

31. S. J. PIRT e D. S. CALLOW. — **Formazione di prodotti esocellulari per mezzo di microorganismi in coltura continua.**

Nota II. Produzione di 2,3-butandiolo a partire da saccarosio mediante *Aerobacter aerogenes* in un processo a due stadi. (*)

Riassunto. — Il processo per la coltura continua in due stadi viene realizzato con due recipienti di coltura in serie. Nel primo, riservato alla fase di crescita dell'organismo, sono mantenute le condizioni colturali più adatte allo sviluppo: la coltura prodotta nel primo stadio è immessa in modo continuo in un secondo recipiente, dove le condizioni di coltura ed il rifornimento dei nutrimenti sono regolati intorno all'optimum per la formazione dei prodotti esocellulari.

Un processo di questo genere a due stadi è stato impiegato per la produzione di 2,3-butandiolo da saccarosio, ad opera di *Aerobacter aerogenes*, ricavandone la stessa concentrazione (6% p/v) e la stessa resa per grammo di saccarosio (più dell'80% del massimo teorico) di un processo discontinuo. Un processo continuo ad un solo stadio ha per contro dato soltanto la metà della suddetta concentrazione di butandiolo e non più del 60% di resa rispetto al teorico. La produzione specifica di un processo in due stadi, espressa in grammi di prodotto per ora e per litro di capacità lavorativa, è circa tre volte più grande di quella di un processo discontinuo. Un processo a due stadi può essere continuato per un tempo indefinito, senza alterazioni nella resa.

Summary. — Two-stage continuous culture consists of two culture vessels in series. In the first vessel, which is mainly for growth of the organism, the cultural conditions are adjusted to be most suitable for growth. The culture produced in the first stage is fed continuously into the second vessel in which the conditions and nutrient supply are adjusted to be optimum for exocellular product formation. The two-stage process applied to the production of 2:3-butanediol from sucrose by *Aerobacter aerogenes* gave the same diol concentration (6% w/v) and the same yield per g. of sucrose (over 80% of the theoretical maximum) as the batch process; in contrast the single-stage continuous process gave

(*) Una parte di questi risultati è stata presentata dagli AA., già ospiti del Laboratorio di Chimica Biologica, all'VIII Congresso nazionale della Società Chimica Italiana (Torino, 1958). Il lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 292 (1959).

only half the above diol concentration with 60% of the theoretical yield. The output rate of the two-stage continuous process in g. product/hr./l. working volume was nearly three times greater than that of the batch process. The two-stage process could be continued indefinitely without fall in yield.

INTRODUZIONE

Vi sono ormai buoni fondamenti teorici per supporre che un processo di fermentazione continuo debba avere una prestazione superiore a quella del processo di discontinuo [HERBERT, ELSWORTH e TELLING ⁽¹⁾]. Occorre tuttavia una vasta indagine sperimentale per scoprire in che misura sia valida la teoria pura, e fino a che punto possa essere applicata in pratica la coltura continua. Il punto della situazione in questo campo è fatto esaurientemente nel simposio pubblicato da MALEK ⁽²⁾.

La fermentazione di saccarosio a 2,3-butandiolo per mezzo dell'*Aerobacter aerogenes* è un processo semplice di formazione di un prodotto esocellulare cui abbiamo tentato di applicare la tecnica di coltura continua [PIRT e CALLOW ^(3, 4)]. Abbiamo tuttavia constatato che il tipo di coltura continua da noi adoperato presentava certi gravi inconvenienti rispetto alla coltura discontinua. La coltura continua dava una concentrazione del prodotto ed una resa per grammo di saccarosio molto inferiore a quanto si potesse ottenere in una coltura discontinua. Ne abbiamo concluso che questi fenomeni erano da attribuire al fatto che le condizioni necessarie per la crescita dell'organismo e le condizioni optimum per la formazione del prodotto non erano identiche. Siamo stati condotti a questa conclusione dalle seguenti considerazioni.

I vari sistemi di coltura cui si è fatto riferimento sono illustrati nella figura 1. In una coltura discontinua il recipiente di coltura viene caricato con il terreno, ed inoculato; poi si lascia che la fermentazione proceda finchè la concentrazione del prodotto raggiunga il massimo. Il processo può avere due fasi, e cioè: primo la crescita dell'organismo, e, secondo, la formazione di prodotti esocellulari con poca o nessuna crescita dell'organismo. In una coltura continua a stadio unico il terreno fresco viene introdotto nella coltura ad una velocità costante, e la coltu-

ra viene continuamente raccolta così che il volume della coltura nel recipiente (capacità lavorativa) rimane costante. In questo tipo di coltura, poichè occorre che vi sia una crescita continua, si può riprodurre soltanto la prima fase o fase di crescita di una coltura discontinua. Ne consegue che la coltura continua a stadio unico è adeguata se si richiede soltanto l'organismo, oppure un prodotto esocellulare nel caso in cui le condizioni optimum per la sua formazione siano le stesse che per la crescita.

La coltura continua a stadio unico non sarebbe evidentemente

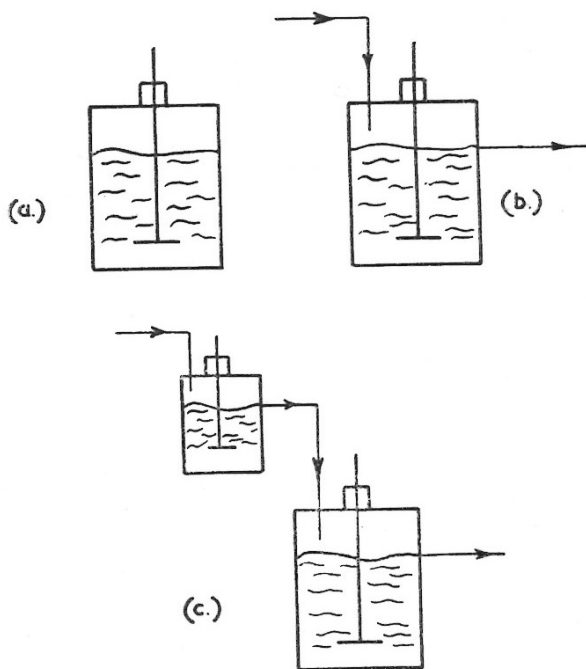


Fig. 1. - Rappresentazione schematica di sistemi di coltura discontinui e continui: (a) sistema discontinuo, (b) sistema continuo a stadio unico, (c) sistema continuo a due stadi.

ideale se le condizioni optimum per la formazione del prodotto non fossero identiche a quelle richieste per la crescita. Il principio della coltura continua a due stadi consiste nel predisporre le condizioni necessarie per la crescita dell'organismo nel primo stadio; la coltura prodotta in questo stadio viene portata con continuità nel secondo stadio dove le condizioni vengono aggiustate in modo da costituire l'optimum per la formazione del prodotto e dove gli organismi possono essere trattiene fino a tanto che formino il prodotto desiderato. E' prevedibile che la durata del potere fermentante dell'organismo sarà lunga in confronto con il tempo necessario per farlo crescere; per sfruttare questo fatto il secondo recipiente dovrà essere più grande del primo per consentire un periodo di permanenza più lungo nel secondo stadio.

Diversi altri ricercatori hanno studiato la coltura continua a stadi multipli, ma non sembra che abbiano seguito il principio di aggiustare le condizioni nei differenti stadi in modo da ottenere condizioni di crescita optimum nel primo stadio e condizioni optimum per la formazione di prodotto nel secondo stadio o in stadi susseguenti. Sembra che i lavori di DYR, PROTIVA e PRAUS ⁽⁵⁾ si siano avvicinati più di tutti a questo concetto; questi ricercatori effettuarono la produzione di acetonbutanolo per mezzo di *Clostridium*, e lasciando fluire la coltura attraverso una serie di recipienti constatarono che la massima parte della crescita avveniva nel primo stadio, mentre prevalevano condizioni « riducenti », adatte alla produzione di acetonbutanolo, nel secondo stadio. NOWREY ⁽⁶⁾ effettuò uno studio alquanto simile della fermentazione acetonbutanolica. RUF, STARK e SMITH ⁽⁷⁾ e ANDREEV ⁽⁸⁾ adoperarono due fermentatori in serie per la produzione di alcool per mezzo di lievito. MÁLEK ⁽²⁾ adoperò una coltura continua a stadi multipli per studiare l'effetto dell'età e di gradi differenti di esaurimento delle sostanze nutritive sullo « stato fisiologico » dell'organismo. BILFORD, SCALF, STARK e KOLACHOV ⁽⁹⁾ riferirono di non aver trovato alcun vantaggio in un sistema a due stadi rispetto ad una coltura continua a stadio unico per la produzione di alcool mediante la fermentazione di melassa.

In questo lavoro descriviamo uno studio sul sistema a due stadi applicato alla produzione di 2-3-butandiolo, e dimostriamo che presenta vantaggi netti sul processo discontinuo e sulla coltura continua a stadio unico descritta antecedentemente [PIRT e CALLOW ⁽⁴⁾].

METODI

Apparecchio. — Nella tavola 1 è mostrata una fotografia dell'apparecchio. Questo differisce dall'apparecchio a stadio singolo di ELSWORTH, MEAKIN, PIRT e CAPELL ⁽¹⁰⁾ principalmente per il fatto che, invece di un recipiente di coltura unico, vi sono due recipienti di coltura in serie, il recipiente del secondo stadio essendo più grande del primo. La capacità lavorativa del recipiente di primo stadio era di 0,5 litri; il volume di coltura nel secondo recipiente poteva essere variato da 1 a 4 litri. La capacità lavorativa nel secondo stadio venne modificata innalzando od abbassando il punto di traboccamento come descritto da ELSWORTH et al.

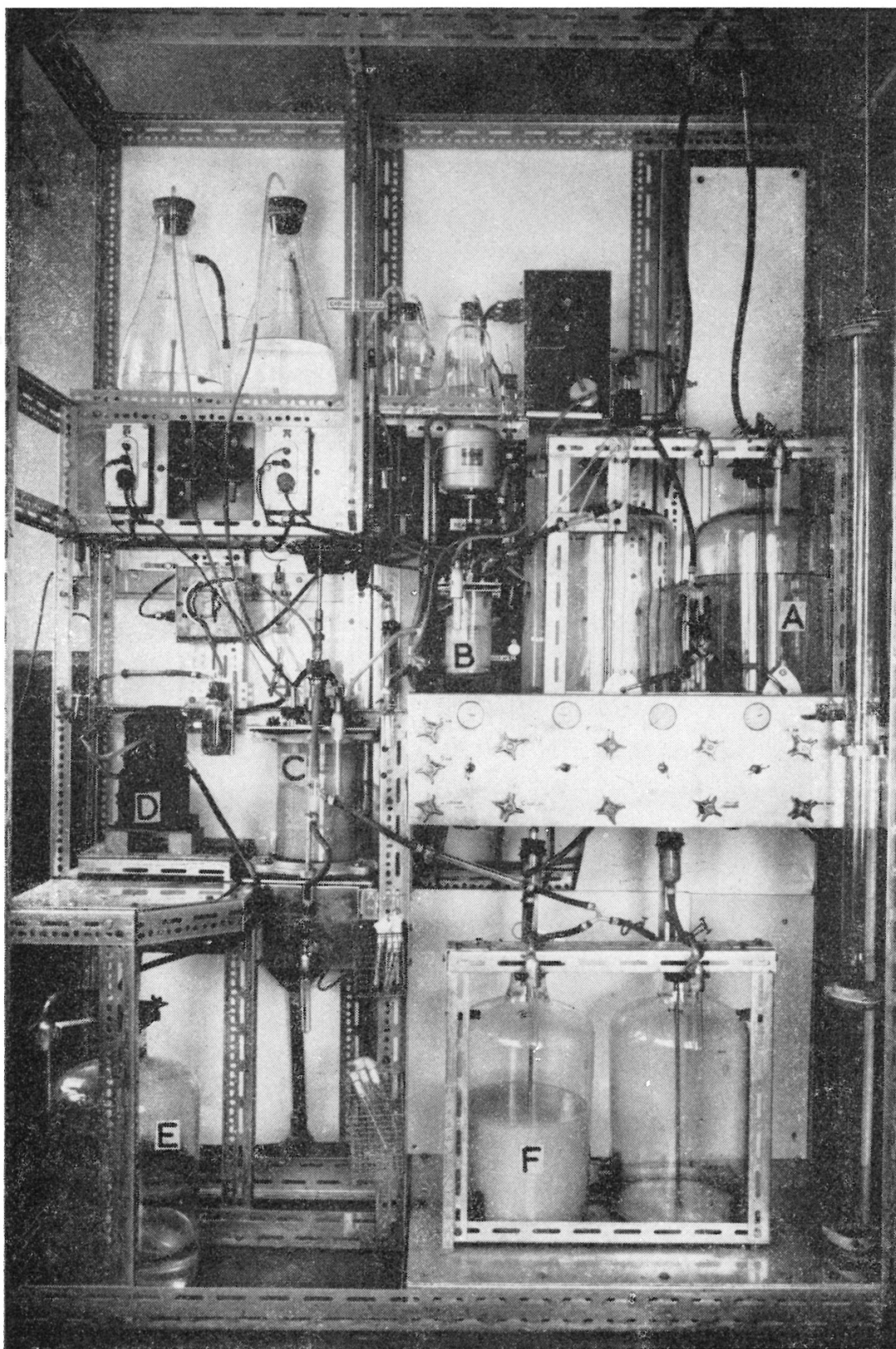


Tavola 1 - Apparecchio di coltura continua a due stadi. A, serbatoio per il terreno (bottiglia di Mariotte). B, recipiente di primo stadio. C, recipiente di coltura di secondo stadio. D, pompa per l'aggiunta di terreno al secondo stadio. E, serbatoio del terreno per il secondo stadio. F, boccia per il raccolto.

Ciò si rende necessario affinché si possa mantenere costante la velocità di diluizione nel secondo stadio, indipendentemente dalla velocità di flusso nel primo stadio. Una quantità supplementare di terreno (in questo lavoro si trattava di soluzione concentrata di saccarosio) poteva essere aggiunta alla coltura di secondo stadio per mezzo di una pompa nel modo indicato nella fotografia a sinistra.

Le condizioni di coltura, la temperatura, il pH, il rifornimento di ossigeno e di sostanza nutritiva, ecc., in ciascun stadio potevano essere variati indipendentemente. Gli strumenti di controllo furono montati su un quadro separato, non mostrato nella fotografia. Verrà pubblicata altrove una descrizione più completa di questo apparecchio e del suo funzionamento.

METODI ANALITICI

I metodi adoperati per la valutazione del 2,3-butandiolo, dell'acetoino, del peso batterico secco e del carbonio delle cellule nel terreno di coltura, nonché dell'anidride carbonica e dell'ossigeno nella fase gassosa furono quelli descritti da PIRT e CALLOW (⁴).

Nel calcolare la quantità di materiale formato od utilizzato nel secondo stadio, si deve notare che vanno prese in considerazione diverse velocità di flusso del liquido, e cioè: flusso della coltura dal primo stadio, rifornimento di saccarosio supplementare, e aggiunta di alcali nel controllo del pH.

Aerazione. — La velocità effettiva di assorbimento dell'ossigeno (σ_0 , m-mole/litro/ora) della coltura fu determinata in ciascun stato d'equilibrio. Si utilizzò la velocità di dissoluzione dell'ossigeno determinata dall'ossidazione del solfito (σ_s , m-mole/litro/ora) come indicazione per ottenere la velocità desiderata di assorbimento dell'ossigeno. Poiché il consumo dell'ossigeno nel lavoro descritto era limitato dalla velocità di dissoluzione dell'ossigeno, σ_0 rappresenta anche la quantità totale di ossigeno disponibile nelle condizioni fissate. La relazione tra σ_s e σ_0 è stata discussa da PIRT e CALLOW (¹¹).

Terreni. — Il terreno fondamentale, adoperato sempre tranne dove sia indicato altrimenti, consisteva nei seguenti componenti (in quantità in g/l). $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,30; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,09; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0225; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0075; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,00375; acido etilendiammino-tetra-

acetico (EDTA), 0,51; KOH, circa 0,45; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,2; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6,0; H_3PO_4 , circa 0,57 ml; saccarosio, 100.

Il terreno fu posto in autoclave in tre parti: (1) la soluzione di saccarosio, (2) i sali ammoniacali con acido fosforico per aggiustare il pH a 6,4, e (3) i sali minerali con KOH per aggiustare il pH a 7,4.

La funzione dell'EDTA era quella di impedire la precipitazione dei metalli. Il terreno a basso tenore di EDTA conteneva 0,306 grammi di EDTA per litro, ossia 0,6 moli per mole di metallo, esclusi gli alcali, ciò che rappresentava circa la minima concentrazione necessaria per impedire la precipitazione dei metalli.

Nel terreno contenente fattori di crescita al terreno fondamentale si aggiunse il seguente miscuglio, basato su quello di ROGERS ⁽¹²⁾ con le seguenti concentrazioni finali in mg/l: nicotinammide, 2,86; pantotenato di Ca, 5,7; piridossina, 2,86; riboflavina, 0,286; tiamina, 2,86; glutammina, 5,7; acido p-amminobenzoico, 0,57; meso-inosite, 5,7; biotina, 0,00286. Il miscuglio di fattori di crescita fu sterilizzato mediante filtrazione al Seitz.

Il terreno con sali metallici di aggiunta conteneva il seguente miscuglio, aggiunto al terreno fondamentale (in quantità in g/l): $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,005; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005; EDTA, 0,0132.

Il terreno di melassa era uguale al terreno fondamentale tranne che la sorgente di carbonio era costituita da melassa di raffinaria (20% p/v).

Venne pompata altra soluzione di saccarosio (50% p/v) nel secondo stadio allo scopo di mantenere un eccesso di saccarosio nel terreno.

La formazione di schiuma fu impedita ricorrendo al metodo della aggiunta periodica di agente antischiama [PIRT e CALLOW ⁽¹³⁾]. L'agente era Alkaterge-C (fornito dalla Commercial Solvents Corp., Terre Haute, U.S.A.) una soluzione al 30% v/v in paraffina liquida, tranne nella prima parte del primo ciclo in cui si adoperarono agenti antischiama al silicone; questi furono abbandonati a causa del loro minor rendimento.

Tipo di batteri. — L'organismo utilizzato in tutto questo lavoro fu l'*Aerobacter aerogenes* 8017 proveniente dalla National Collection of Industrial Bacteria, D.S.I.R., Teddington, Middlesex; si tratta del ceppo B199 del Northern Regional Research Laboratory di Peoria, Illinois. La coltura base fu mantenuta su vetrini di agar e carne triptica. I saggi biochimici di COWAN ⁽¹⁴⁾ furono applicati di tanto in tanto per verificare il ceppo.

Simboli e unità. — Velocità di diluizione (D) = velocità di flusso del terreno (l/ora)/volume di coltura nel recipiente (l), le unità sono ore⁻¹; q_{diolo} = g 2,3-butandiolo prodotto/ora/g peso batterico secco; σ_o = velocità assorbimento ossigeno (m-mole ossigeno/l/ora).

RISULTATI

Gli esperimenti sono raggruppati sotto tre voci: primo stadio, secondo stadio, ed effetto delle condizioni del primo stadio sul secondo stadio. Basterà dare un breve cenno sul processo di primo stadio, dato che era simile al processo a stadio unico già da noi descritto [PIRT e CALLOW (⁴)].

PRIMO STADIO.

Le principali condizioni del primo stadio e i risultati sono riportati nella Tabella 1. Decidemmo inizialmente di fissare a 0,5% p/v il peso batterico secco del primo stadio e di utilizzare una elevata velocità di diluizione; queste erano le condizioni in A₁, A₂ e A₃. La concentrazione batterica fu controllata variando l'introduzione di ossigeno, mentre tutte le altre sostanze nutritive erano in eccesso. La variazione del rapporto tra velocità di assorbimento dell'ossigeno e peso secco in differenti prove risultò inspiegabilmente superiore al previsto. Si utilizzarono le condizioni B per ottenere una elevata concentrazione batterica nel primo stadio. Si utilizzarono le condizioni C per studiare il risultato che si aveva quando la quantità di saccarosio costituiva un fattore limitante. Infine esaminammo il caso (E) dove la velocità di diluizione era bassa e la produzione di diolo era considerevole.

I valori forniti nella Tabella 1 rappresentano la media di molte determinazioni distribuite in periodi di diverse centinaia di ore. Nella Tabella 2 è mostrata la variazione caratteristica nel processo a stadio unico, nella stessa serie di condizioni.

SECONDO STADIO.

Temperatura e pH. — Nelle esperienze illustrate la temperatura del secondo stadio era 30° e il pH era 5,25. Questi valori furono prescelti in base al nostro studio sulle colture continue a stadio unico. Furono

TABELLA 1

Condizioni e prodotti nel primo stadio.

Dx orc ⁻¹	σ_c * (m-mole/ l/ora)	Peso secco batterico g/l	Diolo g/l	Acetoino g/l	Anidride carbon. g/l	Saccaro- sio uti- lizzato g/l	% ricupero carbonio **
0,416	57,8	5,1	Condizioni A ₁ (prova 1) 7,2	2,0	11,7	33,8	74,5
0,418	63,1	6,5	Condizioni A ₃ (prova 3) 4,9	1,3	10,7	27,2	81,7
0,453	68,7	5,2	8,2	1,3	13,4	33,4	79,9
0,418	122,0	11,4	Condizioni B (prova 1) 5,6	1,3	19,6	43,3	80,0
0,428	65,5	5,8	Condizioni*** C (prova 3) 1,7	0,3	8,6	17,2	85,5
0,214	46,3	7,1	Condizioni E (prove 3 e 5) 20,4	4,4	22,0	66,7	80,9

Temperatura, 37°; pH 5,25.

D = velocità di diluizione. * σ = velocità di assorbimento ossigeno.

** Percentuale di carbonio da saccarosio recuperato come batteri, diolo, acetoino ed anidride carbonica.

*** Aggiunta limitata di saccarosio; quantità fornita, 17,8 g/l.

I valori dati sono le medie; le variazioni sono illustrate nella Tabella 2.

TABELLA 2

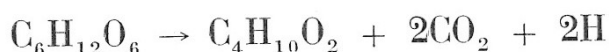
Variazioni nel processo di primo stadio
limiti di validità dei risultati con le condizioni E (Tabella 1).

	Limite di validità 95%	
	Inferiore	Superiore
σ (m-mole/l/ora)	44,6	48,0
Peso batterico secco (g/l)	6,8	7,4
Butandiolo (g/)	19,8	21,0
Acetoino (g/l)	4,2	4,6
Anidride carbonica (g/l)	21,0	23,0
Saccarosio utilizzato (g/l)	65,4	67,9

La deviazione standard del D era 0,006, il suo intervallo era 0,196-0,231.

eseguiti solo pochi studi ulteriori su questi fattori ma fu dimostrato che i valori superiori erano al di sotto dell'optimum.

Effetto della variazione della quantità di ossigeno e della velocità di diluizione. — Gli elementi fondamentali circa la relazione tra ossigeno e produzione di 2,3-butandiolo sono i seguenti. La produzione del diolo procede nel modo migliore in condizioni parzialmente aerobiche; in altre parole, essa richiede ossigeno ma non in eccesso. Una equazione teorica per la formazione di diolo a partire da esosio è la seguente:



L'idrogeno può comparire sotto forma di idrogeno libero; nel caso che sia disponibile ossigeno, questo fungerà da accettore di idrogeno [LEDINGHAM e NEISH (¹⁵)]. In un processo a flusso continuo il fabbisogno di ossigeno deve essere proporzionale alla velocità di diluizione [PIRT (¹⁶)].

La produzione di diolo in funzione della quantità di ossigeno disponibile e della velocità di diluizione nel secondo stadio è illustrata nella figura 2a. Va notato che le condizioni del primo stadio per ciascuna velocità di diluizione del secondo stadio differivano leggermente ma non in grado sufficiente per influenzare sensibilmente il processo del secondo stadio. I diagrammi mostrano che, con una introduzione costante di ossigeno, il diolo prodotto nel secondo stadio era inversamente proporzionale alla velocità di diluizione; questo fatto è prevedibile per motivi teorici [PIRT e COLLOW (⁴)]. Con una velocità di diluizione costante il diolo prodotto era entro certi limiti proporzionale alla quantità di ossigeno disponibile. La relazione fra diolo prodotto e σ_c richiede una ulteriore analisi, ma prima di procedere a questa occorre considerare gli effetti di cambiamenti nella velocità di diluizione e nella quantità di ossigeno sulla concentrazione batterica, sulla resa percentuale del diolo e sulla velocità di produzione del diolo per g di peso secco (q_{diolo}).

Nella figura 2c sono mostrati mutamenti nella concentrazione batterica. La resa di diolo espressa in percentuale del massimo teorico (1 mole/mole di esosio) (figura 2b) era inversamente proporzionale alla quantità di ossigeno disponibile. Si vedrà che, con una bassa quantità di ossigeno, si potè ottenere una resa del 100% in contrasto con un massimo di 70% da noi ottenuto in un processo a stadio unico.

Il q_{diolo} in funzione di σ_c e D è illustrato nella figura 2d. Il q_{diolo} è un parametro molto importante, ed è dato dalla seguente espressione:

$$q_{\text{diolo}} = \frac{\text{diolo prodotto/l}}{\text{peso batterico secco/l}} \times D$$

Ne consegue che un confronto dei valori di q_{diolo} , mantenendo fissi D e il peso batterico secco, fornisce le quantità relative di diolo prodotto/l di coltura e le velocità relative di produzione in g/ora. Il q_{diolo} era solo leggermente influenzato dai cambiamenti di σ_c ma mostrava una netta dipendenza da D . I valori di q_{diolo} massimi per ciascuna velocità di diluizione, riportati in funzione di D , si trovano sulla retta

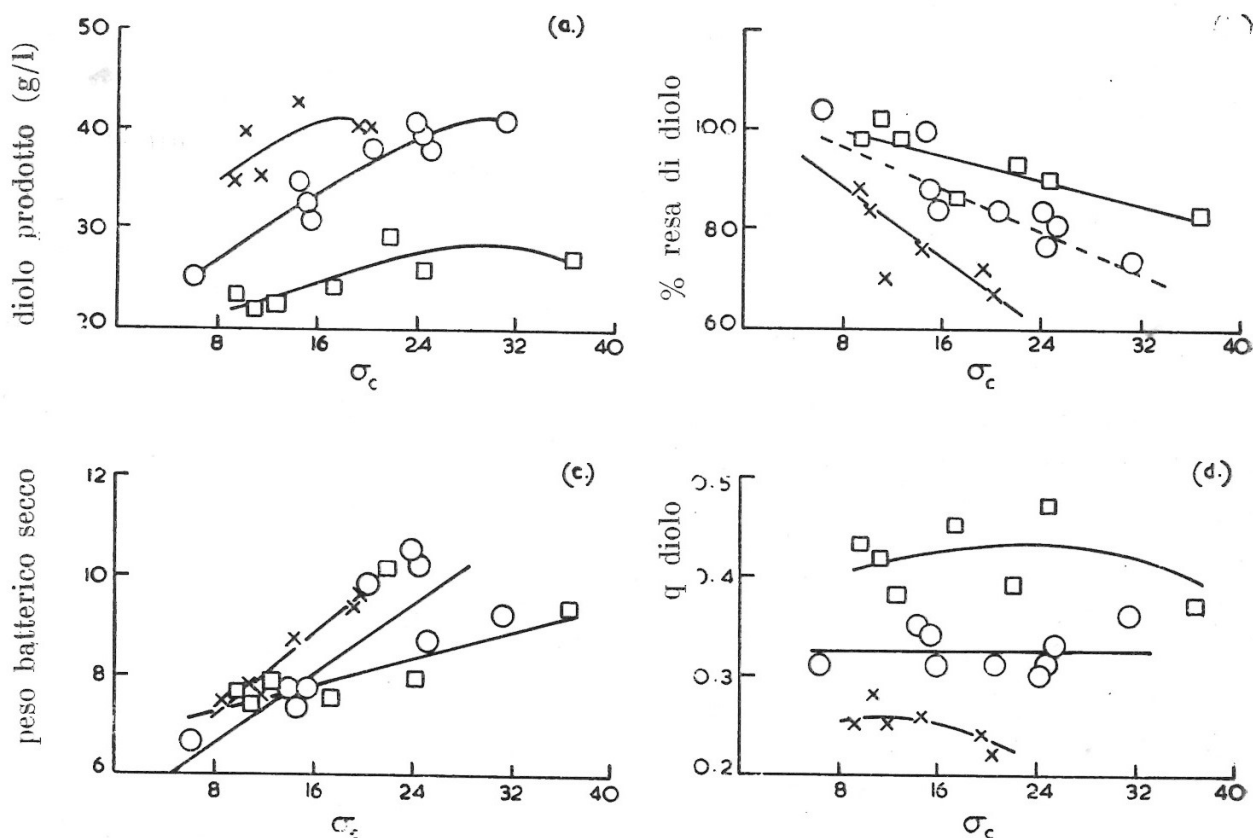


Fig. 2. - Effetti di cambiamenti nell'approvvigionamento di ossigeno (σ_c , m-m-mole/l/ora) e nella velocità di diluizione nel secondo stadio: (a) produzione di diolo, (b) resa di diolo in percentuale del massimo teorico, (c) peso batterico secco, (d) q_{diolo} . X, $D = 0,054$; condizioni di primo stadio, A_3 (Tabella 1). O, $D = 0,078$; condizioni di primo stadio, A_2 (Tabella 1). □, $D = 0,136$; condizioni di primo stadio A_1 (Tabella 1).

rappresentata da: $q_{\text{diolo}} = 0,15 + 2,06 D$: non sembra che vi sia alcuna spiegazione fisiologica di questa relazione lineare. Si era ritenuto che potesse essere causata da un calo della vitalità dei batteri col diminuire di D , ma da una misura della percentuale di vitalità si è potuto dimostrare che non variava allorchè la velocità di diluizione variava da 0,10 a 0,05 e in ciascun caso essa era superiore al 95%.

Tornando alla relazione tra produzione di diolo e σ_c , l'esame delle figure 2a, 2b e 2d dimostra che l'aumento della produzione di diolo con

l'aumento di σ_c non era dovuto ad un aumento della percentuale di resa nè ad un aumento del q_{diolo} . L'aumento può essere attribuito principalmente ad un aumento della concentrazione batterica, come dimostrato nella Tabella 3.

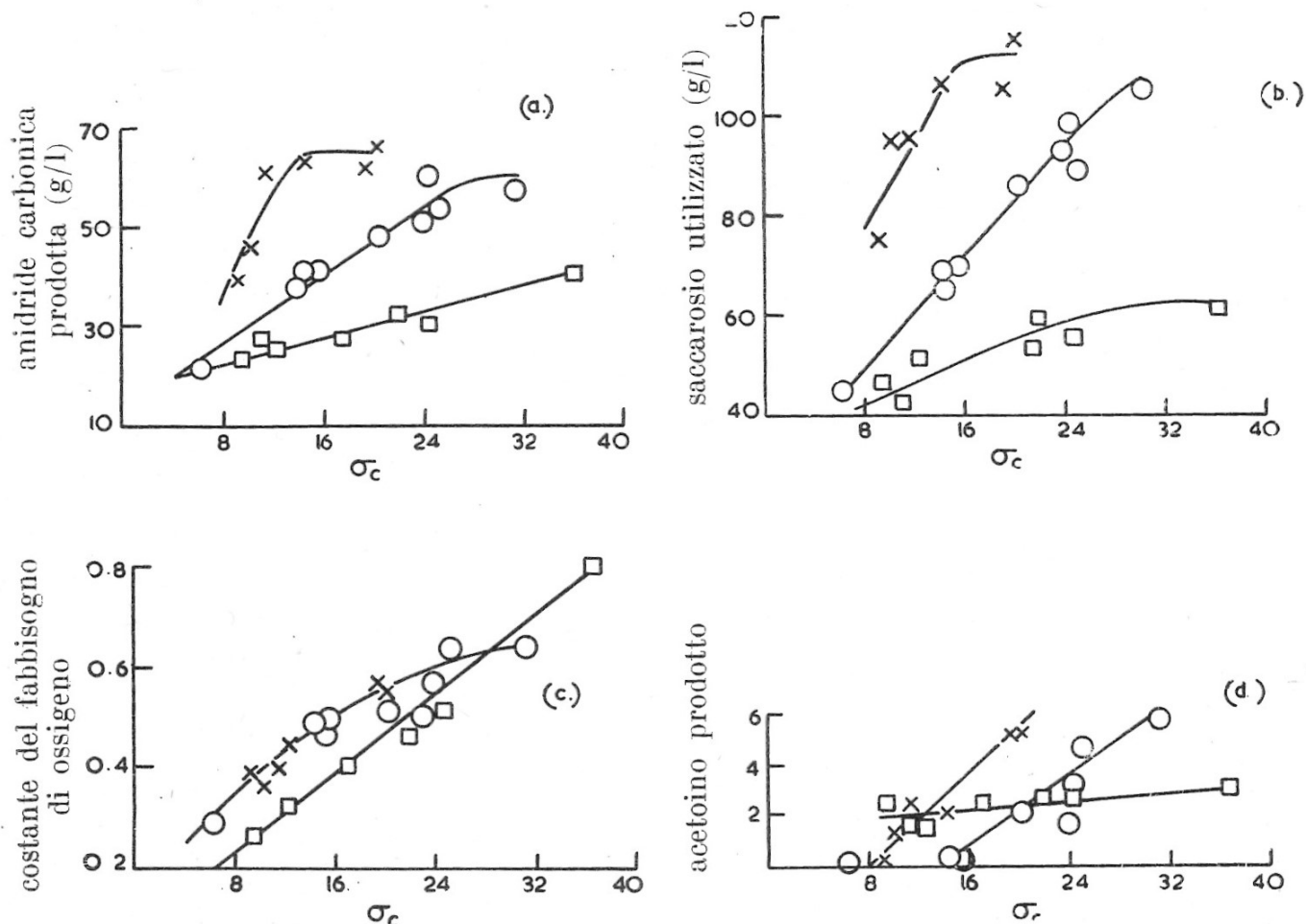


Fig. 3. - Effetto delle variazioni nell'approvvigionamento di ossigeno (σ_c , m.mole/l/ora) e nella velocità di diluizione nel secondo stadio: (a) produzione di anidride carbonica, (b) utilizzazione di saccarosio, (c) costante del fabbisogno di ossigeno (P, moli di ossigeno consumato per mole di esosio, (d) produzione di acetoino.

×, $D = 0,054$; condizioni di primo stadio, A_3 (Tabella 1)
 □, $D = 0,078$; condizioni di primo stadio, A_2 (Tabella 1).
 ○, $D = 0,136$; condizioni di primo stadio, A_1 (Tabella 1).

Equilibrio del carbonio. — Oltre al butandiolo e ai batteri, gli altri prodotti valutati furono CO_2 e acetoino. Quest'ultimo, che è un derivato ossidato del 2,3-butandiolo, viene generalmente prodotto insieme al diolo dall'*A. aerogenes*. La produzione di acetoino nel secondo stadio è illustrata nella figura 3d; la sua comparsa era in correlazione con la quantità di ossigeno. Alle velocità di diluizioni inferiori, di 0,054 e 0,078, si ebbe un valore limite nettamente definito di σ_c al disotto del quale non si produsse acetoino. L'anidride carbonica prodotta nel secondo stadio è illustrata nella figura 3a.

TABELLA 3

Effetto dell'aumento della quantità di ossigeno (σ_c) nel secondo stadio, confronto tra l'aumento della produzione di diolo e l'aumento della concentrazione batterica

D (ore ⁻¹)	Intervallo di σ_c (m-mole l/ora)	% aumento del diolo prodotto	% aumento concen- trazione batterica
0,054	9 - 16	14	20
0,078	6 - 24	58	52
0,136	10 - 24	20	39

I valori adoperati per compilare questa Tabella furono interpolati dalle figure 2a e 2c.

TABELLA 4

Ricupero percentuale del carbonio di distribuzione del carbonio del saccarosio nei vari prodotti.

	Sacca- rosio. utilizzato g/l	Carbonio prodotto come % del carbonio del saccarosio utilizzato				
		Diolo	Acetoino	Anidride carbon.	Batteri	Totale
Primo stadio *	33,4	31,1	5,0	26,0	17,8	79,9
Secondo stadio (D, 0,054; σ_c 10)	85,5	53,5	1,2	34,2	10,1	99,0
Complessivamente	118,9	47,2	2,3	31,9	12,3	93,7
Secondo stadio (D, 0,054; σ_c 15)	108,0	46,9	3,7	38,7	9,1	98,2
Complessivamente	141,4	43,1	4,0	35,7	11,1	93,9
Primo stadio **	27,2	22,8	6,2	25,5	27,3	81,8
Secondo stadio (D, 0,078; σ_c 14)	66,0	60,5	0	36,3	13,0	109,8
Complessivamente	93,2	49,4	1,8	33,2	17,2	101,6
Secondo stadio (D, 0,078; σ_c 24)	94,0	53,2	5,1	36,9	11,3	106,5
Complessivamente	121,0	46,4	5,3	34,3	14,9	100,9

* Condizioni del primo stadio, A₃ (Tabella 1).

** Condizioni del primo stadio, A₂ (Tabella 1).

L'utilizzazione del saccarosio nel secondo stadio è illustrata nella figura 3b. La percentuale di distribuzione del carbonio del saccarosio nei prodotti seguenti: diolo, acetoino, anidride carbonica e batteri, con quantità differenti di ossigeno disponibile e differenti velocità di diluizione, è illustrata nella Tabella 4. Nel primo stadio si ritrovò dell'80% circa del carbonio del saccarosio, e di conseguenza si formarono probabilmente alcuni prodotti sconosciuti. Il recupero del carbonio in base al saccarosio utilizzato nel secondo stadio superò talvolta il 100%. Questa quantità ha scarso significato in vista al gran numero di misure di concentrazione e di velocità richieste dal calcolo, ma può accadere che alcuni dei prodotti sconosciuti formati nel primo stadio fossero convertiti in diolo, CO_2 , ecc..., nel secondo stadio, dando così origine a recuperi di carbonio superiori al 100%, del carbonio contenuto nel saccarosio utilizzato. I recuperi totali di carbonio non dovrebbero tuttavia superare in misura rilevante il 100%.

Consumo di ossigeno in relazione al saccarosio utilizzato. — Una esatta conoscenza della richiesta di ossigeno ha particolare importanza in un processo parzialmente aerobico come quello della produzione di butandiolo, perchè la quantità di ossigeno dev'essere tenuta tra stretti limiti, a differenza di un processo interamente aerobico come sembra essere per esempio quello della produzione di penicillina, dove basta fornire un eccesso di ossigeno. La quantità di ossigeno consumata per mole di esoso, che viene da noi chiamata costante del fabbisogno d'ossigeno (P) è riportata nella figura 3c. Il valore di P si estendeva in un ampio intervallo sia al di sopra che al di sotto del valore teorico di 0,5, calcolato per il caso che l'ossigeno fungesse da accettore di idrogeno nell'equazione chimica data sopra. Può darsi che si formasse una certa quantità di idrogeno libero quando P era inferiore a 0,5. Ma non abbiamo tentato di individuare l'idrogeno, ma sarebbe forse stato meglio farlo per motivi di sicurezza. La relazione tra P e σ_c è rimarchevole, ma anche non è stato possibile dare una sicura spiegazione fisiologica. La conoscenza della concentrazione di ossigeno disciolto sarà probabilmente essenziale per una completa comprensione dell'effetto dell'ossigeno.

Concentrazione limite del saccarosio nella coltura. — Una delle differenze tra un processo continuo e un processo discontinuo è che, in una coltura continua, si presenta la questione: « quale è la minima concentrazione di substrato necessaria per mantenere la velocità del processo al suo massimo? ». Se si richiede un'elevata concentrazione residua, il processo porterà ovviamente a sprechi di substrato. Si sa poco della re-

lazione tra concentrazione del carbonio-substrato e velocità metaboliche, probabilmente perchè il problema non può facilmente essere studiato impiegando la tecnica di coltura discontinua. MONOD (¹⁷) si rese chiaramente conto di ciò; tuttavia, spingendo la tecnica fino al suo estremo limite, egli riuscì a determinare la concentrazione di glucosio limite per la velocità di crescita dell'*Escherichia coli*. Egli riuscì a dimostrare che bastavano circa 30 mg/l per raggiungere la velocità massima di crescita. Il problema viene molto semplificato applicando la tecnica di coltura continua. Con questo modo NOVICK (¹⁸) ha potuto dimostrare che la concentrazione di triptofano limite per la velocità di crescita di un batterio richiedente triptofano era di soli 4 µg/l circa. Alcuni esperimenti sono stati da noi eseguiti per farci un'idea della concentrazione limite di saccarosio per la crescita quando si voglia ottenere produzione di butandiolo nel secondo stadio. I risultati, riportati nella Tabella 5, indi-

TABELLA 5

Concentrazione limite del saccarosio nel secondo stadio. Analisi del processo del secondo stadio.

Concentrazione saccarosio nella coltura g/l	Saccarosio utilizzato g/l	Peso batterico secco g/l	Diolo prodotto g/l	Acetoino % prodotto g/l	% resa diolo	q _{diolo}
		D, 0,084; σ_c , 18				
4,5	83,4	9,8	33,2	2,7	76	0,28
35,1	80,7	8,6	35,6	0	84	0,35
		D, 0,045; σ_c , 17				
4,7	99,1	7,8	40,9	4,7	79	0,24
64,7	81,1	7,2	44,2	0,7	104	0,28

Condizioni di primo stadio, E (Tabella 1).

cano che una concentrazione di saccarosio di 4,5 g/l rappresentava all'incirca il livello limite della velocità. Ciò era mostrato dalle diminuzioni del q_{diolo} e della percentuale di resa del diolo e dall'aumento della produzione di acetoino. Una concentrazione limite della velocità di 4,5 g/l è sorprendentemente alta se si considerano le bassissime concentrazioni di substrato che limitano la velocità di crescita, riferite da

MONOD e da NOVICK, e fa pensare che altri fattori differenti agiscano nel processo per la produzione di butandiolo. La perdita di saccarosio era tuttavia relativamente bassa, giacchè 4,5 g/l rappresentavano soltanto 3% del totale fornito.

Variazioni nei nutriliti. — Si dimostrò che il terreno base sostentava concentrazioni batteriche di almeno 1,38% di peso secco, valore superiore al peso secco optimum (vedi sotto); di conseguenza non si resero necessarie modificazioni nutritive per aumentare la concentrazione batterica possibile. Si portarono varie modifiche aventi come scopo di stimolare la produzione di diolo, o più particolarmente di aumentare il q_{diolo} .

La quantità di minerale fu modificata in due maniere: ⁽¹⁾ aggiungendo Co, Cu e Mo, e ⁽²⁾ diminuendo la concentrazione di EDTA del 40%. Quest'ultima operazione dovrebbe equivalere ed aumentare la concentrazione di ioni metallici nelle condizioni di equilibrio, mediante diminuzione del grado di chelazione. Né l'una né l'altra di queste modifiche influenzò sensibilmente il q_{diolo} .

L'aggiunta di fattori di crescita con $D = 0,05$ diede un q_{diolo} di circa 15% superiore alla media; cambiamento pressochè insignificante.

Si potrebbe utilizzare melassa come sorgente di carbonio. Abbiamo constatato, come lo fecero FREEMAN e MORRISON ⁽¹⁸⁾, che la sostituzione di saccarosio puro con melassa rallentava la produzione di diolo, riducendo il q_{diolo} da 0,43 a 0,29 con $D = 0,08$.

INFLUENZA DELLE CONDIZIONI DEL PRIMO STADIO SUL PROCESSO DEL SECONDO STADIO.

Modifiche nella concentrazione batterica. — La quantità di batteri nel secondo stadio era in gran parte funzione della quantità prodotta nel primo stadio, come mostrato nella Tabella 6. Nel secondo stadio si verificò una certa crescita che era funzione della quantità di ossigeno disponibile, come mostrato nella figura 2c. Se il peso batterico secco superava 1% p/v circa, il q_{diolo} calava, come risulta dalla Tabella 6. Si tende a ritenere che la concentrazione optimum dell'organismo per una fermentazione sia la massima raggiungibile; è quindi interessante notare che questo non è necessariamente in ogni caso. Si possono solo fare supposizioni circa i motivi per la riduzione del q_{diolo} col crescere della concentrazione batterica; era forse esaurita la riserva di un elemento in tracce, oppure era limitata la diffusione di sostanze nutritive.

Influenza della quantità di batteri sviluppati nel primo stadio sul processo nel secondo stadio.

Peso secco batterico nel primo stadio g/l	Processo di secondo stadio fornente il massimo q_{diolo}				
	Peso secco batterico g/l	σ_c *** m-mole/l/ora	Diolo prodotto g/l	% resa di diolo	q_{diolo}
5,1*	8,5	26	28,0	89	0,45
11,4**	13,8	37	29,4	77	0,29

Rifornimento di saccarosio e velocità di diluizione. — Facendo del rifornimento di saccarosio un fattore limitante nel primo stadio (condizioni C, Tabella 1) non si influenzò in misura apprezzabile la produzione di diolo nel secondo stadio.

Un tentativo per vedere se la velocità di diluizione nel primo stadio avesse una qualche influenza sul processo del secondo stadio, ebbe solo parziale successo. I risultati, riportati nella Tabella 7, furono complicati dalla variazione della concentrazione batterica che si accompagnò alla variazione della velocità di diluizione. Dai risultati è tuttavia possibile dedurre che il q_{diolo} , e di conseguenza la quantità di diolo prodotta nel secondo stadio, non diminuiva abbassando la velocità di diluizione nel primo stadio; in un caso (prova 3, D del secondo stadio 0,049), il q_{diolo} nel secondo stadio fu molto più elevato del valore normale con una velocità di diluizione di primo stadio di 0,4.

Produzione complessiva nel processo a due stadi. — La produzione complessiva del processo a due stadi, nelle condizioni che davano una concentrazione massima di diolo, è illustrata nella Tabella 8. Impiegando melassa come sorgente di carbonio, non fu tentata una velocità di diluizione di secondo stadio inferiore a 0,08, dato che si sarebbe potuto ottenere con ciò una maggior concentrazione di diolo. E' preferibile una velocità di diluizione di 0,2 nel primo stadio, a causa del contributo considerevole che questo stadio fornisce alla produzione totale di diolo. E' illustrato più avanti un confronto tra questi risultati e quelli ottenuti con il processo discontinuo.

TABELLA 7

Confronto tra processi di secondo stadio con differenti velocità di diluizione nel primo stadio.

N. della prova	Condizioni e prodotti formati nel secondo stadio										Primo stadio D = 0,4**	
	Primo stadio D = 0,2*										2	3
	3	3	5	5	3	3	5	3	3	5		
Condizioni di primo stadio (Tabella 1)	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	A ₃	A ₂
Secondo stadio, D	0,049	0,049	0,049	0,049	0,083	0,083	0,049	0,083	0,083	0,086	0,054	0,078
σ_c (m-mole/l/ora)	10,2	13,4	10,4	13,6	17,5	17,9	8,0	8,5	8,1	20,0	12,0	17,7
Peso batt. secco (g/l)	5,7	5,7	8,0	7,8	44,9	42,8	40,1	43,2	42,8	7,0	7,9	8,3
Diolo (g/l)	52,1	50,8	40,1	43,2	1,7	2,6	0,3	0,1	2,6	30,7	37,7	34,3
Acetoino (g/l)	0,1	4,2	0,3	0,1	57,7	51,2	58,8	56,1	51,2	0,9	1,8	1,4
Anidride carbon. (g/l)	53,5	58,6	58,8	56,1	89,9	89,7	78,5	82,3	89,7	41,0	54,5	42,8
Saccarosio utilizzato (g/l)	95,7	105,0	78,5	82,3	94	91	97	100	89,7	66,8	94,5	76,0
Resa diolo (%)	104	92	97	100	94	91	97	100	91	88	82	86
q_{diolo}	0,46	0,50	0,25	0,27	0,43	0,43	0,25	0,27	0,43	0,38	0,26	0,43

* I risultati analitici in questa sezione derivano da singoli stati di equilibrio; ** I risultati analitici di questa sezione sono valori medi interpolati dei diagrammi delle figure 2 e 3.

Le velocità di assorbimento di ossigeno del secondo stadio erano prossime a quelle che forniscono le massime concentrazioni di diolo.

TABELLA 8

Produzione complessiva nel processo a due stadi: concentrazioni e rese massime del prodotto finale.

	Sorgente di carbonio saccarosio		Sorgente di carbonio melassa
	Prova 3	Prova 5	Prova 3
Diolo g/l	67,5	57,5	43,0
Acetoino g/l	3,0	4,0	3,9
Anidride carbonica g/l	70,6	72,0	60,0
Peso batterico secco g/l	5,7	7,8	9,0
Saccarosio utilizzato g/l	140	136	114
% resa diolo	92	89	72

Nel primo stadio: condizioni E (Tabella 1).

Nel secondo stadio: Prova 3 con saccarosio, $D = 0,050$; $\sigma_c = 10,2$; Prova 5 con saccarosio, $D = 0,048$; $\sigma_c = 13,6$; Prova 3 con melassa, $D = 0,082$; $\sigma_c = 17,0$.

VARIAZIONI DELLA CULTURA IN RELAZIONE ALLA PRODUZIONE DEL DIOLO.

Non ci fu possibile osservare in nessuna di quattro colture con una durata globale di operazione pari a 5800 ore, la prova più lunga (prova 3) avendo una durata di 2500 ore, alcuna selezione di un differente tipo di organismo che causasse una modificazione significativa nella concentrazione massima o nella percentuale di resa di butandiolo. Attendemmo che la coltura passasse per circa 50 generazioni prima d'iniziare le analisi in condizioni d'equilibrio, e può darsi che durante questo periodo il q_{diolo} aumentasse, come constatammo nel nostro lavoro a stadio unico. Si ebbe una certa variazione relativamente piccola nella produzione di diolo da una prova all'altra, per motivi sconosciuti.

DISCUSSIONE

Confronto tra processi continui e discontinui. — I risultati ottenuti danno la possibilità di determinare i vantaggi relativi dei processi continui a stadio unico e a due stadi e del processo discontinuo. La Tabella 9 mostra che, nel processo a due stadi, riuscimmo ad ottenere concentrazioni

TABELLA 9

Confronto tra fermentazione discontinua, fermentazione continua a stadio unico e fermentazione continua a due stadi per la produzione di 2,3-butandiolo per mezzo di *Aerobacter aerogenes*.

Riferimento	Concentrazione massima diolo g/l	Resa di diolo %	Velocità produ- zione diolo g/ora/l di capacità lavorativa**
Conc. massima diolo g/l coltura discontinua; sorgente di carbonio: saccarosio.			
FREEMAN e MORRISON (19)	65	87	1,6
DUDYKINA (22)	58	77	1,6
Coltura continua a stadio unico; sorgente di carbonio: saccarosio.			
PIRT e CALLOW (4)	30	61	3,0
Coltura continua a due stadi; sorgente di carbonio: saccarosio			
	57 a 67	80 a 92	2,2 a 2,7
Coltura discontinua; sorgente di carbonio: melassa.			
FREEMAN e MORRISON (19)	39	72	0,9
WHEAT (21)	27	75	0,8
Coltura continua a due stadi; sorgente di carbonio: melassa.			
	43	72	2,5

* Percentuale di massimo teorico.

** Nella coltura continua a due stadi la capacità lavorativa è la somma dei volumi di coltura in ambedue gli stadi.

di diolo e percentuali di resa altrettanto elevate quanto i massimi registrati per il processo discontinuo, sia con saccarosio sia con melassa quali sorgenti di carbonio. La velocità di produzione per litro di capacità lavorativa era 1,7 volte superiore al massimo nel processo discontinuo con saccarosio quale sorgente di carbonio, e 2,8 volte superiore con il substrato di melassa. Le velocità di produzione dei processi discontinui sarebbero effettivamente inferiori a quelle segnate nella Tabella perchè nel calcolarle non si è tenuto conto del periodo di carico e scarico tra singole partite, o delle esigenze molto maggiori di capacità del recipiente di semina nel processo discontinuo. In confronto con il processo a stadio unico, il processo a due stadi diede una concentrazione doppia di diolo e

aumentò del 20% la percentuale di resa, ma diede una velocità di produzione leggermente minore per litro di capacità lavorativa.

Condizioni di coltura. — L'influenza tra velocità di diluizione, concentrazione batterica e rifornimento di ossigeno è complessa e di grande importanza per il successo del processo. Dedicammo la massima parte della nostra attenzione a questo aspetto, ma si potrebbe probabilmente ottenere una produzione di diolo e una velocità di produzione anche maggiori in seguito a studi ulteriori. Abbiamo definito rigorosamente la quantità optimum di ossigeno per varie velocità di diluizione. Occorre probabilmente definire più rigorosamente la concentrazione batterica optimum.

Questo lavoro pone vari e importanti problemi di fisiologia batterica; in particolare, per quale motivo il q_{diolo} deve essere influenzato dalla velocità di diluizione e dalla concentrazione batterica? e per quale motivo la costante del fabbisogno dev'essere una funzione lineare della quantità di ossigeno disponibile? Questi problemi sono stati definiti come conseguenza del fatto che la tecnica di coltura continua consente un controllo molto superiore; la loro soluzione dovrebbe dare un forte contributo allo sviluppo dei processi microbici.

DEINDOERFER e HUMPHREY (²⁰) hanno suggerito recentemente che da uno studio del processo discontinuo si potrebbero dedurre previsioni sulle condizioni per una coltura a stadi multipli. Questa asserzione, tenuto presente il nostro lavoro, potrebbe indurre in errore. Benchè sia possibile determinare, in coltura discontinua e in coltura continua a stadio unico, alcune delle condizioni necessarie per il processo a due stadi, per esempio la temperatura nel caso della produzione di butandiolo, l'esperimento con il sistema a due stadi è necessario per definire certe condizioni; nella produzione di butandiolo, per esempio, si sono dovute definire in questa maniera la velocità di diluizione, la quantità di ossigeno e la concentrazione batterica nel secondo stadio.

Si potrebbe altresì ritenere aprioristicamente che, se il processo di formazione esocellulare del prodotto accompagna la crescita, il sistema a stadio unico dovrebbe essere soddisfacente. La produzione di butandiolo è un processo del genere, ma anche in questo caso i nostri risultati mostrano che il processo a due stadi è il migliore.

Il concetto del processo a due stadi può essere esteso al postulato secondo il quale se un processo microbico consta di n fasi, richiedenti ciascuna condizioni differenti, teoricamente una coltura continua per il processo dovrebbe essere costituita da n stadi separati, ciascuno con le condizioni adatte per una fase del processo. In conclusione,

questo lavoro dimostra la validità del concetto di processo a due stadi e apre la via ad una valida applicazione della tecnica di coltura continua a processi secondari alla crescita; questi processi includono, oltre alla formazione di prodotti esocellulari, la decomposizione microbica di prodotti di scarto, la sporulazione, e la produzione di virus.

Ringraziamento. — Rivolghiamo il nostro ringraziamento al direttore di questo Stabilimento, Dr. D. W. Henderson, per il suo interesse stimolatore per questo lavoro, e Mr. S. Peto, studioso di statistica, per il suo consiglio. Mr. J. E. D. Stratton ha dato larga assistenza tecnica, Mr. W. A. Gillett ha eseguito lavori di controllo batteriologico e Mrs. P. Raymond ha dato anch'essa il suo apporto. Va elogiata la diligente opera svolta dagli addetti ai processi. Il Dr. L. A. Allen della Tate and Lyle Ltd. ha cortesemente curato la fornitura delle melasse.

Porton - Ministero degli Approvvigionamenti, Laboratorio di Ricerche Microbiologiche.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HERBERT D., ELSWORTH R. e TELLING R. C. - J. gen. Microbiol., 14: 601 (1956).
- (2) MALEK I. - Continuous Cultivation of Micro-organisms, a Symposium, ed., MALEK I., p. 11, Prague: Czechoslovak Academy of Sciences (1958).
- (3) PIRT S. J. e CALLOW D. S. - Chem. and Ind., 381 (1958).
- (4) PIRT S. J. e CALLOW D. S. - J. appl. Bact., 21: 188 (1958).
- (5) DYR J., PROTIVA J. e PRAUS R. - Continuous Cultivation of Micro-organisms, a Symposium, ed., MALEK I. - p. 210, Prague: Czechoslovak Academy of Sciences (1958).
- (6) NOWREY J. E. - Multi-tank continuous Fermentation, Thesis, Urbana, Illinois (1953).
- (7) RUF E. W., STARK W. H., SMITH L. A. e ALLEN E. E. - Ind. Eng. Chem., 40: 1134 (1948).
- (8) ANDREEV K. P. - Continuous Cultivation of Micro-organisms, a Symposium, ed.; MALEK I. - p. 186, Prague: Czechoslovak Academy of Sciences (1958).
- (9) BILFORD H. R., SCALF R. E., STARK W. H. e KOLACHOV P. J. - Industr. Eng. Chem., 34: 1406 (1942).
- (10) ELSWORTH R., MEAKIN L. R. P., PIRT S. J. e CAPELL G. H. - J. appl. Bact., 19: 264 (1956).
- (11) PIRT S. J. e CALLOW D. S. - J. appl. Bact., 21: 206 (1958).
- (12) ROGERS H. J. - J. gen. Microbiol., 16: 22 (1957).
- (13) PIRT S. J. e CALLOW D. S. - J. appl. Bact., 21: 211 (1958).
- (14) COWAN S. T. - J. gen. Microbiol., 15: 345 (1956).
- (15) LEDINGHAM G. A. e NEISH A. C. - Industrial Fermentations, 2: ed.; UNDERKOFER L. A. e HICKEY R. J. - New York: Chemical Publishing Co. (1954).
- (16) PIRT S. J. - J. gen. Microbiol., 16: 39 (1957).
- (17) MONOD J. - Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, p. 62. Paris: Hermann and Cie (1942).
- (18) NOVICK A. - Continuous Cultivation of Micro-organisms, a Symposium, ed.; MALEK I. - p. 29, Prague: Czechoslovak Academy of Sciences (1958).
- (19) FREEMAN G. G. e MORRISON R. I. - J. Soc. chem. Ind. Lond., 66: 216 (1947).
- (20) DEINDOERFER F. H. e HUMPHREY A. E. - Abstracts of Papers, 134th Meeting, Amer. Chem. Soc., 10A (1958).
- (21) WHEAT J. A. - Canad. J. Technol., 31: 73 (1953).
- (22) DUDYKINA N. V. - Microbiology, Moscow, 18: 181 (1949).