

Algunos medios de cultivo para la preparación de penicilina

Por F. MODERN, R. ILLA y M. ARZENO

La acción bactericida encontrada por Fleming (1) en cultivos de *Penicillium notatum* fué estudiada en una serie de trabajos por un grupo de investigadores de Oxford (2) que llegó a la obtención de una substancia de elevado poder bacteriostático que hoy se conoce como penicilina. Abraham (3) y colaboradores consiguen luego un producto más purificado, con un poder antibacteriano más elevado. Estudiando la purificación y algunas propiedades físicas y químicas de la penicilina, Abraham y Chain (4) dan una fórmula provisoria para la penicilina cristalizada en forma de sal de bario.

En Inglaterra, Abraham, Chain, Fletchner, Florey, Gardner, Heatley y Jennings (5) establecen la unidad arbitraria que la denominan Oxford, que corresponde a la cantidad de penicilina disuelta en 1 cm³ que produce un área de inhibición de 24 mm de diámetro sobre cultivos de estafilococo, en condiciones perfectamente determinadas.

En este trabajo, por carecer de la penicilina « Standard » utilizamos un valor comprendido entre la unidad americana (21 mm) y la inglesa (24 mm). Se calculó 22 mm de diámetro para una U. Ox. (*), utilizando los mismos medios y la misma cepa de estafilococo usada por los americanos.

Describimos diferentes medios de cultivo líquidos y semisólidos, capaces de dar mejor rendimiento de penicilina y nos ocupamos ahora, de purificar el producto obtenido.

Iniciamos nuestros estudios sembrando el *Penicillium notatum* (**) en un caldo que utilizamos con éxito hace algún tiempo en el Instituto para la obtención de toxina diftérica y cuyo método de obtención fué publicado (6).

(*) Cada vez que se dice U. Ox., se entiende por lo tanto que se trata de unidad Oxford convencional.

(**) Cepa facilitada por el Dr. Negroni, a quien agradecemos su colaboración.

Presentado para publicar el 25 de abril de 1944.

A este caldo adicionado de hidrolizado de caseína y « mejoradores » le agregamos 1 % de maltosa y llevamos a pH 8,2 y pH 7,6. Al tercer día de la siembra pudimos comprobar que contenían 2 unidades Oxford (U. Ox.) sin aumentar por espacio de 12 días. Este valor es prácticamente igual al que alcanzaron otros autores con diferentes medios: Taylor, Kocholaty, Chalinor, Chain, etc. (7).

El clásico medio de Czapek-Dox y su modificación de Clutterbuck (8) da un mayor desarrollo vegetativo, principalmente en los medio con levadura, pero el rendimiento en penicilina se mantiene en 2 U. Ox.

Estudiamos sistemáticamente el medio con hidrolizado de caseína, « mejoradores » y diferentes azúcares (glucosa, maltosa y lactosa) a pH 6,8. Obtuvimos mejor resultado con lactosa, llegando a 4 U. Ox. El pH no desciende tan bruscamente como en el medio de Czapek-Dox que llega fácilmente a pH 4,0. Cuando trabajamos con un medio cuyo pH inicial es de 8,3 el rendimiento en penicilina fué menor, no pasando de 1 U. Ox.

La influencia de la temperatura sobre el desarrollo del *Penicillium* es muy importante, siendo óptima a 24°C. Nosotros trabajamos en una serie de ensayos con el medio de Czapek-Dox modificado y adicionado de diferentes azúcares; la temperatura del medio ambiente era superior a 26°C y como no obtuvimos más de 1 U. Ox. atribuimos la causa de este bajo valor a la temperatura. Repitiendo todos estos ensayos pudimos comprobar que sembrando en medio líquido (300 cm³ por frasco de 1 litro) se alcanzaban valores comprendidos entre 2 y 4 U. Ox. y que difícilmente se aumentaba el tenor en penicilina aunque se modificasen distintas variables del medio.

Con estos antecedentes, nos propusimos conseguir un valor mucho mayor modificando completamente los medios de cultivo del *Penicillium notatum* y de acuerdo a las indicaciones, que mucho agradecemos del Dr. Sordelli, sembramos en medios semisólidos. Estos medios estaban constituidos por afrecho y agua de maceración de maíz concentrada (Corn-Steep) de la Refinería de Maíz.

Usamos 200 cm³ de agua de maceración a las diluciones que más adelante consignamos. Esta agua de maceración tenía una densidad de 19°Bé y la composición química era aproximadamente la siguiente (*):

Substancia seca	50 %
Proteínas	40 %
Acido láctico más del	10 %
Anhidrido sulfuroso (SO ₂)	0.4 %

(*) Análisis facilitado por la Refinería de Maíz S. R. L.

En todos los casos agregamos 80 gr de afrecho en frascos de un litro y esterilizamos con vapor a $1\frac{1}{2}$ atmósferas, durante 1 hora.

Agregamos al afrecho el agua de maceración, previamente llevada a pH 5,5-6,0 con NaOH al 50 %, esterilizada y adicionada luego del *Penicillium*.

Usamos un *Penicillium notatum* bien esporulado, verde, de 4 días, cultivado en agar-mosto a 24°C.

Por rotación de los frascos se dispersa el afrecho impregnado retenido en las paredes del frasco, se lleva a 24°C y se mide su actividad desde el 4º día.

Como se verá más adelante, conseguimos empleando estos medios semisólidos, pasar de 4 unidades que era el máximo valor obtenido en los medios líquidos a 20 unidades. Por el agregado de otras sustancias nos fué posible llegar a un valor aún mayor que sobrepasa las 40 U. Ox. por cm^3 .

En Inglaterra, de acuerdo al trabajo publicado en el *Lancet* (*loc. cit.*), se comenzó la preparación industrial de la penicilina con medios que no proporcionaban más de 4 U. Ox. Naturalmente se conocía su purificación y la forma de eliminarle las impurezas pirogénicas.

El medio de pH 6 constituido por NO_3Na 0,6 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,1 g, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, vestigios de SO_4Zn , lactosa 4 g, afrecho 80 g y agua de maceración de 19°Bé diluída al $\frac{1}{4}$ con agua nos dió en un primer ensayo al 5º día 20 U. Ox. Este valor permanece constante y la penicilina cruda así obtenida se mantiene después de filtrada y centrifugada.

Para preparar la penicilina cruda se siguió el siguiente procedimiento: al medio de cultivo de cada frasco le agregamos 360 cm^3 de agua destilada estéril y después de agitarlo en el agitador mecánico por espacio de una hora, lo filtramos por Buchner, sin papel (para separar el afrecho) y luego lo centrifugamos obteniendo un líquido amarillo transparente que se guarda en cámara frigorífica a -4°C (congelado).

En esta forma el valor originario se mantiene más de 20 días. Al descongelar lentamente la masa, las primeras porciones líquidas contienen un valor mayor en penicilina, pudiendo ser éste un método de concentración previo a la purificación.

Las unidades obtenidas se calculan siempre con respecto al volumen originario que en nuestros ensayos fueron de 200 cm^3 .

De 7 frascos obtuvimos 3.000 cm^3 de líquido centrifugado con 8 U. Ox. por cm^3 que corresponden a un rendimiento de 24.000 U. Ox.

Con agua de maceración sola (sin afrecho) que contenía 1 ‰ de POH_2K , a los 15 días se obtuvieron 2 U. Ox. El pH se mantuvo a 7,2. En cambio con el medio anterior semisólido que sólo difiere por contener afrecho, se obtiene un valor 10 veces mayor al 5º día. A continuación realizamos ensayos utilizando los siguientes medios:

Medio I. NO_3Na 0,6 gr.
 SO_4Mg 7 H_2O 0,05 gr.
 Cl_2Zn 0,001 gr.
 Cl_2Mn 0,001 gr.
 Agua de maceración diluída con agua 1/4, 200 cm^3 (pH 5,5-6,0).
 Mezcla Buffer
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 5 cm^3 M/7,5
 PO_4HNa_2 , 5 cm^3 M/7,5
 Lactosa 4 gr.

Medio II. Igual al medio I pero con el agregado de 2 gr. de lactosa.

Medio III. Igual al medio I con 0,2 cm^3 de solución mejorador II y 0,2 cm^3 solución mejorador III.

Medio IV. Igual al medio III pero con el agregado de 4 gr. de glucosa. La solución de mejorador II contenía en 100 cm^3 :

B-alanina 0,115 gr.
 Ac. nicotínico 0,115 gr.
 Ac. pimélico 0,0075 gr.
 SO_4Mg 7 H_2O 22,5 gr.
 SO_4Cu 5 H_2O 5 cm^3 sol. 1 %.
 SO_4Zn 7 H_2O 4 cm^3 sol. 4 %.
 Cl_2Mn 4 H_2O 1,5 cm^3 sol. 1 %.
 HCl concentrado 3 cm^3 .

La solución de mejorador N° III contenía en 100 cm^3 :

l-Cistina 20 gr.
 HCl concentrado 20 cm^3 .

Sólo nos dió resultado satisfactorio el medio III (con mejoradores y lactosa) con un rendimiento de 18 U. Ox., al 5º día de incubación. El medio IV, con glucosa, dió un valor muy inferior y lo mismo pasó con los medios I y II. Se nota ya en este experimento la influencia benéfica de los mejoradores.

Interesados en conocer la influencia que pudiera tener la lactosa y el mosto de malta, estudiamos la producción de penicilina en los medios que a continuación describimos:

Medio a) Agua de maceración, 200 cm^3 0,2 gr. de PO_4HNa_2 , 80 gr. de afrecho y llevado a pH 5,5-6,0.

Medio b) Igual al anterior pero con 4 gr. de lactosa.

Medio c) Agua de maceración 100 cm^3 , mosto de malta 100 cm^3 , con 0,2 gr. de PO_4HNa_2 y 4 gr. de lactosa.

Medio d) Igual al medio c), sin lactosa.

Los resultados de este experimento fueron los siguientes:

17 U. Ox. para los medios *a*) y *b*), es decir que en estos medios con agua de maceración la lactosa influye poco. El medio *c*) con agua de maceración y mosto de malta da también 17 U. Ox., pero el medio *d*) que no contiene lactosa da menor valor. Además, hicimos una serie de ensayos con el objeto de poder comprobar la influencia de la edad del *Penicillium notatum* sobre su poder de generar penicilina. Empleamos cepas de 5 y de 10 días de siembra en agar-mosto a 24°C. No se notó ninguna diferencia en los resultados.

Como tenía tanta importancia el agua de maceración, ensayamos diferentes diluciones de la misma.

1) 200 cm³ agua de maceración con 1 ‰ de PO₄HK₂ a pH 5,5-6,0 y 80 g afrecho.

2) 100 cm³ agua de maceración + 100 cm³ de agua destilada con 1 ‰ de PO₄HK₂, afrecho 80 g (pH 5,5-6,0).

3) Un volumen de agua de maceración y 2 volúmenes de agua destilada (en total 200 cm³) con 1 ‰ de PO₄HK₂ y 80 g de afrecho (pH 5,5-6,0).

4) Un volumen de agua de maceración y 3 volúmenes de agua (200 cm³ en total) con 1 ‰ de PO₄HK₂ y 80 g de afrecho (pH 5,5-6,0).

El medio 1) con agua de maceración sin diluir no dió valor y sólo 4 U. Ox. con el medio 2). En la dilución al 1/3 dió 8 U. Ox. (medio 3) y pasa a 17 U. Ox. con el agua de maceración diluida al 1/4 (medio 4).

Como el resultado obtenido hasta este momento no nos permitía pasar las 20 U. Ox., pensamos que sería conveniente agregarle algunas sustancias provenientes de una proteína hidrolizada y elegimos para este objeto la caseína.

El procedimiento que utilizamos para hidrolizar la caseína es el que describimos a continuación en líneas generales y que se emplea en la rutina para la preparación del medio para la toxina diftérica. A 500 g de caseína se le agregan 3 litros de HCl 9 normal, y se calienta a reflujo por espacio de 18 horas. Se destila luego el HCl, y se le agrega 1 litro de agua caliente (80-90°), y lleva a pH 5,5 y se decolora con carbón animal. Finalmente se completa a 4 litros.

Con este hidrolizado de caseína iniciamos la siguiente experiencia:

5) Agua de maceración diluida al 1/4 (óptimo encontrado por nosotros) con 80 g de afrecho y 0,1 g de PO₄HK₂, 0,05 g de SO₄Mg.7 H₂O, vestigio de SO₄Zn, lactosa 4 g, 0,2 cm³ del mejorador II, 0,2 cm³ del mejorador III y por último 5 cm³ de hidrolizado de caseína.

6) Igual al anterior pero con 10 cm³ del hidrolizado de caseína.

7) Igual al primero pero con 20 cm³ del hidrolizado.

8) A 50 cm³ del agua de maceración diluída al 1/4 con sales del experimento 5) se le agregan 450 cm³ de agua — se toman 200 cm³ y se le agregan 10 cm³ del hidrolizado de caseína y el afrecho para hacer el medio semisólido.

Con sorpresa notamos al 5º día de incubación que el valor obtenido en el medio 5) era de 45 *U. Oxford* (calculado sobre los 200 cm³ originales).

Con el medio 6), que contenía 10 cm³ de hidrolizado, el valor disminuye, pero se encuentran 30 *U. Ox.* Con 20 cm³ de hidrolizado de caseína sólo obtuvimos 20 *U. Ox.*, y menos de 10 *U. Ox.* en el medio 8) que es un medio muy pobre en sales y agua de maceración.

El óptimo, por lo tanto, de hidrolizado de caseína es de 5 cm³ por cada 200 cm³ del medio.

Con el objeto de comprobar si este valor se repetía, hicimos una serie de ensayos con varios frascos y obtuvimos un promedio de 40 *U. Ox.* repitiendo exactamente el experimento 5).

Salta a la vista la influencia notable del hidrolizado de caseína en la elevación del rendimiento en penicilina. Pasando el óptimo que son 5 cm³ por cada 200 cm³ del medio líquido tiene una acción inhibitoria, como se demostró por los experimentos anteriores. Ya con este valor interesante iniciamos la segunda parte de este trabajo que consiste en purificar la penicilina cruda, usando técnicas someramente descritas y que permiten obtener una penicilina libre de sustancias pirogénicas. Obtuvimos ya la penicilina Ba con pérdida de 50 % y creemos que afinando el procedimiento de extracción será posible una recuperación mayor.

Para terminar, hicimos una serie de experiencias sugeridas por el Prof. Negroni, en los que modificamos el pH del agua de maceración, que fué llevada a pH 7,0-7,2. Conseguimos así, mejorar el rendimiento en penicilina llegando a 52 *U. Ox. por cm³*. Los otros constituyentes del medio eran exactamente iguales al de la última experiencia.

Si el medio anterior lo diluímos con agua destilada (una parte del medio y una parte de agua) quedando el agua de maceración diluída al 1/8, se obtiene un valor a pH 7, de 42 unidades.

CONCLUSIONES

1. — Usando medios líquidos sólo obtuvimos rendimientos bajos en penicilina, no pasando de 2-4 unidades Oxford.

2. — Sembrando en medios semisólidos, constituídos fundamentalmente por agua de maceración de maíz, afrecho y sales, se obtienen 20 unidades Oxford.

3. — Agregando una fuente nitrogenada constituida por un hidrolizado de caseína duplicamos el valor anterior, consiguiendo 40 U. Ox. por cm^3 .

4. — Si modificamos el pH del medio anterior, haciéndolo pasar de pH 5,5-6,0 a pH 7,0-7,2 se obtienen sistemáticamente un rendimiento de 50 unidades Oxford.

BIBLIOGRAFÍA

1. FLEMING, A. — *Brit. Journ. Exp. Path.* **10**, 226, 1929.
2. ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E.; FLETCHER; FLOREY; GARDNER; HEATLEY, y JENNINGS. — *Lancet* **2**, 177 y 762, 1941.
- ROBERTS, CAIN, MUIR, REITHEL, GABY, VAN BRUGGEN, HOMAN, KATZMAN, JONES y DOISY. — *Journal Biol. Chem.* **147**, 47, 1943.
3. ABRAHAM, CHAIN y HOLIDAY. — *Brit. Journ. Exp. Path.* **23**, pág. 103, 1942.
- ABRAHAM, E. P. — *Nature* **48**, 758, Dic. 1941.
- COOK, A. H. — *Biochem.* **36**, 23, 1942.
4. ABRAHAM, CHAIN y HOLIDAY. — *Brit. Journ. Exp. Path.* **23**, 103, 1942.
- CHAIN, E. P. — *Nature* **148**, 758, 1941.
5. ABRAHAM, E. P.; CHAIN; FLETCHER; FLOREY; GARDNER; HEATLEY, y JENNINGS. — *Lancet*, **2**, 177, 1941.
6. SORDELLI, A.; FERRARI, J.; GWIRTZMANN; MODERN, F.; RUFF, G., y REPETTO, O. — *Rev. Inst. Bact.* **XII**, 83, 1943.
7. TAYLOR, H. G. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **52**, 299, 1943.
- COCHOLATY, W. — *Jour. Bact.* **44**, 469, 1942.
- CHALLINOR, S. W. — *Nature* **150**, 688, 1942.
- CHAIN, FLOREY, GARDNER, HEATLEY, JENNINGS, EWING y SANDERS. — *Lancet*, **II**, 226, 1940.
- RAO, S. S., y DE, S. P. — *Current Science*, **12**, 209, 1943.
8. CLUTTERBUCK, P. W.; LOWELL, R., y RAISTRICK, H. — *Biochem*, **26**, 1907, 1932.