

Estudios sobre la penicilina V.

Influencia de la acción enzimática sobre la producción de penicilina.

por P. Negroni e I. Fischer

En experimentos anteriores habíamos comprobado que la fuente nitrogenada tenía mucha importancia en la producción de penicilina y que en los medios peptonados se obtenía regularmente su formación. Indagamos, entonces, si las diferentes proporciones de peptona modificaban el título de penicilina.

Estas experiencias fueron emprendidas el 20 de Mayo del corriente año y en esta oportunidad utilizamos el medio semisólido a base de afrecho comunicado por los Dres. Modern, e Illa y Sr. Arzeno, a quienes agradecemos los datos y el material suministrado.

Preparamos una serie de frascos de ginebra con un contenido de 80 grs. de afrecho que esterilizamos en el autoclave a 120° y por otra parte una serie de frascos de Erlenmeyer cada uno de los cuales contenía 200 ml. de solución de fosfatos "buffer" ph 6, 8, adicionados de diferentes cantidades de Bactopeptona Difco, 1%, 5% y 10%, por duplicado. Una vez fríos, se los sembró con una suspensión de esporos de un cultivo de *Pencillium notatum*, volcando su contenido en los frascos con afrecho, agitándolo y haciéndolo rotar para cubrir, lo más uniformemente posible, todas sus paredes con el medio de cultivo y se incubaron a una temperatura vecina a los 24°C.

Al cabo de 5 días adicionamos, a cada frasco de ginebra, 300 ml. de agua destilada estéril, agitamos y dejamos extraer durante tres horas, con el siguiente resultado: los líquidos obtenidos tenían un pH vecino al original, de 6 a 6,6, la reacción de almidón (con yodo) dió, en todos, una coloración pardo rojiza indicando una hidrólisis parcial y la reducción del licor de Fehling fué en todos positiva. Queremos hacer notar que el afrecho es rico en almidón. Ninguno de los líquidos contenían penicilina (inhibición del crecimiento de la cepa 209 de *Staphylococcus aureus*).

Como en experiencias anteriores habíamos comprobado que la penicilina aumenta cuando toda la fuente hidrocarbonada ha sido metabolizada prolongamos la incubación de los frascos restantes (duplicados) hasta el 13º día, con el siguiente resultado: hidrólisis completa del almidón, reducción de licor de Fehling positiva en todos los frascos, el pH. fué de 6-6,2 para el frasco con 1 % de peptona, 6,6-6,8 y de 7,6 para el frasco que contenía 10% de peptona. La producción de penicilina fué, sin embargo, sumamente pobre: nula con 1% de peptona, 0,45 unidades con 5% y de 1 unidad Oxford (valor aproximado) en el frasco que contenía 10% de peptona.

De esta serie de experiencias creemos poder deducir los siguientes hechos: Que el afrecho es rico en almidón y que es necesario prolongar la incubación del cultivo hasta que toda esta sustancia haya sido hidrolizada, para que comience visiblemente la formación de penicilina. Que el frasco cuyo pH ha sido más elevado, fué el que presentó mayor título de penicilina. Posiblemente la gran cantidad de azúcares reductores que son fermentados por el hongo con producción de ácidos, por un lado, y la presencia de los fosfatos "buffer", por otro, se han opuesto a la modificación (elevación) del pH. y a la formación de penicilina.

Efectuamos pues otra serie de experiencias con las mismas proporciones de peptona, en unos disuelta en solución de fosfato "buffer" y en otros en agua destilada y, como habíamos preparado cada uno de estos elementos por cuadruplicado introdujimos, en dos de ellos, la aereación a partir del quinto día de incubación.

La investigación de penicilina dió resultado positivo al 5º día únicamente en los frascos con 10% de peptona, tanto en los cultivos efectuados con esta sustancia disuelta en fosfatos "buffer" como en los adicionados de peptona disuelta en agua destilada. Su título fué sin embargo muy bajo. Al cabo de 13 días de incubación los resultados fueron los siguientes:

	<i>Proporción de peptona</i>	<i>Unidades Oxford</i> (valor aproximado)
<i>Sin aereación</i>	1 % en agua	9
	5 % en agua	no titulable.
	10 % en agua	no titulable.
	1 % en sol. buffer	4,25 unidades.
	5 % en buffer	no titulable.
	10 % en sol. buffer	no titulable.
<i>Con aereación</i>	1 % en agua	15 unidades.
	5 % en agua	6,75
	10 % en agua	2,5
	1 % en sol. buffer	9
	5 % en sol. buffer	1,97
	10 % en sol. buffer	1,30

El pH. fué de 7,8 a 8,2 en todos los frascos.

Del resultado de estas experiencias, creemos poder extraer las siguientes conclusiones: Las soluciones más concentradas de peptona no favorecen sino que, por el contrario, entorpecen la formación de penicilina y lo mismo acontece con la solución de fosfatos "buffer", pH 6,8.

Haciendo pasar diariamente una corriente de aire, se favorece considerablemente la producción de penicilina. En estas condiciones el líquido obtenido al cabo de 13 días de incubación a unos 24°C no da más la reacción del almidón ni reduce el licor de Fehling, el pH alcanza, también, valores más bajos.

El 23 de Mayo del corriente año pensamos utilizar otros ingredientes con el objeto de mejorar los resultados obtenidos hasta el presente. Dado que la penicilina es un ácido orgánico nitrogenado, que según Abraham y sus colaboradores el 59 % de su nitrógeno total puede ser calculado como nitrógeno aminado y que por hidrólisis da penicilamina, preparamos agua peptonada al 1 % a la cual agregamos 0,1% de sulfato de protamina (de testículos de Salmón, B. D. H.)

Como es sabido la protamina es una proteína compuesta casi exclusivamente de diaminoácidos y nuestra idea fué que, ofreciéndole al hongo los materiales que pueden entrar en la composición de la penicilina, se lograría obtener un mayor rendimiento de esa substancia.

Por otra parte nos propusimos emplear, también, alcoholes hexavalentes —el sorbitol y manitol—, dado que los azúcares reductores no dieron, en nuestras manos, resultados satisfactorios. En estas experiencias se utilizaron medios líquidos exclusivamente, e introdujimos, en algunos casos de ellos, un último factor, el CO₃Ca., para proteger a las funciones del hongo, de los ácidos formados eventualmente. Exponemos, a continuación, los siguientes protocolos:

Frasco Nº	Contenido	pH	Título de penicilina
121	150 ml. de soluc. acuosa de Bactona difco al 1%	8,4	3,5 unidades
122	Id., más 10 gr. de CO ₃ Ca.	8,4	0,55
123	150 ml. de agua peptonada al 1% más 0,1% de protamina.		no hay desarrollo
124	150 ml. del medio 123 más 10 gr. de CO ₃ Ca.		no hay desarrollo
125	150 ml. de agua preptonada al 1% con 1% de sorbitol.	8,2	1 unidad.
126	150 ml. de agua peptonada al 1% 1% de sorbitol y 10 gr. de CO ₃ Ca.	5,8-6	0,64
127	150 ml. de agua peptonada al 1% con 1% de manitol.	8,2	3,5 unidades.
128	Id. que el medio anterior más 10 gr. de CO ₃ Ca.	8-8,2	1 unidad.

El pH. inicial de estos medios de cultivo fué de 6,8; se les hizo pasar una corriente de aire a partir del 4º día, prolongándose la incubación hasta el 8º. Debemos agregar que la protamina se esterilizó en el autoclave conjuntamente con la peptona, y que el CO_2Ca . se esterilizó, en cambio, aparte.

En vista de que los frascos que contenían protamina no habían desarrollado, le tomamos el pH. y, como era de 6,8, lo sembramos nuevamente con una suspensión densa de esporos del *P. notatum*. El resultado fué, sin embargo, el mismo.

Resumiendo el resultado de estas experiencias podemos decir que en presencia de peptona el hongo produce penicilina sin que la adición de manitol mejore su rendimiento. La adición de sorbitol y de carbonato de calcio reducen, en cambio, la producción de penicilina.

A medida que aumentaba el número de nuestras experiencias, mayor era nuestra impresión de que el hongo no forma penicilina en un medio de cultivo rico, que es necesario una pobreza de nitrógeno, y que haya metabolizado casi totalmente la fuente hidrocarbonada, antes de que forme una cantidad apreciable de penicilina. Por eso resolvimos volver a emplear el afrecho, pero hidrolizando antes el almidón con el *Aspergillus oryzae*, hongo que tiene muy desarrollada esta propiedad, o sembrándolo con el *Penicillium notatum*, que también es amilolítico.

Los frascos de ginebra con 50 gr. de afrecho fueron esterilizados en el autoclave a 120º y luego sembrados con una suspensión de esporos del *P. notatum* a 150 ml. de agua destilada, los sacudimos para distribuir, uniformemente, el medio de cultivo y la semilla, e incubamos a 28º, haciendo pasar, diariamente, una corriente de aire. Como testigos, dos frascos de ginebra conteniendo igual cantidad de afrecho que los anteriores, fueron adicionados de 150 ml. de agua estéril, sin sembrar.

Con intervalos de 4, 6 y 8 días se vertió en cada frasco 100 ml. de agua peptonada (Bacto Difco) y manitada al 1,5% y, después de agitar su contenido, se prolongó la incubación otros 5 días, pero a 24º C, al cabo de los cuales se extrajo el principio activo con 300 ml. de agua, y se tituló por el método de Oxford con el siguiente resultado:

Fracos sometidos a una digestión previa de		
4 días a 28º	40	unidades
Fracos sometidos a una digestión previa de		
6 días a 28º	21	unidades
Fracos sometidos a una digestión previa de		
8 días a 28º	16,5	unidades
Fracos testigos, sin digestión previa	5,5	unidades

El líquido obtenido tenía un pH. 7,6, y, salvo en los frascos testigos, la investigación de almidón y de azúcares reductores fué completamente negativa.

La digestión previa con el *Aspergillus oryzae*, condujo a resultados mediocres.

En vista de estos últimos resultados, el 10 de junio preparamos 16 frascos de ginebra con 50 gr. de afrecho, que fué sometido a 4 días de digestión por el *P. notatum* a 28°, al cabo de los cuales se adicionó los medios que a continuación se especifican, haciéndose dos lecturas a los 5 y 7 días de incubación a 24° C.

Frasco N°	Contenido	pH.	Título a los 5 días	Título a los 7 días
131	Agua corrientes peptonada al 0,3%	7,8-8	48,5 U.	
132	Id.	Id.		Nulo (infect.)
133	Agua peptonada al 0,3% y manitada al 1,5%	Id.	48,5 U.	
134	Id.	Id.		57,75 U.
135	Agua manitada al 1,5%	Id.	50 U.	
136	Id.	Id.		60 U.
137	Medio mineral (1)	Id.	38 U.	
138	Id.	Id.		57,75 U.
139	Medio mineral reemplazando al sulfato de amonio por peptona	Id.	44,25 U.	
140	Id.	Id.		50 U.
141	Medio mineral (1) con 5% de manitol	6,4	30,5 U.	
142	Id.	7,8-8		35,12 U.
143	Medio mineral (1) con 0,000015% de ácido pimelico	Id.	38 U.	
144	Id.	Id.		58 U.
145	Agua corriente	Id.	5,5 U.	
146	Id.	Id.		38 U.

El medio mineral (1) tenía la siguiente composición: fosfato dipotósico 0,20 %, cloruro de sodio 0,30 %, sulfato de magnesio 0,01 % y sulfato de amonio 0,25 %. Para el cálculo del título de penicilina hemos tenido en cuenta la dilución sufrida por el afrecho en el momento de la siembra y por el agregado del medio de cultivo.

El *Penicillium notatum* desarrolla exuberantemente en el afrecho mojado con agua estéril.

El 23 de junio efectuamos la última serie de estas experiencias que consistió en la preparación de 8 frascos con 50 gr. de afrecho digeridos por el *P. notatum* durante 5 días a 25° C. al cabo de los cuales les agregamos los líquidos que a continuación se detallan:

Frasco Nº	Contenido	pH.	Titulación a los 5 días	Titulación a los 8 días
151	Agua manitada al 0,1 %		40,5 U.	
152	Id.			115 U.
153	Agua manitada al 1 %		17,35 U.	
154	Id.			102 U.
155	Agua manitada al 5 %		7 U.	
156	Id.			53,75 U.
157	Cornstip 25° Beaumé		26,87 U.	
158	Id.			30,5 U.
159	Afrecho no digerido sem- brado con esporos suspendidos en "cornstip" 25° B.		5,5 U.	48,75 U.

Por un error se empleó el "Cornstip" de 25° B. sin diluir.

CONSIDERACIONES

De lo expuesto vemos que el *P. notatum* produce el máximo de penicilina en medios pobres, cuando ha agotado casi totalmente su material nutritivo carbonado y nitrogenado. La aereación favorece manifiestamente la marcha del proceso, facilitando por un lado las combustiones y eliminando por otro el CO₂ acumulado por la respiración del hongo que, según hemos demostrado en trabajos anteriores, es nocivo para la producción de penicilina (1 2 3).

Estos resultados vienen a confirmar las investigaciones de Schiller (4) y de Beauverie (5). En efecto; el primero de estos autores, en sus estudios sobre el antagonismo provocado, efectuados en 1927, comprobó que ciertas bacterias y levaduras son capaces de segregar un principio lítico para otros microorganismos en medios de cultivo libres de N y a veces también, de fuente hidrocarbonada. Considera ese autor que son factores de importancia en este fenómeno el espacio, el oxígeno y la humedad.

Beauverie en un libro publicado en el año 1900 detalla el resultado de sus experiencias sobre el polimorfismo de los hongos bajo a influencia del medio de cultivo. Con el *Aspergillus variabilis* comprobó que, en condiciones óptimas de temperatura y alimentación, la producción de esporos reclama la presencia de aire constantemente renovado y que la proporción de conidias aumenta con la transpiración que se produce en la planta. En una atmósfera muy húmeda predomina el micelio vegetativo. La concentración de sustancias del medio de cultivo favorece la formación del micelio profundo, retarda la germinación y aumenta el tabicamiento.

RESUMEN

Utilizando agua peptonada como medio de cultivo para el *P. notatum* se obtiene regularmente la producción de penicilina. Las concentraciones mayores de 5 % de esta substancia parecen perturbar esta función.

Disolviendo la peptona en una mezcla de fosfatos "buffer" pH 6, 8, se obtiene un rendimiento inferior de penicilina en relación al obtenido en los medios sin sales.

Empleando un medio semisólido a base de afrecho, es necesario prolongar la incubación hasta que el hongo haya metabolizado completamente la fuente hidrocarbonada para obtener el máximo de producción de penicilina.

La aeración de los cultivos favorece este proceso.

La adición de CO_2 , Ca o de sorbitol a los medios líquidos peptonados es ineficaz. La adición de 1 por mil de sulfato de protamina impide el desarrollo del hongo.

Sometiendo el afrecho a la acción enzimática del *P. notatum* durante 4 días a 28° C y agregándole luego un volumen adecuado de agua peptonada y manitada al 1,5 % e incubando luego a 24° C. se mejoran ostensiblemente los resultados.

El empleo de un medio mineral con 0,25 por ciento de sulfato de amonio o reemplazando esta sal por igual proporción de peptona fué ineficaz.

Los mejores rendimientos en penicilina fueron obtenidos agregando al afrecho previamente digerido por el *P. notatum* agua manitada. Haciendo variar la proporción de manita comprobamos que la de 0,1 % es la mejor.

BIBLIOGRAFÍA

1. NEGRONI, P. — Estudios sobre la penicilina: I. Influencia de ciertos factores físicos y químicos sobre su producción. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, 5, 238-242.
2. NEGRONI, P. y FISCHER, I. — Estudios sobre la penicilina II. Influencia de la fuente carbonada de nutrición. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, 25, 1134-1137.
3. NEGRONI, P. y FISCHER, I. — Estudios sobre la penicilina III. Influencia de la fuente de nutrición nitrogenada. La Prensa Med. Arg., **31**, 1944, 25, 1137-1139.
4. SCHILLER, I. — Über erzwungene Antagonismen. V. Mitt. Ob. f. Bakt. I Abt. Bd. 103, 1927, H. 4/5, pp. 304-314.
5. BEAUVERIE, J. — Etudes sur le polymorphisme des champignons. Influence du milieu. Paris-Lyon, 1900.
6. SCHMIDT, W. H. and MOYER, A. J. — Penicillin Methods of assay. J. of. Bact. **47**, 1944, 2, 199-210.
7. FOSTER, J. W. AND WOODRUFF, H. B. — Microbiological aspects of penicillin. J. of Bact., **46**, 5, 421-433.