

17. E. BRANDL, A. CARILLI e E. B. CHAIN. — Terreni colturali semplici per produzione di penicillina. (*)

Riassunto. — Titoli di penicillina di 2.000 u/ml ed anche maggiori sono stati ottenuti in una serie di terreni colturali sintetici, contenenti differenti miscele di amminoacidi e anche un singolo amminoacido, l'arginina.

Il terreno sintetico di JARVIS e JOHNSON contenente ammonio acetato e ammonio lattato, lattosio e sali inorganici ha dato alti titoli di penicillina dopo una leggera modifica, consistente nell'aumento della concentrazione di zuccheri e nell'aggiunta di carbonato di calcio.

Summary. — Penicillin titers of 2000 units/ml and above have been obtained in a number of synthetic culture media containing different mixtures of amino-acids and even one single amino acid, arginine.

The synthetic culture medium of JARVIS and JOHNSON containing ammonium acetate and ammonium lactate, lactose and inorganic salts, also gave high penicillin titers after a slight modification, consisting in raising the sugar concentration and adding calcium carbonate.

Allo scopo di studiare il meccanismo della biosintesi della penicillina è stato ritenuto interessante sviluppare un terreno colturale di semplice composizione, capace tuttavia di dare alti titoli di penicillina. Questi terreni sono descritti nel presente lavoro.

MATERIALI E METODI

CEPPO.

Per tutte le esperienze è stato utilizzato un ceppo alto produttore di *P. chrysogenum* Thom, selezionato in questo Istituto (51.20 C).

PREPARAZIONE DEL SEED.

Spore del ceppo 51.20 C, conservate in sabbia, sono trasferite mensilmente su agar slants e incubate a 25°C. Dopo 5 giorni, quando la sporificazione risulta completa, viene preparata una sospensione in acqua

(*) Questo lavoro, è già stato pubblicato nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 495 (1959).

di queste spore fresche, che serve per inoculare un lotto di beute Erlenmeyer da 300 ml, contenenti g 25 di orzo perlato, umettato con 5 ml della soluzione sporulante di WHIFFEN e SAVAGE ⁽³⁾. Le beute sono incubate a 25°C per 5 giorni, cioè fino a completa sporificazione; quindi sono conservate a +5°C e usate per un periodo non superiore ad un mese.

Il terreno seed (60 ml) contenuto in beute Erlenmeyer da 500 ml è inoculato con una sospensione di spore preparata dalla coltura in orzo, addizionando acqua sterile in modo tale da ottenere una densità finale di circa 100.000 conidi per ml. di terreno colturale.

Le beute sono poste su agitatore rotatorio (220 giri per minuto ed eccentrico di 5 cm) ⁽¹⁾ alla temperatura di 25°C, generalmente per 48 h, ma in qualche caso per tempi minori o maggiori, specificati nelle tabelle appropriate.

CONDIZIONI DI LAVORO IN CULTURA SOMMERSA.

a) *Beute agitate.*

Le esperienze con beute agitate sono state condotte in beute Erlenmeyer, contenenti 60 ml di terreno colturale, poste su agitatore rotatorio nelle condizioni descritte più sopra. In queste condizioni il tasso di diffusione dell'ossigeno, determinato polarograficamente [CHAIN e GUALANDI ⁽²⁾] e col metodo al solfito [COOPER, FERNSTROM e MILLER ⁽³⁾] è di circa 60 ml per 100 ml di liquido colturale per ora. Temperatura 25°C; al momento dell'incubazione, e successivamente ogni 24 h, si aggiunge in ciascuna beuta 0,6 ml di una soluzione acquosa al 10% di acido fenilacetico, neutralizzata con idrato sodico a pH 7.

b) *Fermentatori.*

Sono stati impiegati fermentatori da laboratorio di 10 l ⁽⁴⁾. L'aereazione viene realizzata mediante sistema a vortice. Le condizioni standard di agitazione sono: elica del diametro di 90 mm rotante a 750 giri al minuto, pressione 1 atm. In queste condizioni il tasso di diffusione dell'ossigeno è di circa 200 ml di O₂ per 100 ml di terreno per ora. Ciascun fermentatore contiene 5 l di terreno colturale della composizione indicata nel testo.

Tutte le fermentazioni sono condotte a 25°C di temperatura. Ogni 24 ore vengono aggiunti a ciascun fermentatore 5 ml di olio di arachidi contenente 6% di Alkaterge C, come antischiumogeno e 50 ml di una soluzione acquosa al 10% di acido fenilacetico neutralizzato con idrato sodico a pH 7, come precursore.

FARINA DI ARACHIDI ESTRATTA.

I semi di arachidi sono macinati e la farina spremuta a 500 atm. di pressione in pressa idraulica per asportare la maggior parte dell'olio; il residuo viene poi estratto fino ad esaurimento con trielina in estrattore Soxhlet.

PROTEINA DI ARACHIDI.

La farina di arachidi esausta dell'olio è omogeneizzata con idrato sodico 0,1 N per 5 minuti (1 Kg di farina è trattata con 250 ml di NaOH 0,1 N) a temperatura ambiente, centrifugata e il residuo estratto ancora due volte con NaOH 0,1 N nelle stesse condizioni.

La soluzione sopranatante è portata a pH 4,5 con acido cloridrico 2N; la proteina precipitata viene centrifugata dopo quindici minuti, lavata nella centrifuga una volta con acqua e tre volte con acetone, quindi essiccata.

Allo scopo di confermare la composizione in amminoacidi riportata in letteratura [ARTHUR (⁵)] la proteina è stata idrolizzata e l'idrolisato analizzato per via cromatografica. Una quantità di 2 g di proteina è riscaldata a refluxo per 24 ore in 500 ml di acido cloridrico 5 N, quindi la soluzione viene concentrata sotto vuoto fino alla densità di sciroppo, addizionata di 250 ml di acqua, e nuovamente concentrata. L'operazione è ripetuta e dopo aggiunta di alcool la soluzione viene evaporata fino a secco. La determinazione dell'azoto totale prima e dopo idrolisi ha rivelato che questo era diminuito da 260 mg (corrispondente ad un contenuto azotato della proteina di arachidi pari a 13,2%) a 254 mg. L'idrolisato è stato cromatografato, confermando la presenza di tutti gli amminoacidi riportati in letteratura, ad eccezione di cistina, metionina, istidina e triptofano che presumibilmente sono stati distrutti durante l'idrolisi. La composizione in amminoacidi della proteina di arachidi, in accordo con quanto riportato in letteratura, è data nella tabella 1.

PRODOTTI CHIMICI.

Gli amminoacidi, l'acido acetico, l'acido lattico e i sali inorganici impiegati sono prodotti puri per analisi. Il lattato e l'acetato di ammonio sono preparati dagli acidi corrispondenti per neutralizzazione con ammoniaca. Gli zuccheri sono anch'essi prodotti puri per analisi.

Composizione in amminoacidi della proteina di arachidi
[secondo Arthur J. C., *Advances in Protein Chemistry* 8, 393, (1953)].

Amminoacido	Per cento
Alanina	4,1
Arginina	13,5
Acido aspartico	5,3
Cistina	1,1
Acido glutammico	16,7
Glicina	1,8
Istidina	1,9
Isoleucina	—
Leucina	3,9
Lisina	5,0
Metionina	0,5
Fenilalanina	2,6
Prolina	1,4
Serina	5,2
Treonina	2,6
Triptofano	0,9
Tirosina	5,5
Valina	4,1

METODI ANALITICI.

a) *Cromatografia su carta.*

L'utilizzazione degli amminoacidi durante la fermentazione è seguita a mezzo di analisi cromatografica su carta. La soluzione da analizzare viene posata in quantità di 20 µl su carta Whatman n. 1 con siringa micrometrica « Agla » e asciugata in corrente di aria calda in maniera che il diametro della macchia rimanga inferiore ad 1 cm. Gli amminoaci-

di sono separati per mezzo di cromatografia bidimensionale con i seguenti solventi:

— Solvente I : alcool butilico secondario, acido formico, acqua
(75 : 15,5 : 14,5);

— Solvente II : fenolo e soluzione acquosa al 28% di ammoniaca
(86 : 20 : 4).

Ciascuna cromatografia è tenuta in vasca per 12 ore e la carta viene asciugata in corrente di aria calda dopo ciascuno sviluppo. La posizione degli amminoacidi è messa in evidenza spruzzando la carta con soluzione alcoolica di ninidrina al 0,25% e quindi riscaldando a 100°C per 5 minuti. Cromatogrammi di riferimento vengono eseguiti con soluzioni $\frac{M}{100}$ di amminoacidi noti.

La separazione è risultata soddisfacente, ad eccezione delle coppie istidina-lisina, valina-metionina e leucina-isoleucina, che non è stato possibile separare completamente. L'eliminazione dei sali, secondo il metodo di CONSDEN, GORDON e MARTIN ⁽⁶⁾, modificato secondo ASTRUP, STAGE e OLSEN ⁽⁷⁾ non ha apportato alcun apprezzabile miglioramento, dal momento che il terreno colturale aveva in ogni caso un basso contenuto salino; è stato invece essenziale usare solventi molto puri.

b) *pH*.

Il pH è determinato potenziometricamente.

c) *Penicillina*.

Il titolo della penicillina presente nei brodi colturali è determinato biologicamente, usando il *B. subtilis* come organismo test, secondo il metodo di HUMPHREY e LIGHTBOWN ⁽⁸⁾. In qualche caso sono eseguite determinazioni chimiche, secondo il metodo di BELOFF-CHAIN e DENTICE di ACCADIA ⁽⁹⁾.

d) *Azoto*.

La determinazione dell'azoto totale è fatta col metodo KJELDAHL, seguendo il metodo di MARKHAM ⁽¹⁰⁾ per la distillazione e la titolazione dell'ammoniaca.

PARTE SPERIMENTALE

Punto di partenza per questo lavoro sono state le esperienze condotte in collaborazione con S. J. PIRT, in cui era messo in evidenza che titoli di penicillina superiore a 1000 u/ml potevano essere ottenuti in piccoli fermentatori contenenti terreni a base di idrolisato di caseina. Queste esperienze sono proseguite con altre fonti proteiche, tra le quali la farina di arachidi che, sia contenente l'olio sia esausta, è risultata indifferentemente capace di dare bassi titoli di penicillina, tra 400-700 u/ml. Tuttavia, l'aggiunta di 0,1% di sodio solfato al terreno colturale ha permesso di ottenere alti titoli di penicillina, da 1700 a 2500 u/ml (tabella 2). Nella farina di arachidi, pertanto, il contenuto in zolfo è il fattore limitante per la produzione di penicillina, cosa che non sorprende stante il suo basso contenuto in amminoacidi solforati.

TABELLA 2

Produzione di penicillina — in U/ML — da farina di arachidi, in presenza o assenza di solfato inorganico.

(Andamento tipico di esperienze condotte in fermentatori da laboratorio da 10 lt, con farina di arachidi esausta).

Fermentatore n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Età (h)								
47	1059	822	453	773	286	223	326	262
71	1858	1492	1083	1557	557	346	462	349
95	2063	1843	1540	2029	667	380	564	431
119	2290	2233	2047	2731	548	386	506	501
Composizione del terreno di coltura								
Fermentatori 1-4								
	3	per cento	lattosio					
	2	»	»	farina di arachidi esausta				
	1	»	»	calcio carbonato				
	0,1	»	»	sodio solfato				
Fermentatori 5-8								
	3	per cento	lattosio					
	2	»	»	farina di arachidi esausta				
	1	»	»	calcio carbonato				
				niente sodio solfato				

Risultati analoghi sono stati ottenuti con proteina di arachidi (tabella 3).

TABELLA 3

Produzione di penicillina — in U/ML. — da proteina di arachidi in presenza o assenza di solfato inorganico.

Fermentatore n°	1	2	3	4
Età (h)				
37	436	616	—	267
61	1603	1564	402	432
85	2519	2564	432	442
109	2451	2408	470	422

Composizione del terreno colturale

Fermentatori 1 e 2

1,5	per cento	proteina di arachidi
6	»	» lattosio
1	»	» CaCO_3
0,1	»	» sodio solfato

Fermentatori 3 e 4

stessa composizione, ma senza l'aggiunta di sodio solfato

Per ottenere produzioni più alte è necessario aggiungere il sodio solfato subito all'inizio della fermentazione o al più tardi dopo 22 ore; quando l'aggiunta è eseguita dopo 46 ore si ottengono produzioni molto più basse (Tabella 4). La presenza nel terreno colturale di una quantità sufficiente di solfato inorganico durante la fase di attiva crescita miceliale è pertanto sembrata essenziale per la produzione di penicillina.

TABELLA 4

Effetto sulla produzione di penicillina del momento di aggiunta del sodio solfato nel terreno colturale a base di proteina di arachidi (U/ML).

Fermentatore n°	1	2	3	4	5	6
Tempo di aggiunta del solfato (h)	0	0	22	22	46	46
h						
46	950	810	615	745	396	365
70	1540	250	975	1130	690	560
94	2095	1590	1602	1740	890	855
118	2530	1970	2025	1995	655	820

Composizione del terreno colturale:

3 per cento lattosio
 1,5 » » proteina di arachidi
 1 » » CaCO_3

Si è allora cercato di sostituire la proteina di arachidi con una miscela di amminoacidi simile a quella presente nella proteina stessa. La miscela di amminoacidi I usata per queste esperienze ha la composizione riportata nella leggenda della Tab. 5. Le produzioni di penicillina ottenute con

TABELLA 5

Comparazione tra le produzioni di penicillina (U/ML) ottenute in beute agitate con terreno a base di proteina di arachidi e terreno a base di miscela di amminoacidi riproducente la composizione della proteina di arachidi.

Proteina di arachidi				Miscela di amminoacidi I		
beuta n°	1	2	3	4	5	6
h						
42	720	569	910	1000	485	555
66	1410	1380	1870	1987	1150	1245
90	1900	1800	2530	2940	1745	1900
114	—	1840	2420	3000	1765	2260

Composizione del terreno di coltura:

Beute 1 e 2: 1,5 per cento proteina di arachidi
6 » » lattosio
1 » » calcio carbonato
0,1 » » sodio solfato

Beute 3 e 4: 1,5 per cento proteina di arachidi
6 » » lattosio
1 » » calcio carbonato

Beute 5 e 6: miscela di amminoacidi I come specificato più sotto
6 per cento lattosio
1 » » calcio carbonato

Composizione della miscela di amminoacidi I contenuta nelle beute 5 e 6:

(g per l)

dl — Alanina 0,94
l — Arginina 1,43
l — Acido aspartico 1,82
l — Acido glutammico 2,82
— Glicina 0,42
l — Istidina 0,34
dl — Isoleucina 1,72
dl — Metionina 2
l — Leucina 0,9
l — Lisina 0,24
l — Fenilalanina 0,72
l — Prolina 0,78
l — Tirosina 0,59
dl — Treonina 0,68
dl — Serina 2,62
dl — Valina 1,02

Arginina, istidina e lisina sono state usate in forma cloridrato. In qualche caso sono state impiegate le forme l invece delle forme dl, aggiungendo quindi la metà della quantità rispettiva.

la miscela di amminoacidi sono risultate simili a quelle ottenute nel terreno a base di proteina di arachidi addizionato di solfato, e leggermente inferiori a quelle ottenute in terreno a base di proteina di arachidi addizionato di metionina.

Si è ritenuto interessante seguire la velocità di utilizzazione degli amminoacidi durante la fermentazione, a mezzo di cromatografia qualitativa su carta (Tabella 6).

Il primo amminoacido ad essere utilizzato è la prolina, che scompare quasi completamente dal liquido colturale dopo 24 ore di incubazione. Seguono arginina, istidina, lisina, fenilalanina, treonina e tirosina. Gli amminoacidi utilizzati più lentamente sono: acido glutammico, acido aspartico, glicina, leucina, isoleucina, serina, valina e metionina.

Sulla base di questi risultati sono stati studiati gli effetti della semplificazione della miscela di amminoacidi sulla produzione di penicillina. Pertanto sono state preparate altre sei miscele contenenti un numero decrescente di amminoacidi, da 15 a 4:

Miscela II (15 amminoacidi):

Composizione: come miscela I, senza prolina.

Miscela III (12 amminoacidi):

Composizione: come miscela I, senza isoleucina, leucina, lisina e valina.

Miscela IV (8 amminoacidi):

Composizione: arginina, istidina, lisina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina e metionina, alla concentrazione riportata in tab. 5.

Miscela V (6 amminoacidi):

Composizione: arginina, lisina, fenilalanina, treonina, tirosina e metionina, alla concentrazione riportata in tabella 5.

Miscela VI (5 amminoacidi):

Composizione: arginina, lisina, fenilalanina, tirosina e metionina, alla concentrazione riportata in tabella 5.

Miscela VII (4 amminoacidi):

Composizione: lisina, fenilalanina, tirosina e metionina, alla concentrazione riportata in tabella 5.

A queste miscele di amminoacidi è stato aggiunto 6% di lattosio e 1% di CaCO_3 .

La utilizzazione degli amminoacidi nelle diverse miscele da parte del micelio normale è stata seguita per cromatografia su carta. Questa ha rivelato, come si prevedeva, che gli amminoacidi scompaiono tanto più rapidamente quanto minore è il loro numero nella miscela, mentre la progressione nella utilizzazione dei diversi amminoacidi è risultata la stessa in tutte le miscele. In tutte le miscele di amminoacidi contenenti prolina, per esempio, tanto nella miscela I contenente 16 amminoacidi, quanto nelle miscele III e IV, questo amminoacido è stato utilizzato per primo. Degli altri amminoacidi, arginina, istidina e lisina sono stati metabolizzati più rapidamente; seguono quindi fenilalanina e tirosina, mentre la metionina è stata utilizzata in modo relativamente più lento anche nella miscela contenente il più basso numero di amminoacidi.

Le produzioni di penicillina ottenute in queste miscele sono riportate nella tabella 7, dove si rileva che le produzioni ottenute con la miscela II, contenente quindici amminoacidi, non sono state significativamente diverse da quelle ottenute nella IV, in cui il numero degli amminoacidi era diminuito ad otto.

TABELLA 7

Traduzioni di penicillina in U/ML con terreni contenenti differenti miscele di amminoacidi.

Miscela h	II (15 ammino- acidi)		III (12 ammino- acidi)		IV (8 ammino- acidi)		V (6 ammino- acidi)		VI (5 ammino- acidi)		VII (4 ammino- acidi)	
48	391	541	724	773	799	784	789	760	674	784	424	469
72	709	1109	1516	1525	1424	1496	1117	1323	1265	1493	689	910
96	1000	1370	1511	1823	2178	1863	1460	1545	1345	1409	648	678
120	1132	1585	1126	1379	1856	1867	1514	1588	1382	1438	617	694

Con ulteriore diminuzione del numero di amminoacidi presenti nel terreno si è notata una graduale diminuizione nei titoli di penicillina prodotta, fenomeno ancora più pronunciato nella miscela VII, contenente solo quattro amminoacidi.

In queste esperienze le concentrazioni degli amminoacidi sono state mantenute allo stesso livello in cui essi sono presenti nella miscela I, contenente il numero maggiore; pertanto l'azoto totale del liquido colturale risulta diminuire insieme col numero degli amminoacidi presenti nel mezzo (tabella 8).

TABELLA 8

Azoto totale contenuto nelle miscele di amminoacidi.

Miscela	Numero di amminoacidi	Azoto totale g/l
I	16	2,43
II	15	2,31
III	12	2,14
IV	8	1,13
V	6	0,94
VI	5	0,86
VII	4	0,40

Tuttavia, come risulterà evidente dalle ulteriori esperienze, la deficienza di azoto non è l'unico fattore da prendere in considerazione per l'interpretazione delle basse produzioni ottenute nelle miscele V e VII.

Poichè l'arginina si è rivelata uno degli amminoacidi metabolizzati più rapidamente, nella miscela VI è stato studiato l'effetto della sua sostituzione con istidina e acido glutammico. I risultati di queste prove sono riportate nella tabella 9.

TABELLA 9

Effetto sulla produzione di penicillina (U/ML) della sostituzione dell'arginina con istidina e acido glutammico nella miscela VI.

h	Miscela VI		Miscela VI — arginina + istidina		Miscela VI — arginina + acido glutammico	
48	852		549		378	
72	1371	1408	904	866	731	718
96	1477	1488	1001	1024	907	871
120	1695	1726	1253	1322	1033	1031

Le produzioni più alte sono state ottenute con arginina; l'istidina ha dato risultati inferiori e l'acido glutammico ancora più bassi. Poichè il contenuto azotato era circa lo stesso nelle tre miscele, l'esperienza ha mostrato che la natura dell'amminoacido presente nel mezzo ha una sua influenza sulla produzione di penicillina.

Sulla base della facilità di utilizzazione dell'arginina e degli alti titoli di penicillina ottenuti in sua presenza, si è provato ad usare l'arginina come principale o unica fonte di azoto per la produzione di peni-

cillina. Sono stati pertanto preparati quattro terreni con la composizione seguente:

		conc. g/l	Azoto totale g/l
Terreno I	arginina	1,43	0,47
	metionina	2,0	0,18
			<u>0,650</u>
Terreno II	arginina	2,86	0,93
	metionina	2,0	0,18
			<u>1,11</u>
Terreno III	arginina	1,43	0,47
	sodio solfato	1	
Terreno IV	arginina	2,86	0,93
	sodio solfato	1	

Tutti i terreni contenevano in aggiunta 6% di lattosio e 1% di CaCO_3 . Le produzioni di penicillina ottenute in questi terreni sono riportate nella tabella 10.

TABELLA 10

Produzione di penicillina in U/ML con terreno a base di arginina-metionina e arginina-sodio solfato.

h	Terreno I arginina- metionina	Terreno II arginina-metionina		Terreno III arginina-solfato		Terreno IV arginina-solfato	
48	2028	1138	837	577	555	1140	1082
72	1399	1728	1803	831	803	1615	1584
96	1926	2286	2350	1071	1088	1940	1987
120	2001	2328	2510	2037	1125	2603	2317

Risulta evidente che sono stati ottenuti alti titoli di penicillina anche in terreni semplici, raggiungendo valori di oltre 1000 u/ml nel terreno III a contenuto azotato più basso (0,47 g/l).

L'attenzione è stata quindi rivolta alla possibilità di utilizzare altri amminoacidi come unica fonte di azoto per la produzione di penicillina:

a questo scopo è stata scelta una concentrazione tale da apportare un contenuto azotato di g 0,94 per litro (calcolato per la forma otticamente attiva), cioè un valore che aveva dato ottimi risultati nelle esperienze precedenti. Usando amminoacidi racemici la concentrazione veniva raddoppiata.

I risultati sono riportati nella tabella 11; la produzione di penicillina è stata migliore nel terreno con arginina. Tuttavia, buoni titoli di oltre 1000 u/ml sono stati ottenuti con alanina, citrullina, glicina, leucina, ornitina, prolina e tirosina. Valori intermedi, da circa 500 a 900 unità, sono stati dati da istidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano e valina. Valori bassi hanno dato acido

TABELLA 11

Produzione di penicillina (U/ML) in terreni contenenti singoli amminoacidi e urea come unica fonte di azoto.

h	Alanina	Arg.	Asp.	Citrul.	Cisteina	Glut.	Glicina	Istid.	Isoleu.	Leucina	Lisina
48	410	719	265	541	0	158	468	275	116	325	112
	415	622	215	520	0	177	455	250	113	392	118
72	853	1249	293	861	16	297	902	504	264	689	319
	832	1264	247	814	22	305	968	477	269	887	283
96	1074	1537	387	1074	238	393	1182	561	384	1066	556
	1098	1397	273	1229	239	352	1104	550	431	1237	471
120	1234	1740	421	1014	120	323	1200	530	489	1229	558
	1172	1567	316	1033	88	391	1234	517	538	1307	517

h	Metionina	Ornit.	Fenilalanina	Prolina	Serina	Treonina	Triptofano	Tirosina	Valina	Urea
48	402	666	520	398	338	371	214	546	193	708
	441	605	513	306	245	378	317	528	151	652
72	699	918	628	701	599	498	782	878	272	1257
	791	886	608	682	502	564	599	949	285	1200
96	1026	999	656	935	842	708	988	1148	420	1331
	994	1153	803	887	678	836	931	1205	452	1347
130	813	1153	754	1119	890	743	714	1218	529	1418
	824	1228	744	1031	787	890	858	1186	556	1396

In aggiunta agli amminoacidi il terreno colturale contiene: 6% lattosio e 0,1% sodio solfato

aspartico e acido glutammico, che erano già risultati poco metabolizzati in tutte le miscele di amminoacidi; la cisteina non ha praticamente prodotto penicillina.

Per quanto riguarda la crescita miceliale si può affermare che tutti gli amminoacidi saggiati hanno permesso uno sviluppo buono, eccetto la cisteina. Il contenuto azotato del micelio è risultato circa 5,5%, con un peso secco di 1-2 g per cento. Nella tavola 12 è messa in evidenza la utilizzazione dell'azoto: le cifre riguardanti l'azoto totale contenuto nel brodo di fermentazione danno tuttavia un'idea parziale del tasso di utilizzazione. Nell'interpretazione di tali valori, infatti, si deve considerare che piccole quantità di azoto sono trasferite con l'inoculo vegetativo, e altro ancora viene liberato dal micelio nel corso della fermentazione per autolisi delle ife, particolarmente durante la fase finale.

La utilizzazione dell'arginina è stata particolarmente rapida: il valore dell'azoto totale, nel terreno colturale contenente questo amminoacido in concentrazione normale, ha raggiunto il suo valore più basso già

TABELLA 12

Azoto totale (MG.%) in terreni colturali contenenti amminoacidi e urea come unica fonte di azoto.

h	dl-alanina	l-argin. concent. normale	l-argin. HCl doppia conc.	l-asp.	dl-citrull.	l-cist. HCl	l-glut.	glicina	l-ist. HCl	dl-isol.	l-lisina HCl
0	207	60	104	108	180	88	108	115	100	183	64
24	165	16	62	80	155	7	78	78	66	166	66
48	123	—	22	56	127	68	64	40	49	142	39
120	113	25	29	50	95	25	42	40	45	130	21

h	dl-metionina	l-ornit. HCl	l-fenilalanina	l-prolina	dl-serina	dl-treonina	l-trip-tofano	dl-valina	urea
0	180	110	100	103	196	187	98	181	93
24	163	68	67	53	160	150	50	152	57
48	145	25	42	28	132	122	22,5	123	22,5
120	113	25	25	20	115	110	15	113	15

Produzione di penicillina nel terreno sintetico di Jarvis e Johnson
e in una modificazione di questo.

h	I		II		III	
48	307	294	470		693	648
72	648	601	874	75	1320	1282
96	640	637	1236	570	1780	1714
120	499	477	1312	839	1889	1889

Composizione dei terreni colturali:

I. Terreno sintetico di Jarvis e Johnson, composizione normale:

Ammonio acetato 0,3%
Ammonio lattato 0,5%
Lattosio 2,25%
Glucosio 0,75%

Miscela di sali (KH_2PO_4 0,3%; MgSO_4 (7 H_2O) 0,25%;

FeSO_4 (7 H_2O) 0,01%; CuSO_4 (5 H_2O) 0,0005%;

ZnSO_4 (7 H_2O) 0,002%; Na_2SO_4 0,05%;

MnSO_4 (4 H_2O) 0,002%; CaCl_2 (2 H_2O) 0,005%.

pH aggiustato prima dell'inoculo a 7 con NaOH_2N .

II. Terreno sintetico di Jarvis e Johnson, composizione modificata:

ammonio acetato, ammonio lattato e sali inorganici come in I

Lattosio 4%

Glucosio 2%

III. Terreno sintetico di Jarvis e Johnson, composizione modificata:

ammonio acetato, ammonio lattato e sali inorganici come in I

Lattosio 4%

Glucosio 2%

CaCO_3 1%

dopo 24 ore, mentre lo stesso fenomeno si è riscontrato dopo 48 ore nel mezzo colturale contenente due volte la normale concentrazione di arginina.

Per quanto riguarda i valori della utilizzazione dell'azoto nel caso degli amminoacidi in forma racemica, è evidente che solo una delle due forme otticamente attive viene utilizzata.

Di particolare interesse sono i risultati riportati nella ultima colonna della tavola 11 che riguarda l'impiego dell'urea come unica fonte di azoto, con produzione di penicillina di circa 1400 u/ml. E' sembrato infine interessante confrontare questo terreno sintetico molto semplice con quello di JARVIS e JOHNSON ⁽¹¹⁾, consistente in una miscela di sali di ammonio, di acetato, lattato, lattosio e glucosio. Come è rilevabile dalla tavola 13 in questo terreno le produzioni di penicillina sono state considerevolmente più basse di quelle ottenute nei terreni a base di amminoacidi; tuttavia tali produzioni possono essere incrementate aumentando la concentrazione totale degli zuccheri a 6 per cento (4 per cento di lattosio e 2 per cento di glucosio) e ancora di più aggiungendo 1 per cento di carbonato di calcio.

La tabella 13 rappresenta una esperienza tipica, di cui sono state effettuate numerose repliche con risultati identici.

La utilizzazione dell'azoto, nel terreno così modificato, è stata rapida; dopo 24 ore il contenuto in azoto totale era sceso da 115 mg per cento a 25 mg per cento, rimanendo poi praticamente costante fino al termine della fermentazione.

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

BIBLIOGRAFIA

- ⁽¹⁾ PALADINO S. - Rend. Ist. sup. Sanità (Edizione inglese) 17: 145 (1954).
- ⁽²⁾ CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Studi sull'aereazione II. Rend. Ist. sup. Sanità (Edizione inglese) 17: 5 (1954).
- ⁽³⁾ COOPER C. M., FERNSTROM G. A. e MILLER S. A. - Ind. eng. Chem., 36: 504 (1944).
- ⁽⁴⁾ CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOC D. S. e Van DER SLUIS J. - Rend. Ist. sup. Sanità (Edizione inglese) 17: 61 (1954).
- ⁽⁵⁾ ARTHUR J. C., Jr. - Advances in Protein Chemistry VIII, p. 393 (1953).
- ⁽⁶⁾ CONSDEN R., GORDON A. H. e MARTIN J. P. - Biochem. J., 41: 590 (1947).
- ⁽⁷⁾ ASTRUP T., STAGE A. e OLSEN E. - Acta chem. Scand., 5: 1343 (1951).
- ⁽⁸⁾ HUMPHREY J. H. e LIGHTBOWN J. W. - Gen. Microbiol., 7: 129 (1952).
- ⁽⁹⁾ BELOFF-CHAIN A. e DENTICE DI ACCADIA F. - Analyst, 77: 423 (1952).
- ⁽¹⁰⁾ MARKHAM R. - Bioch. J., 36: 790 (1942).
- ⁽¹¹⁾ JARVIS F. G. e JOHNSON M. J. - Am. chem. Soc., 69: 3010 (1947).