quando si aumentava la quantità di autolisato di lievito oltre il 0,1%, la resa di acido cogico diminuiva mentre il peso secco del micelio formato, aumentava. Le rese più basse di queste esperienze si devono probabilmente a deficiente aerazione.

Quando si ometteva l'aggiunta di autolisato di lievito nel liquido culturale, la produzione di acido cogico decresceva fino a valori del 0,7-1,4 g/100 ml, ed il peso secco del micelio era del 0,35-0,40 per cento.

Contrariamente a quanto avviene in beuta, non si è ottenuta produ-

zione di acido cogico nei fermentatori di acciaio da 10 l, nelle condizioni enunciate nella Tabella 3.

TABELLA 3

Diffusione dell'ossigeno nei fermentatori di acciaio inossidabile da 10 l (sistema vortex, elica 90 mm diametro, flusso 0,3 vol. aria per vol. soluzione per minuto, volume totale della soluzione 0,1 N KCl 5 l — pressione atmosferica).

r. p. m. dell'elica	ml O ₂ per 100 ml della soluzione 0,1 N KCl per ora
500	56
750	95

Nei dati della Tabella 3 si rileva che in confronto con le beute, l'aerazione nei fermentatori da 10 litri è ampiamente sufficiente. Questo è stato ulteriormente confermato da misure dirette della concentrazione dell'ossigeno disciolto, durante tutta la fermentazione, come si dirà dopo.

Altri esperimenti effettuati con un'elica rotante alla velocità di 500 r.p.m. ma con atmosfera di ossigeno puro invece dell'aria, hanno dato ugualmente risultati negativi. Ciò indicava che non era la insufficiente aerazione il fattore responsabile della mancanza di produzione di acido cogico nei fermentatori di acciaio inossidabile.

Inalterata produzione di acido cogico in beute agitate di acciaio inossidabile ed in beute normali agitate in presenza di ferro. — Si era dapprima pensato che la mancanza di produzione nei fermentatori di acciaio

TABELLA 4

Produzione di acido cogico in normali beute in presenza di varie quantità di FeCl₃, di FeSO₄ e di ruggine.

Controlli	aggiunta di mg/ml						particelle di ruggine in sospensione
	FeCl ₃			FeSO ₄			
	1	0,1	0,01	1	0,1	0,01	
	Produzione di acido cogico (g/100 ml alla 120 ^a h)						
2.65	2.50	2.57	2.84	2.65	2.55	2.82	2.45
2.45	2.50	2.70	2.76	2.73	2.66	2.70	2,35

inossidabile, poteva essere imputata all'effetto del ferro o di altri metalli presenti nell'acciaio inossidabile.

I risultati esposti nelle tabelle 4 e 5 mostrano che così non è. La produzione dell'acido cogico procede normalmente in presenza di ioni ferro perfino ad una concentrazione di 1 mg/ml di FeCl_3 o di FeSO_4 , oppure in presenza di particelle di ruggine raccolte dalle condotte di vapore dei fermentatori, e forse anche nelle beute di acciaio inossidabile appositamente costruite del medesimo acciaio dei fermentatori.

TABELLA 5

Produzione di acido cogico (g/100 ml a 120 h) in beute di vetro e di acciaio inossidabile.

Beute di vetro	Beute di acciaio inoss.
3.36	3.50
3.16	3.28
3.28	3.36
3.07	2.70
2.84	3.08
2.90	2.80

Effetto della tensione di ossigeno sulla produzione di acido cogico. — La produzione di acido cogico da glucosio è un processo ossidativo. Per stabilire quale fosse la diffusione minima di ossigeno che permettesse ancora la produzione, e per studiare l'effetto di tensioni di ossigeno più elevate di quelle corrispondenti alla pressione atmosferica, furono preparate miscele di gas ossigeno-azoto di diverse composizioni. Queste miscele gassose erano distribuite, per mezzo di tubi a più vie già descritti, nelle beute; stabilendosi così nelle beute un flusso continuo sulla superficie libera del liquido colturale.

Le miscele di gas erano preparate in bombole preventivamente poste sotto vuoto. Il flusso gassoso prima di immettersi nelle beute veniva umidificato per gorgogliamento in apposite beute di lavaggio dei gas.

L'operazione di miscelamento nelle bombole era controllato con misure manometriche, di poi il contenuto in ossigeno della miscela veniva controllato con una analisi del gas.

I risultati sono esposti nella Tabella 6.

Produzione di acido cogico in atmosfere a diverse tensioni di ossigeno
(esperienze in beute)

N. della esperienza	Miscela di O ₂ - N in per cento di O ₂	Produzione di acido cogico (g/100 ml dopo 120 ore)			Peso secco del micelio (g/100 ml)		
1	5	0,40	0,40		0,77	0,88	
2		tracce	tracce	tracce	0,67	0,64	0,62
3		0,50	0,50	0,54	0,91	0,92	0,89
1	10	0,78	0,70	0,78	0,65	0,91	0,83
2		0,35	0,24	0,18	0,76	0,84	0,93
3		0,52	0,52	0,34	0,77	0,88	0,80
1	15	1,60	1,90	1,92	0,60	0,66	0,69
2		0,58	0,35	0,58	0,57	0,66	0,71
3		1,18	1,26	1,06	0,91	0,86	0,70
1	20 (aria)	1,00	0,80	0,80	0,82	0,69	0,56
2		1,88	1,44	1,44	0,75	0,85	0,94
1	50	2,58	2,30	2,88	0,73	0,90	0,93
1	100	2,76	2,80	2,82	0,47	0,50	0,52
2		1,98	2,10	2,10	0,75	0,85	0,58
3		2,88	2,86	2,86	0,78	0,71	0,89
1	beute controllo	2,82	2,86	2,20	0,61	0,60	0,65
2	(tappo di cotone)	1,03	0,98	0,98	0,56	0,63	0,64
3	nessun flusso di gas	1,84	2,00	2,38	0,70	0,71	0,69

Appare evidente che per la produzione di sensibili quantità di acido cogico occorre l'erogazione di una miscela contenente come minimo il 15 per cento di ossigeno; concentrazioni più alte rispetto a quella dell'aria non hanno azione negativa ma neppure aumentano in maniera significativa la produzione.

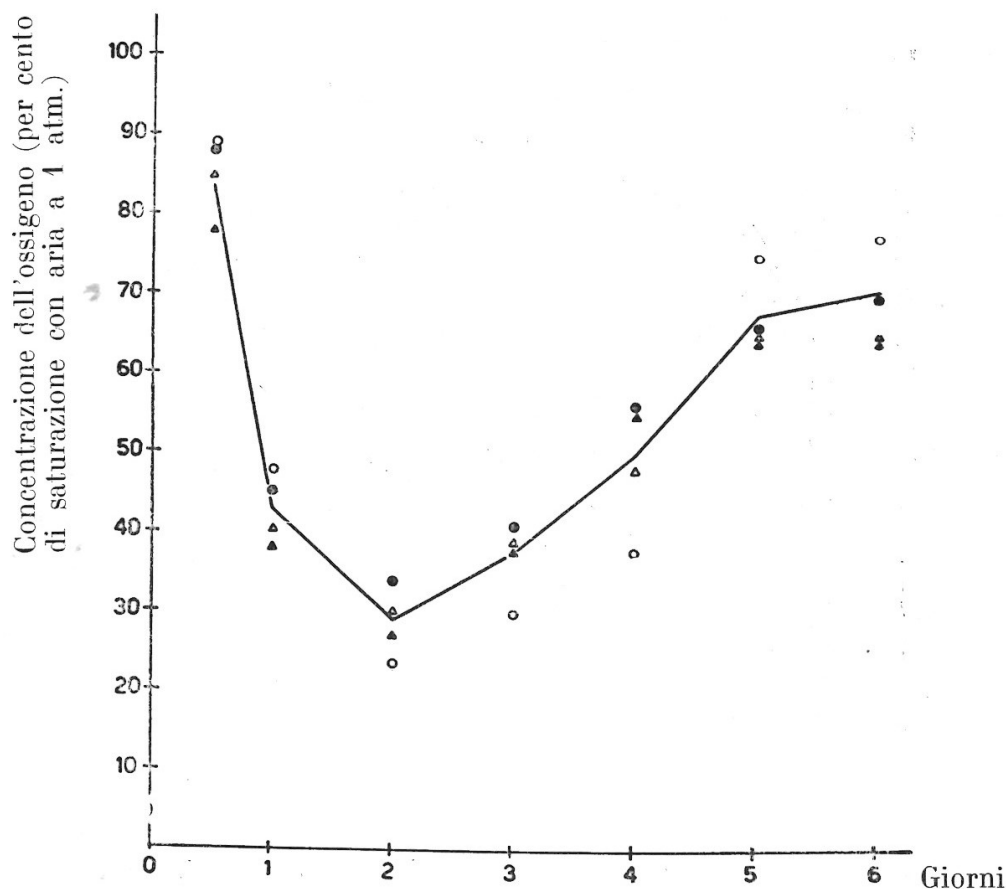


Fig. 1. - Concentrazione dell'ossigeno disciolto registrata continuamente con un elettrodo ricoperto di collodio durante una tipica fermentazione per la produzione di acido cogico in beute agitate. Quattro beute in parallelo.

Con la messa a punto di un nuovo metodo per la misurazione continua della concentrazione di ossigeno disciolto nel liquido colturale (GUALANDI e al.) ⁽¹²⁾ è stato possibile seguire le variazioni della concentrazione dell'ossigeno disciolto, nel corso di una intera fermentazione (Fig. 1 e 1-a).

Dall'andamento della curva si rileva che la concentrazione dell'ossigeno decresce mentre vi è una attiva crescita miceliare, cioè fin verso la 36^a ora, indi gradualmente risale fino al 60-80 per cento di saturazione nel mezzo colturale. Ciò significa che in una normale fermentazione,

la concentrazione di ossigeno nel terreno durante la fase di produzione dell'acido cogico non è mai al di sotto del 25 per cento della saturazione. Se la diffusione dell'ossigeno è troppo scarsa per poter raggiungere questo valore, la produzione dell'acido è inferiore.

Dai valori di diffusione dell'ossigeno, la concentrazione dell'ossige-

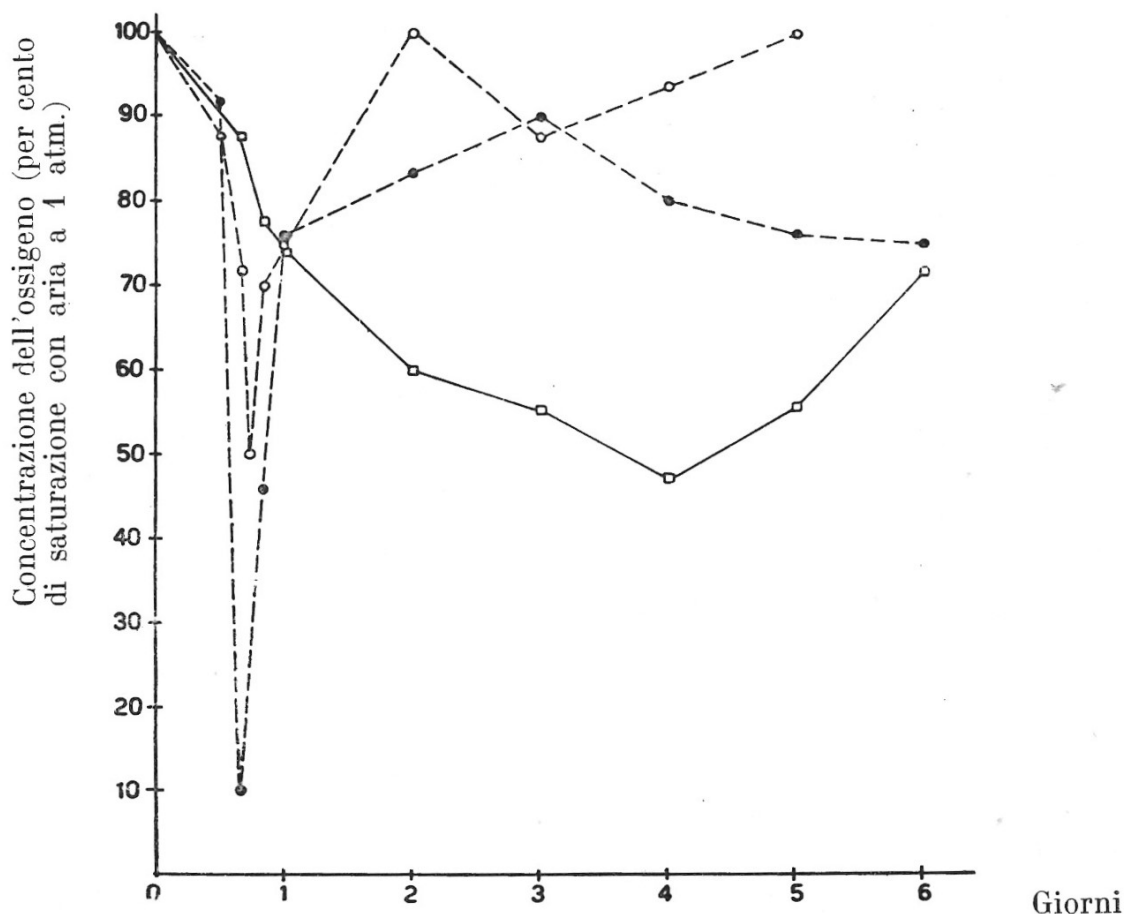


Fig. 1 a - Concentrazione dell'ossigeno disciolto registrata continuamente con un elettrodo ricoperto di collodio durante una tipica fermentazione per la produzione di acido cogico in fermentatori di acciaio inossidabile provvisti di agitazione a vortice (diametro dell'elica 90 mm, velocità di rotazione 750 g.p.m., flusso dell'aria 0,3 vol. di aria per vol. di liquido per minuto 1 atm. di sovrappressione).

Curva — in presenza di antischiuma.

» — — — in assenza di antischiuma.

no disciolto ed il peso secco del micelio si può calcolare il QO_2 nei differenti stadi della fermentazione. I valori così ricavati sono in buon accordo con quelli calcolati direttamente con le misure manometriche (Fig. 2).

Le misurazioni in questi esperimenti furono fatte a intervalli regolari trasferendo l'intero contenuto di una beuta in altra eguale ma mu-

nita di elettrodo. Poichè il tempo di misura non superava 1 ora ed il pH del terreno era fortemente acido, non era necessario prendere precauzioni per la sterilità. Il fatto che l'ossigeno puro non inibisce la produzione di acido cogico mostrava inoltre che la mancanza di produzione

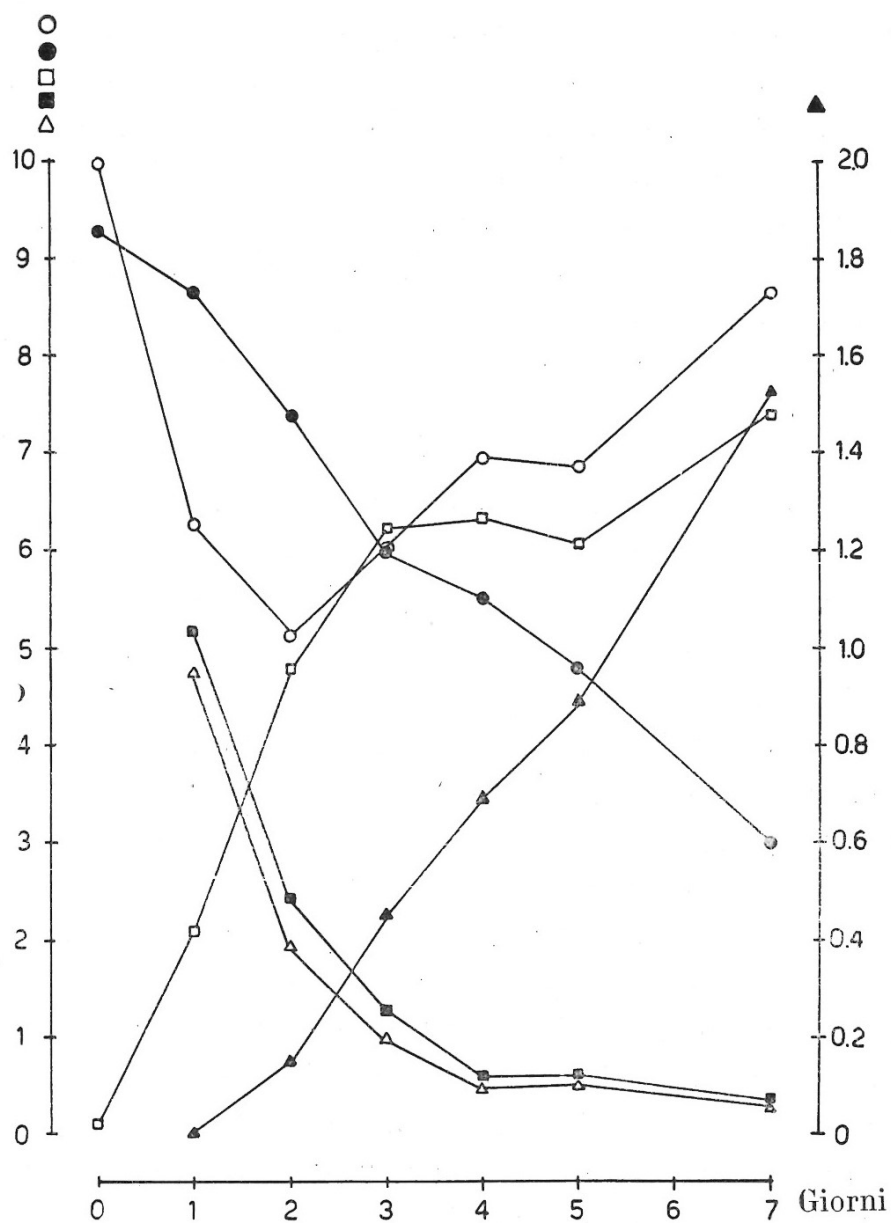


Fig. 2. - Tipica fermentazione cogica.

- Leggenda: ○ — ○ Concentrazione dell'ossigeno disciolto (per cento di saturazione con aria. 10^{-1}) misurata in modo discontinuo con elettrodi ricoperti di cellophane.
- — □ Peso secco (g/100 ml 10).
- — ● Glucosio (g/100 ml).
- — ■ Q_{O_2} ($\mu\text{l/mg/h } 10^{-1}$). Determinata con misure manometriche dirette.
- △ — △ Calcolata dalla velocità di diffusione, dalla concentrazione dell'ossigeno e dal peso secco.
- ▲ — ▲ Acido cogico (g/100 ml).

nei fermentatori di acciaio inossidabile, non fosse dovuta ad un'eccessiva concentrazione di ossigeno nel mezzo colturale.

OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE.

Confrontando la morfologia del micelio sviluppatosi in beute con quello formatosi nei fermentatori furono notate rimarchevoli differenze. Nelle beute il micelio si organizza in pallette (Fig. 3) il cui diametro varia da 7 a 0,3 mm inversamente con la quantità dell'inoculo e cioè col numero dei centri di crescita. Le pallette di *Aspergillus flavus* nelle condizioni normali non si autolisano come avviene nelle pallette di *Penicillium chrysogenum* che a fine fermentazione sono come involucri vuoti, ma rimangono compatte durante l'intera fermentazione (Fig. 3a). Le ife periferiche, che sono visibili individualmente, si presentano lunghe sottili, flessuose con citoplasma finemente vacuolizzato. In certe condizioni di crescita anormale si formano pallette di aspetto diverso, che sono state descritte (TESTI-CAMPOSANO) ⁽¹⁴⁾. Nei fermentatori agitati il micelio non si organizza mai in pallette ma si sviluppano ife filamentose il cui aspetto morfologico varia con la intensità dell'agitazione. Con un'agitazione moderata (500 r.p.m.) le ife si presentano lunghe sottili, uniformi, poco ramificate (Fig. 4 e 4a); con una più intensa agitazione (750 r.p.m.) le ife che si sviluppano sono più corte e più spesse, largamente vacuolizzate, e ramificate (Fig. 5 e 5a). Occasionalmente si osservano tratti ifali globosi pieni di citoplasma granuloso che sono da considerarsi probabilmente come vescicole abortive; in queste condizioni non sono mai stati osservati dei conidiofori tipici. Con una agitazione lenta (250 r.p.m.) le ife si presentano ancor più lunghe, flessuose con rare ramificazioni e intrecciate a formare dei fiocchi miceliari; il citoplasma è finemente vacuolizzato. Considerate le differenze morfologiche tra micelio sviluppato su beuta e micelio sviluppato su fermentatore, venne presa in considerazione l'ipotesi che la variazione di morfologia del micelio sviluppantesi in coltura sottoposta all'azione meccanica di eliche rotanti a notevole velocità, si riflettesse sul comportamento metabolico e fosse determinante l'incapacità di produrre acido cogico in tali condizioni.

Questa ipotesi è stata sottoposta a controllo e trovata giusta.

PRODUZIONE DI ACIDO COGICO NEI FERMENTATORI A COLONNA.

Al fine di escludere l'effetto meccanico nel sistema di aerazione, le fermentazioni furono effettuate nei tubi cilindrici in vetro, già descritti. I risultati sono esposti nella Tabella 7.

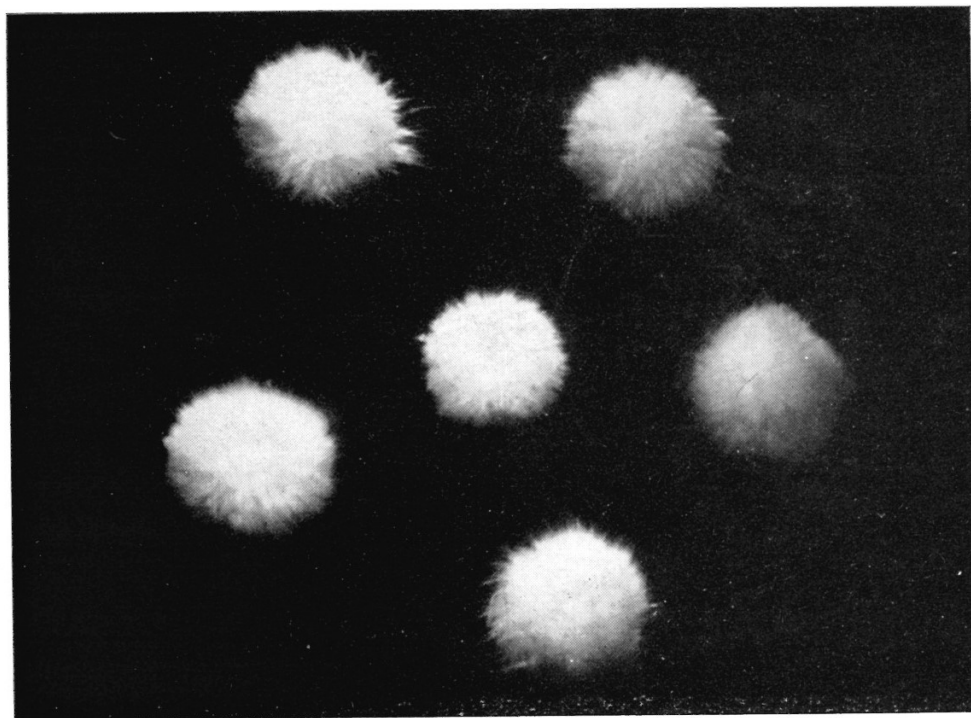


Fig. 3 - Pallette sviluppate in normali beute agitate. 120 h di incubazione. (x 8)

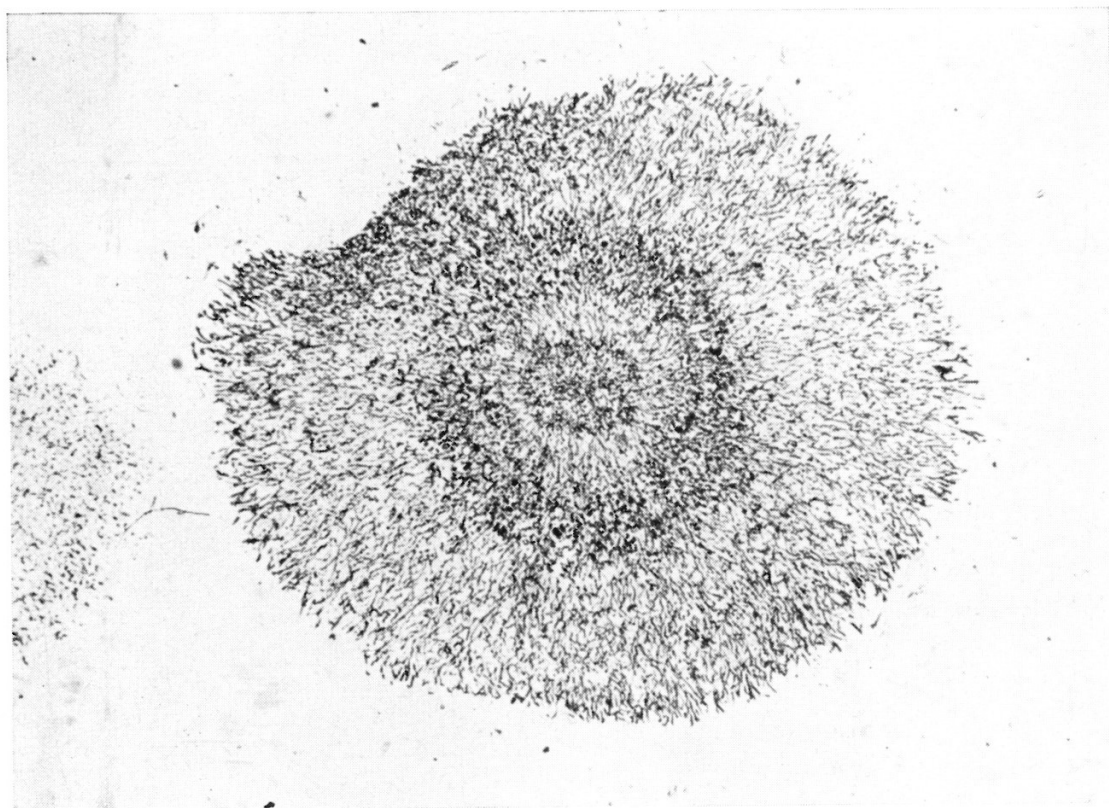


Fig. 3 a - Sezione istologica di pallette sviluppate in normali beute agitate. (x 35)

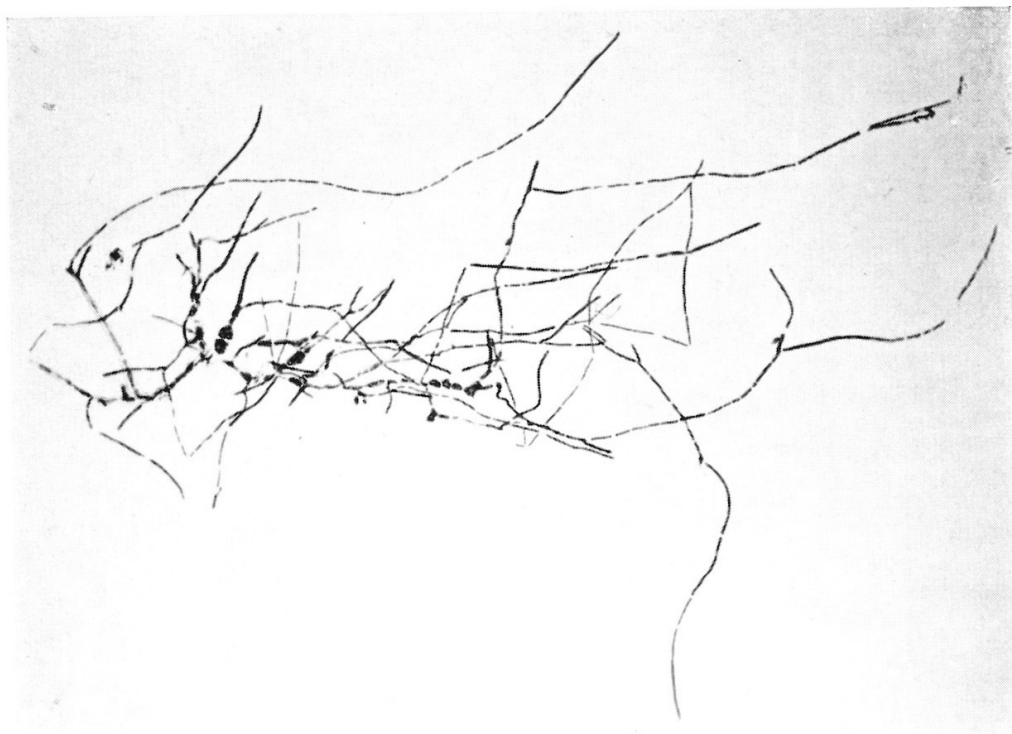


Fig. 4 - Micelio lungo fine flessuoso dopo 24 h di fermentazione in fermentatori di acciaio inossidabile. (x 185)

Sistema di aerazione Vortex, eliche da 90 mm di diametro rotanti a 500 r.p.m. Flusso d'aria: 0,5 vol. per vol. terreno, per minuto.



Fig. 4 a - Stesso micelio dopo 120 h. (x 185)

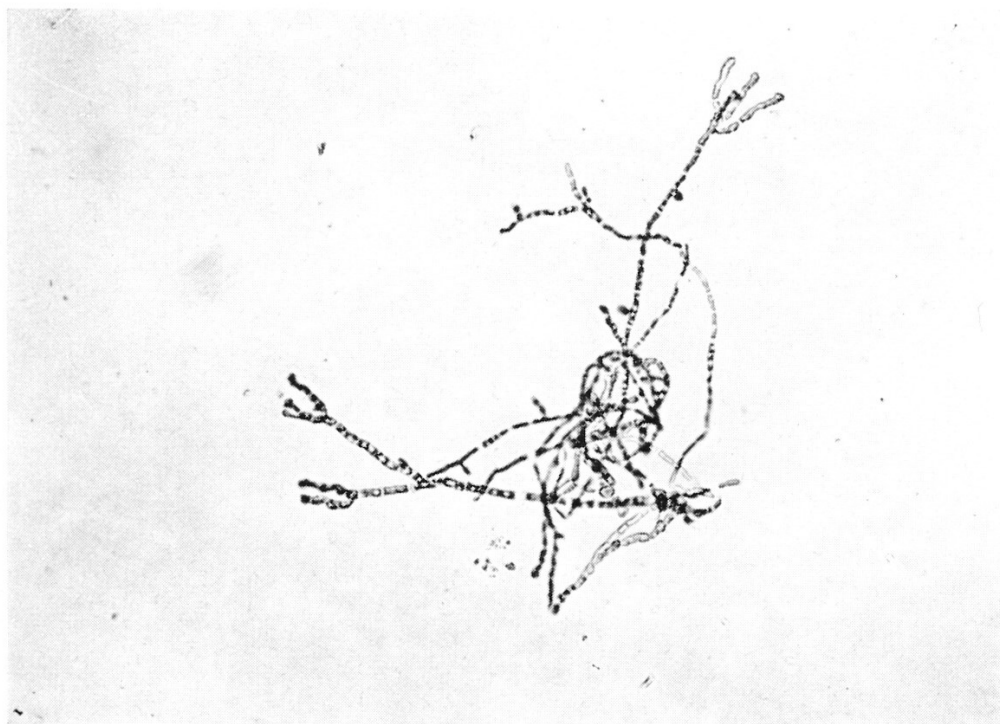


Fig. 5 - Ife corte e ispessite dopo 24h di fermentazione in tank di acciaio inossidabile. (x 125)

Sistema di aerazione Vortex, eliche di 90 mm di diametro rotanti a 750 r.p.m. Flusso d'aria 0,5 vol. per vol. di terreno per minuto.

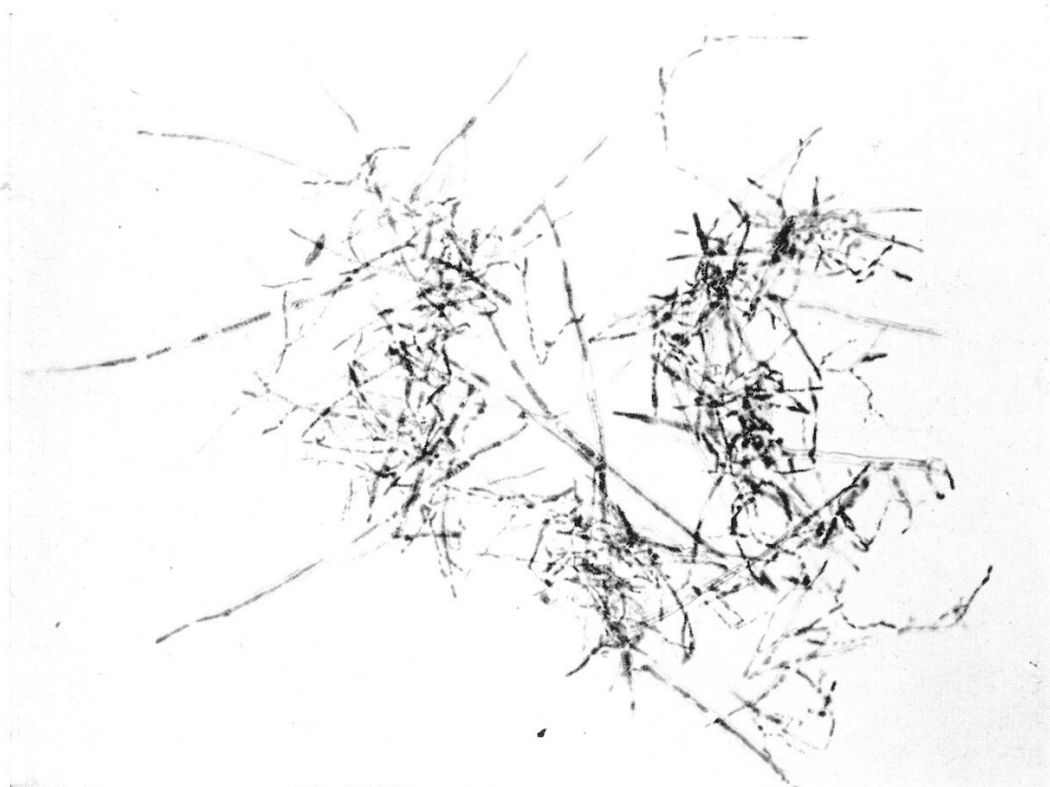


Fig. 5 a - Stesso micelio dopo 120 h. (x 125)

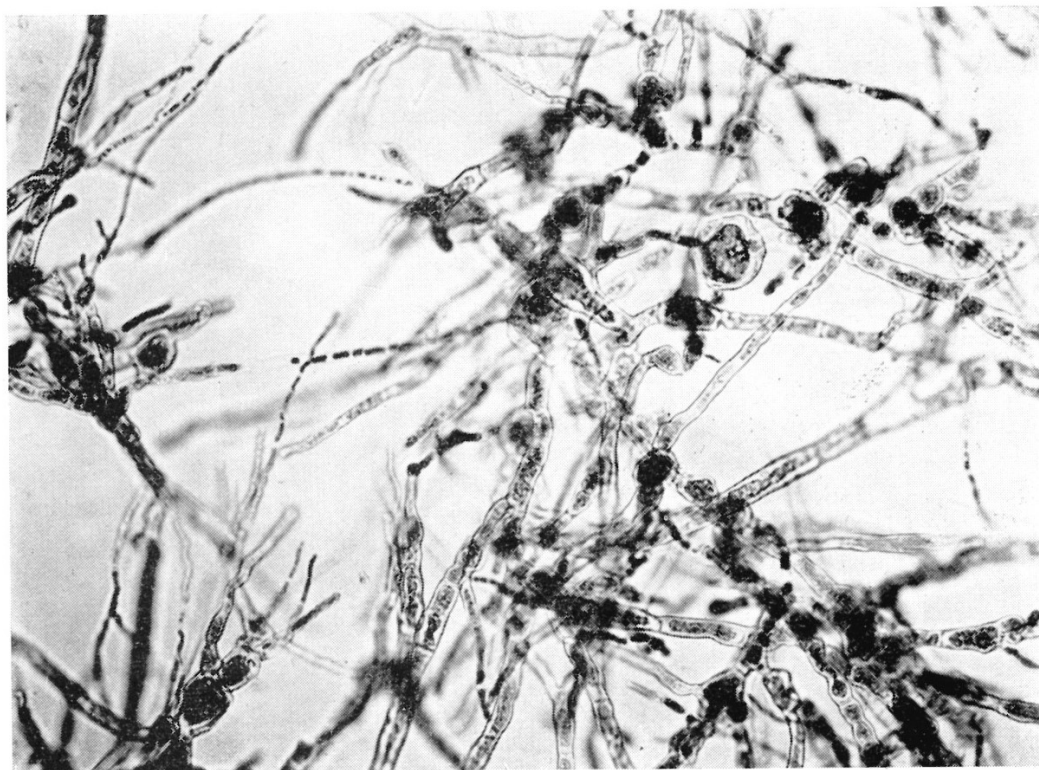


Fig. 6 - Micelio con cellule globose, dopo 144h di fermentazione in tank di acciaio inossidabile (x 250). Sistema Vortex, stesse condizioni di quelle esposte in fig. 5.



Fig. 7 - Ife lunghe e flessuose dopo 120 h di fermentazione in tank di acciaio inossidabile. (x 70)
Sistema di aerazione con sparger; eliche da 90 mm ruotanti a 250 r.p.m.
Flusso d'aria: 1 vol. per vol. di terreno per minuto.

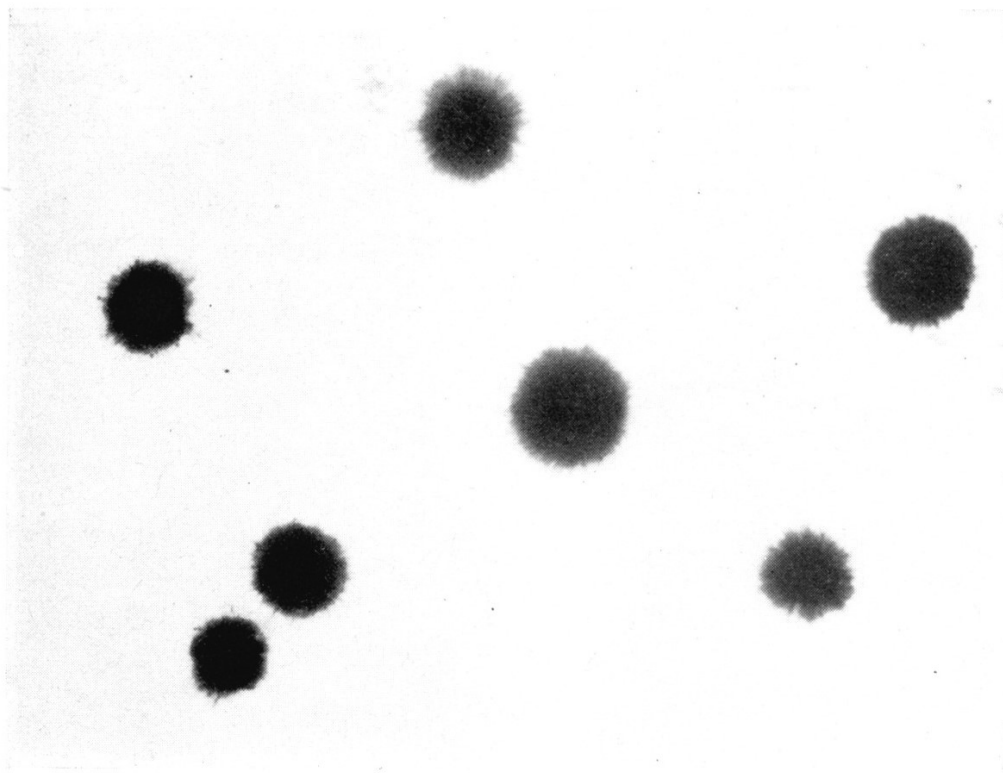


Fig. 8 - Pallette sviluppate in fermentatori a cilindro. (x 2)

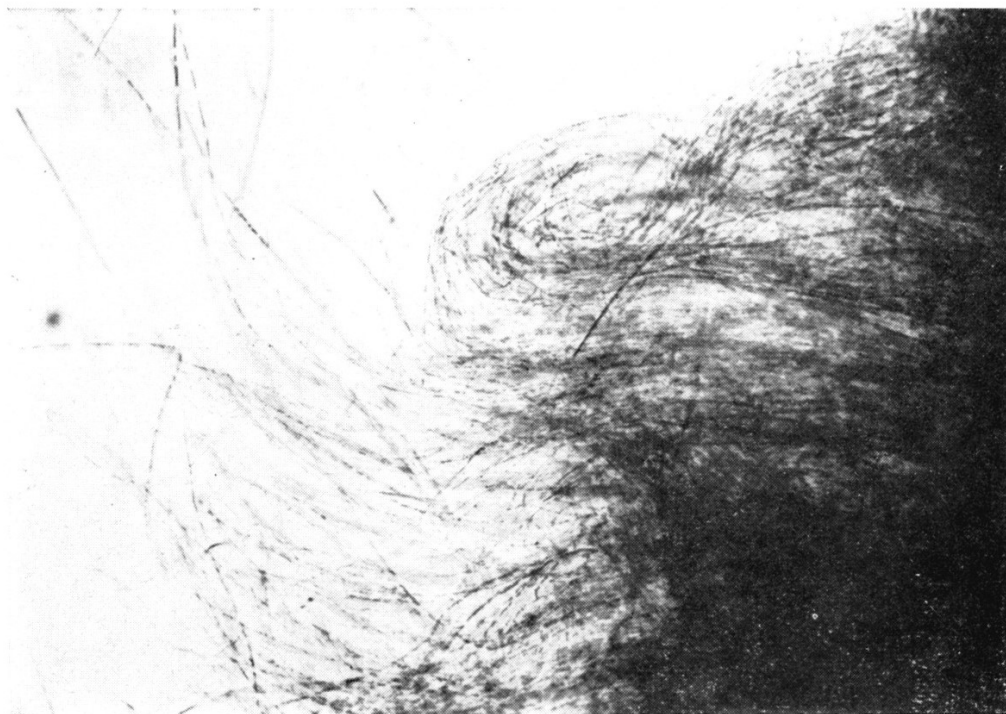


Fig. 8 a - Le stesse pallette mostranti ife periferiche lunghe, sottili, flessuose. (x 75)

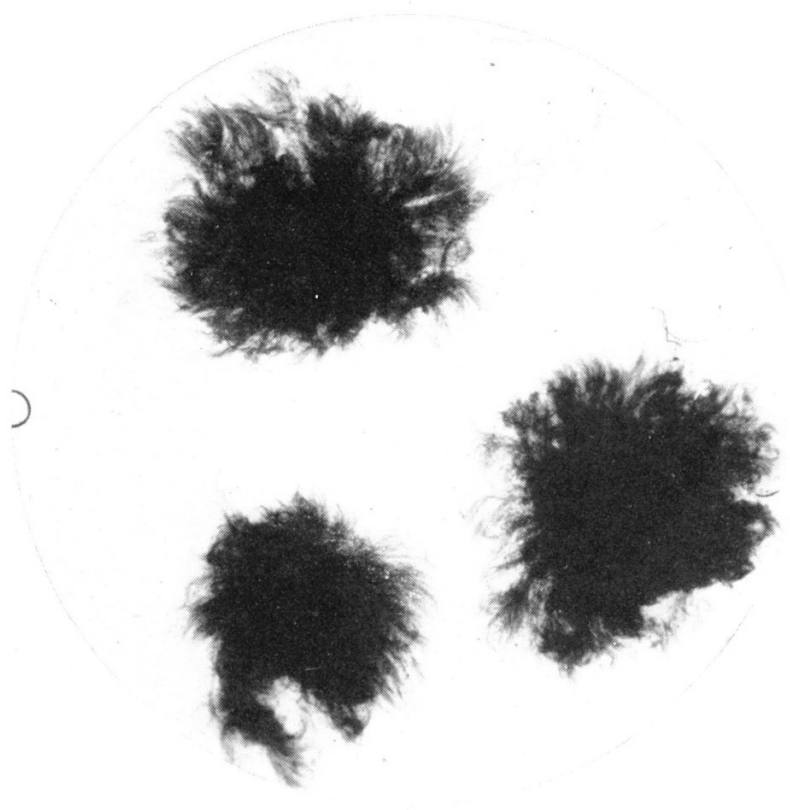


Fig. 9 - Pallette sviluppate in fermentatori con spirale interna rotante. (x 3)

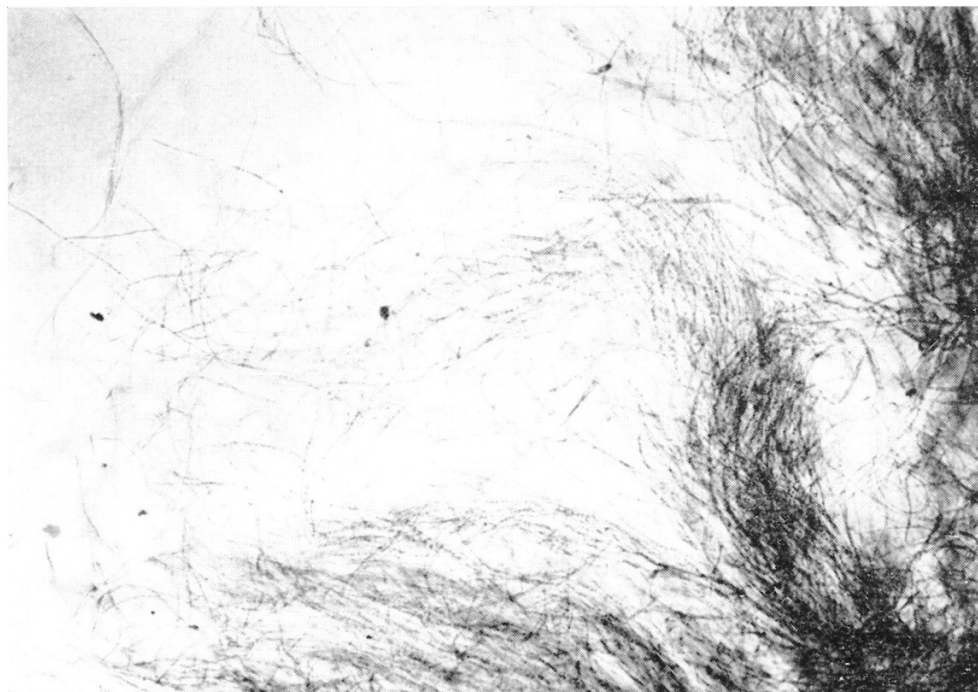


Fig. 9 a - Le stesse pallette a maggiore ingrandimento (x 75) mostranti ife periferiche lunghe sottili flessuose.

Produzione di acido cogico (g/100 ml dopo 120 ore) in fermentatori a colonna (4 litri di terreno colturale; flusso di ossigeno 2 l/m) e in beute normali.

Fermentatori a colonna				beute normali acido cogico	
peso secco miceliare		acido cogico			
1,54	1,68	0,70	0,70	1,20	1,30
1,50	1,46	0,65	0,85	1,60	1,65

La produzione in questo tipo di fermentatori in cui l'aerazione è effettuata per mezzo di un getto d'aria sprigionantesi da un ugello di 2,2 mm saldato sul fondo non è molto differente da quella che si ottiene in beuta. Il micelio sviluppatosi si presenta in pallette dello stesso diametro di quello ottenuto in beuta (Fig. 8 e 8a); le pallette tuttavia sono più lasse e si nota la tendenza, per azione del loro movimento in su e in giù provocato dal getto d'aria, al distacco di fiocchi miceliari dalla periferia delle pallette stesse, con la conseguente formazione di nuovi centri di crescita.

PRODUZIONE DI ACIDO COGICO IN FERMENTATORI CON GRONDE ROTANTI E CON SPIRALE ROTANTE.

La fermentazione cogica è stata effettuata inoltre in fermentatori a gronde o a spirale rotanti. Nel primo tipo l'aerazione avviene per gli scambi ossidativi nel momento in cui la coltura cade come un velo liquido dalle gronde nella massa del terreno. Tuttavia anche qui vi è un attrito dovuto in parte al liquido che precipita con turbolenza e in parte al movimento delle gronde, tale da inibire la formazione di colonie a pallette e dare origine prevalentemente a filamenti e fiocchi miceliari; in questo fermentatore in cui la velocità di rotazione delle gronde è di 19-40 r.p.m., la produzione di acido cogico è nulla o in alcuni casi di tracce soltanto.

Nel fermentatore con spirale rotante in cui l'aerazione avviene con l'esposizione del velo di liquido colturale aderente alla spirale che lo solleva ruotando, la turbolenza è eliminata e l'attrito è quasi inesistente (l'aerazione è simile a quella che si ha in beuta) l'acido cogico si produce nelle seguenti quantità (g/100 ml: 1,44; 1,50; 0,84). Peso secco: 0,95; 1,35; 1,18.

Il micelio si organizza in pallette molto lasse, simili a quello nei fermentatori a colonna, con ife lunghe sottili flessuose; anche qui è evidente la tendenza delle ife periferiche a staccarsi e a formare nuovi centri di crescita (Fig. 9 e 9a) come lo prova anche il peso secco relativamente alto.

GRADO DI REVERSIBILITA' DELL'EFFETTO MECCANICO DELL'AGITAZIONE SULLA PRODUZIONE DI ACIDO COGICO.

Al fine di provare fino a qual punto nei fermentatori l'inibizione prodotta dall'azione meccanica sulla produzione di acido cogico fosse reversibile, furono prelevati campioni di 100 ml di coltura dai tank di 10 litri e trasferiti in beute, sia pochi minuti dopo l'inoculo, sia dopo 24, 48, 72, 96 ore di fermentazione nel tank. Tali prelievi fatti sviluppare in beute poste su agitatori rotatori hanno dato luogo alle produzioni riportate nella tabella 8.

TABELLA 8

Produzione di acido cogico con colture trasferite da fermentatori in beute poste su agitatore rotatorio.

Tempo di fermentazione in tank prima del trasferimento in beuta	Produzione di acido cogico (g/100 ml alla 120a ora)		
Agitazione 500 r.p.m.			
0	2.1,	2.0,	2.4
0	1.6,	2.6,	2.6
24	0.32,	0.46,	0.35
24	0.7,	0.7,	0.7
48	0	0	0
Agitazione 750 r.p.m.			
0	2.0,	2.0,	1.8
0	2.0,		
24	1.3,	1.4,	1.4
48	0,	0,	0,

La produzione normale di acido cogico si è avuta solo nei campioni trasferiti pochi minuti dopo l'inoculo. Il micelio sottoposto per 24 ore alle condizioni del tank e poi trasferito in beuta non era più in grado di

produrre normalmente, ma solo una quantità ridotta di acido cogico, di circa il 60-65 per cento. Il micelio trasferito dopo 48 ore non produceva affatto. Il comportamento metabolico del micelio trasferito da tank in beute agitate era lo stesso, sia che provenisse da tank agitati a 750 r.p.m. sia a 500 r.p.m. Come previsto, nessuna formazione di acido cogico si ebbe nei fermentatori.

Le variazioni morfologiche seguivano parallelamente il comportamento metabolico del micelio. L'esposizione dell'inoculo vegetativo, cresciuto prima in beuta sotto forma di palette e travasato poi in tank, alla agitazione meccanica nel fermentatore, anche per pochi minuti, bastava a disintegrare le palette; ma se il micelio così trattato veniva, entro le 24 ore, riportato in beuta era capace di riorganizzarsi in palette e produrre acido cogico. Quando l'esposizione all'agitazione meccanica superava questo tempo, il micelio riusciva solo parzialmente a riformare palette; oltre la 48^a ora esso rimaneva filamentoso e non produceva acido cogico. Nei fermentatori parimenti il micelio cresceva in forma filamentosa.

DISCUSSIONE

L'influenza dell'agitazione meccanica sulla struttura morfologica del micelio di funghi filamentosi in coltura sommersa era stata già osservata in questo Laboratorio (¹⁵, ¹⁶) ma nel caso della produzione di acido cogico da parte di *Aspergillus flavus* si è visto che l'effetto meccanico era correlato con un chiaro cambiamento del quadro metabolico del fungo. La produzione di acido cogico con il ceppo di *A. flavus* impiegato, si aveva solo quando le condizioni dell'agitazione meccanica erano tali da non ostacolare la formazione della colonia. Altri ceppi di *A. flavus* si sono mostrati meno sensibili all'effetto meccanico, ed una selezione di ceppi in questo senso si dimostra ovviamente di grande importanza per la produzione di acido cogico in coltura sommersa in fermentatori.

Parrerebbe dunque che l'agitazione meccanica inducendo nelle ife miceliche una maggiore ramificazione ed un ispessimento delle pareti, mantenga la coltura in un particolare stato durante il quale non avviene produzione di acido cogico.

Il metabolismo del glucosio sembra deviato verso la produzione di materiale plastico cellulare invece che verso una parziale ossidazione per la formazione di acido cogico. Il meccanismo biochimico del fenomeno costituisce un interessante problema che meriterebbe ulteriori studi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WHIFFEN A. J. e SAVAGE G. M. - J. Bact., 53: 231 (1947).
- (²) KLUYVER A. J. e PERQUIN L. H. C. - Bioch. Z., 266: 68, 82 (1933).
- (²) PALADINO S. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 145 (1954).
- (⁴) CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 5 (1954).
- (⁵) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J., Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 61 (1954).
- (⁶) HERRICK H. T., HELLBACH R. e MAY O. E. - Ind. Eng. Chem., 27: 681 (1935).
- (⁷) GASTROCK E. A., PORGES N., WELLS P. A. e MOYER A. J. - Ind. eng. Chem., 30: 782 (1938).
- (⁸) UGOLINI F., UGOLINI G. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 819 (1960).
- (⁹) COOPER C. M., FERNSTROM G. A. e MILLER S. A. - Ind. eng. Chem., 36: 504 (1944).
- (¹⁰) ARNESTEIN H. R. V. e BENTLEY R. - Biochem. J., 54: 508 (1953).
- (¹¹) SOMOGYI M. - J. biol. Chem., 195: 49 (1952).
- (¹²) GUALANDI G., MORISI G., UGOLINI G. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 822 (1960).
- (¹³) CAMICI L., SERMONTI G., CHAIN E. B. - Bull. World Hlth Org., 6: 265 (1952).
- (¹⁴) TESTI-CAMPOSANO A. - Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 448 (1959).
- (¹⁵) DION W. M., CARILLI A., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 187 (1954).
- (¹⁶) DION W. M. e KAUSHAL R. - Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 367 (1953).

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956