

18. E. BRANDL, A. CARILLI e E. B. CHAIN. — Produzione di penicillina con micelio lavato di *Penicillium chrysogenum*, in terreni di sostituzione chimicamente definiti. (*)

Riassunto. — 1) E' studiata la produzione di penicillina in beute agitate contenenti terreni di sostituzione, composti come segue: 1. Corn steep-lattosio, 2. terreno sintetico di Jarvis e Johnson leggermente modificato, costituito da ammonio acetato, ammonio lattato, lattosio, glucosio e sali inorganici, 3. arginina-lattosio-solfato, 4. lattosio-solfato. 5. lattosio, 6. soluzione di solfato di sodio. A tutti i terreni di sostituzione, sono aggiunti carbonato di calcio e una soluzione di sodio fenilacetato.

Il micelio è prodotto da spore in terreno a base di corn steep in 48 ore, filtrato o centrifugato — in qualche caso lavato — e risospeso in una quantità di terreno di sostituzione pari a quella in cui il micelio si è sviluppato nel primo stadio. Al momento del trasferimento il micelio raggiunge il suo massimo sviluppo, corrispondente al 2 per cento in peso secco. Nel terreno di sostituzione si produce una ulteriore crescita, che tuttavia è sempre scarsa.

2) La penicillina è prodotta rapidamente nel terreno a base di corn steep-lattosio, in quello di Jarvis e Johnson e nel terreno arginina-lattosio-solfato, raggiungendo titoli finali di 1.500-2.000 unità/ml.

3) Titoli superiori a 1.000 unità sono stati ottenuti nel terreno di sostituzione contenente solo lattosio e nessuna fonte di azoto. D'altro canto, la omissione del carboidrato fonte di energia dal terreno arginina-lattosio-solfato ha provocato la completa cessazione della produzione di penicillina e l'autolisi del micelio. La presenza di solfato inorganico non è risultata essenziale, per la produzione di penicillina, in un terreno di sostituzione contenente lattosio come unico costituente. In queste condizioni, cioè in un terreno di sostituzione dove non è possibile la crescita, la biosintesi della molecola di penicillina avviene da precursori intracellulari preformati nel micelio trasferito.

D'altra parte, nel terreno di sostituzione a base di arginina che permette la crescita, non vi è produzione di penicillina in assenza di una fonte esterna di solfato inorganico; la piccola quantità di zolfo utilizzabile dal micelio è usata in preferenza per la crescita piuttosto che per la produzione di penicillina.

(*) Questo lavoro, è già stato pubblicato nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 242 (1959).

4) Il lavaggio del micelio del primo stadio non ha avuto effetti significativi sulla velocità di produzione di penicillina e sui titoli finali ottenuti nei terreni di sostituzione: corn steep-lattosio e terreno sintetico di Jarvis e Johnson. Per contro, nel terreno di sostituzione a base di lattosio, il lavaggio del micelio ha ridotto della metà e più sia la velocità di produzione che i titoli finali.

Summary. — 1) Penicillin production in shake flasks was studied in replacement media of different composition, as follows: 1) Corn steep-lactose, 2) the synthetic medium of Jarvis and Johnson slightly modified, consisting of ammonium acetate and lactate, lactose and glucose and inorganic salts, 3) arginine-lactose sulphate, 4) lactose-sulphate, 5) lactose, 6) a solution of sodium sulphate. To all replacement media calcium carbonate and a solution of sodium phenylacetate were added.

The mycelium was developed from spores in a corn steep medium for 48 h, filtered or centrifuged, in some cases washed, and resuspended in the same amount of replacement medium in which it had been grown in the seed medium. At the transfer stage the mycelium had reached its maximal dry weight of about 2 per cent. Further growth in the replacement medium occurred but was always restricted.

2) Penicillin production took place at a rapid rate in the corn steep lactose medium, the synthetic medium of Jarvis and Johnson, and the arginine lactose sulphate medium and final titers of 1500-2000 units/ml were reached.

3) Titters of over a thousand units were reached in the replacement medium containing only lactose, but no nitrogen source. On the other hand, omission of the carbohydrate energy source from the arginine-lactose-sulphate medium led to complete cessation of penicillin production and autolysis of the mycelium. The presence of inorganic sulphate was not essential for penicillin production in a replacement medium containing lactose as sole constituent. Under these conditions, i.e. on a replacement medium which does not support growth, the biosynthesis of the penicillin molecule occurs from intracellular precursors preformed in the seed mycelium.

On the other hand, on the growth supporting arginine replacement medium, no penicillin production takes place in the absence of an external sulphur source, such as inorganic sulphate; the small amount of sulphur available from the mycelium is used for growth in preference to penicillin production.

4) Washing the seed mycelium had no significant effect on the rate of penicillin production and the final titers reached both in the corn steep-lactose replacement medium and the synthetic medium of Jarvis and Johnson. In contradistinction, in the arginine-lactose-sulphate and the lactose replacement media washing reduced both rate and final titers by one half and more.

Per le ricerche con radioisotopi sulla biosintesi della penicillina — di cui si riferirà in una prossima comunicazione — si è reso necessario studiare come procede la produzione di questo antibiotico quando una coltura già ben sviluppata è trasferita interamente in un terreno di sostituzione chimicamente definito.

Il presente lavoro riguarda i risultati ottenuti in questa ricerca.

MATERIALI E METODI

CEPPO E PREPARAZIONE DEL MICELIO DI PRIMO STADIO.

Il ceppo di *Penicillium chrysogenum* Thom 5120 C alto produttore e i metodi per la preparazione dell'inoculo vegetativo sono gli stessi riportati nella precedente comunicazione (2).

METODI ANALITICI.

I metodi per la determinazione biologica e chimica della penicillina, e per l'analisi dell'azoto, sono gli stessi già descritti nel precedente lavoro (2). Il lattosio è determinato con il metodo di Somogyi.

PRODOTTI CHIMICI.

Gli amminoacidi, l'acido acetico, l'acido lattico e i sali inorganici sono prodotti puri per analisi. L'ammonio acetato e lattato sono preparati dagli acidi per neutralizzazione con ammoniaca. Anche gli zuccheri sono prodotti puri per analisi.

TERRENI COLTURALI.

Terreno per la crescita del micelio di primo stadio: per tutte le esperienze, eccetto una, il terreno ha la composizione seguente:

corn steep	3% (residuo solido)
lattosio	3%
CaCO ₃	1%

Per una esperienza viene impiegato un terreno contenente destrina come fonte di carbonio, della composizione seguente:

corn steep	4% (residuo solido)
destrina	6%
CaCO ₃	1%

Il pH di questi terreni è portato a 5,4 con NaOH 2N.

DELLA

TERRENI DI SOSTITUZIONE.

Terreno sintetico (I).

Terreno sintetico di Jarvis e Johnson, modificato come nel lavoro precedente [BRANDL, CARILLI e CHAIN (2)].

ammonio acetato	0,3%
ammonio lattato	0,5%
lattosio	4%
glucosio	2%
CaCO ₃	1%

Contenuto in sali: KH₂PO₄ 0,3%; Mg SO₄ (7 H₂O) 0,025%; Fe SO₄ (7 H₂O) 0,01%; Cu SO₄ (5 H₂O) 0,0005%; Zn SO₄ (7 H₂O) 0,002%; Na₂SO₄ 0,05%; Mn SO₄ (4 H₂O) 0,002%; CaCl₂ (2 H₂O) 0,005%.

Prima dell'inoculo il pH è portato a 7 con NaOH 2N.

Terreno a base di arginina (II).

Arginina cloridrato	0,35%
lattosio	6%
sodio solfato	0,1%
calcio carbonato	1%

Prima dell'inoculo il pH è portato a 7 con NaOH 2N.

Per i terreni sintetici lo zucchero e il calcio carbonato sono sterilizzati a parte.

Terreno a base di corn steep-lattosio (III):

corn steep	3% (residuo solido)
lattosio	6%
calcio carbonato	1%

Prima dell'inoculo il pH è portato a 7 con NaOH 2 N.

FERMENTAZIONI.

Le fermentazioni sono condotte in beute agitate da 500 ml, contenenti 60 ml di terreno di sostituzione, poste su agitatore rotatorio nelle condizioni già descritte nel lavoro precedente ⁽²⁾. Il micelio del primo stadio, una volta raggiunta l'età voluta, viene filtrato e lavato sterilmente con la tecnica descritta più avanti. A ciascuna beuta si aggiunge 0,6 ml di una soluzione acquosa al 10% di acido fenilacetico neutralizzato con Na OH a pH 7, all'atto dell'incubazione e successivamente a intervalli di 24 ore durante il corso della fermentazione.

TECNICA DI LAVAGGIO STERILE.

Per trasferire sterilmente il micelio del primo stadio — filtrato e lavato — nel terreno di sostituzione, si opera nel modo seguente: l'intero contenuto di una coltura in beuta è trasferito e filtrato per aspirazione in un filtro Seitz sterile, della capacità di 60 ml, in cui il setto filtrante di asbesto è stato sostituito da una rete metallica di acciaio a maglie di 80 μ . Il pannello miceliale viene risospeso in 60 ml di acqua distillata sterile (non sono state osservate differenze nel comportamento successivo del micelio lavato con acqua di fonte o soluzione fisiologica) e subito filtrato per aspirazione. Questa operazione di lavaggio in qualche caso è stata ripetuta due o tre volte. L'intera manipolazione viene effettuata in non più di cinque minuti. Il pannello di micelio viene infine trasferito nella beuta contenente il terreno di sostituzione, a mezzo di una spatola sterile.

PARTE SPERIMENTALE

La tabella 1 mostra che, tra micelio lavato e non lavato, non ci sono differenze nel tasso di produzione di penicillina e nei titoli finali rag-

TABELLA 1

Ore di fermentazione	Produzioni di penicillina (unità/ml) in terreno di sostituzione a base di corn steep-lattosio			
	micelio lavato		micelio non lavato	
44	1076	1036	1247	1138
68	1624	1549	1586	1438
92	1466	1663	1606	1538

Il micelio del primo stadio è cresciuto per 48 ore in terreno a base di corn steep-lattosio, quindi trasferito in terreno fresco a base di corn steep-lattosio.

giunti, quando il micelio cresciuto in terreno a base di corn steep-lattosio viene trasferito in un terreno di sostituzione della stessa composizione.

Con le esperienze riportate nella tabella 2 è messo in evidenza l'effetto del lavaggio del micelio, cresciuto in terreno corn steep-lattosio, sulla produzione di penicillina dopo il trasferimento in differenti terreni di sostituzione.

Non si sono avuti effetti sensibili a causa del lavaggio, quando il micelio è trasferito nel terreno sintetico di Jarvis e Johnson modificato (vedi la comunicazione precedente) o, a conferma delle esperienze riportate nella tabella 1, nel terreno a base di corn steep-lattosio, cioè lo stesso terreno in cui il micelio è cresciuto in primo stadio. Il trasferimento di micelio lavato nel terreno a base di arginina, invece, ha dato come risultato titoli di penicillina sensibilmente inferiori a quelli ottenuti con micelio non lavato.

La ripetizione del procedimento di lavaggio del micelio, trasferito poi nel terreno di sostituzione a base di arginina, non ha avuto ulteriore effetto (tabella 6).

Anche l'età del micelio di primo stadio non ha influenzato significativamente le produzioni di penicillina (tabella 7).

La omissione della principale fonte di carbonio (il lattosio) dal terreno di sostituzione a base di arginina ha dato come risultato l'abolizione praticamente totale della produzione di penicillina. In queste condizioni il pH del terreno colturale ha raggiunto rapidamente valori superiori a 8,5.

Peraltro, in un terreno di sostituzione contenente solo lattosio e solfato inorganico (terreno IV) e nessuna fonte di azoto, la produzione di penicillina ha progredito con velocità moderata; in queste condizioni sono stati raggiunti titoli superiori a 1000 unità/ml. Inoltre, nello stesso terreno di sostituzione, la produzione di penicillina è risultata considerevolmente ridotta, a circa la metà, quando il micelio di primo stadio era lavato: l'effetto del lavaggio è stato quindi simile a quanto osservato nel terreno di sostituzione a base di arginina (terreno II).

La omissione del solfato inorganico nel terreno di sostituzione IV con micelio non lavato ha dato all'inizio della fermentazione una leggera differenza nella velocità di produzione della penicillina, ma questa si è fermata ad uno stadio meno avanzato, e ha raggiunto titoli finali molto più bassi. Il micelio lavato invece ha raggiunto titoli finali quasi uguali a quelli ottenuti con micelio non lavato in assenza di solfato e non è risultata differenza significativa nella velocità di produzione tra i terreni contenenti solfato e quelli in cui il solfato è stato omissso.

Come si poteva prevedere, stando ai risultati ottenuti con il terre-

TABELLA 2

Produzione di penicillina (unità/ml) da micelio di 40 ore di età in differenti terreni di sostituzione (I stadio in terreno con steep-lattosio).

Terreni di sostituzione	I terreno sintetico		II terreno con arginina		IIa = II senza lattosio.	III terreno con corn steep		
	lavato	non lavato	lavato	non lavato		lavato	non lavato	
44	344	301	475	475	50	875	644	515
68	898	692	992	1078	—	1820	1587	1460
92	1264	1172	1600	1372	—	1563	1898	1957
116	1432	1283	1526	1545	—			

[illegible]

Composizione dei terreni culturali:

I, II e III come riportato nel paragr. « terreni di sostituzione »	IV, lattosio 6% sodio solfato 0,1% calcio carbonato 1%	V, calcio carbonato 1% sodio solfato 0,1%
--	--	--

no II a base di arginina senza lattosio, sospendendo il micelio di primo stadio in acqua, senza alcuna fonte sia di azoto che di carbonio, non si è avuta produzione di penicillina (eccetto che per le prime 20 ore); il micelio, inoltre, si è autolisato completamente dopo 48 ore dal trasferimento. La poca penicillina prodotta inizialmente è dovuta al fatto che in questa esperienza il micelio del primo stadio non è stato lavato, quindi piccole quantità del terreno colturale sono state trasferite nel terreno di sostituzione insieme al micelio.

Nel terreno a base di arginina, d'altra parte, la presenza del solfato è risultata essenziale per la produzione di penicillina, probabilmente a causa della crescita miceliale a spese di questa fonte azotata. I risultati di questa esperienza sono riportati nella tabella 3.

TABELLA 3

Produzione di penicillina (unità/ml) da micelio lavato di 40 ore in terreno di sostituzione a base di arginina (primo stadio in terreno corn steep-lattosio).

h	Quantità di solfato aggiunto (‰)								
	0,1			0,025			0		
24	205,	150,	130	290,	165,	170	145,	145,	5
48	760,	855,	840	635,	680,	695	200,	220,	210
72	1270,	1380,	1120	1010,	815,	815	220,	220,	240

Il peso secco di micelio raccolto alla fine della fermentazione è lo stesso sia in presenza che in assenza di solfato. Sembrerebbe quindi che in assenza di solfato — ma con una fonte di carbonio utilizzabile per la crescita — le piccole quantità di zolfo di origine intracellulare, che si rendono disponibili per autolisi del micelio, siano utilizzate per la crescita e non per la produzione di penicillina.

Nel terreno di sostituzione a base di arginina si produce una leggera crescita in quanto il peso secco del micelio trasferito aumenta di circa il 50%. Ciò è messo in evidenza anche dai valori di utilizzazione del lattosio e dell'azoto in questo terreno di sostituzione (tabella 4).

Il consumo del lattosio e dell'azoto nel terreno di sostituzione a base di arginina è stato determinato per micelio cresciuto in due differenti terreni di primo stadio, uno contenente destrina, l'altro lattosio.

Produzione di penicillina e utilizzazione di lattosio e azoto nel terreno di sostituzione con arginina, da micelio di età diverse cresciuto in terreno di primo stadio a base di corn steep-lattosio e corn steep-destrina.

Terreno di I stadio Età del micelio h	Corn steep-lattosio			Corn steep-destrina		
	24	48	72	24	48	72
<i>Produzione di penicillina (unità/ml)</i>						
21	161	135	411	98	70	136
45	749	1028	924	352	475	513
69	1077	1275	1183	739	706	902
93	1272	1388	1235	924	1399	1061
<i>Concentrazione del lattosio nel terreno colturale (g %)</i>						
0	6	5,84	5,5	6	5,46	5,22
69	1,43	0,69	0,2	2,61	1,90	1,34
93	0,73	0,32	0,2	1,23	0,95	0,73
<i>Concentrazione dell'azoto nel terreno colturale (mg %)</i>						
0	85,77	87,7	81,2	84,5	85,2	83,2
24	59,08	27,02	26,04	83,44	54,05	43,1
45	16,86	16,38	16,86	48,58	39,9	20,86
93	22,1	26,88		23,52	31,64	27,86

L'utilizzazione del lattosio e dell'azoto da parte di micelio cresciuto in corn steep-lattosio è risultata molto simile a quella che si ha con la crescita di micelio derivante da inoculo del 10%; il micelio cresciuto in corn steep-destrina ha mostrato un metabolismo più lento sia per quanto riguarda la produzione di penicillina, che per il consumo dello zucchero e dell'azoto, probabilmente a causa dell'adattamento alla utilizzazione del lattosio dopo quella del glucosio. Come nelle esperienze precedenti l'età del micelio all'atto del trasferimento non ha influenzato apprezzabilmente la produzione di penicillina. Questa è risultata solo leggermente inferiore quando la quantità di micelio trasferito nel terreno di sostituzione a base di arginina è stata aumentata di 1,5 volte rispetto a quella normalmente trasferita, cioè quando le condizioni per la crescita sono state ancora meno favorevoli di quelle che si hanno con il trasferimento normale (tabella 5).

TABELLA 5

Effetto dell'aumento della concentrazione di micelio sulla produzione di penicillina nel terreno di sostituzione a base di arginina.

h	Concentrazione normale di micelio cresciuto per 40 ore		1,5 volte la concentrazione normale di micelio cresciuto per 40 ore	
24	282	346	179	346
48	95		700	
72	1381		1050	
96	1510	1329	1307	1339

TABELLA 6

Effetto della ripetizione del lavaggio sui titoli di penicillina ottenuti in terreno di sostituzione a base di arginina.

h	Lavaggio ripetuto una volta	Lavaggio ripetuto due volte	Lavaggio ripetuto tre volte
24	—	685	540
48	1320	1240	1475
72	1390	1100	900
96	1480	1200	1200

TABELLA 7

Effetto sulla produzione di penicillina dell'età del micelio all'atto del trasferimento in terreno di sostituzione a base di arginina.

h	Età del micelio all'atto del trasferimento: h	24	36	48	60	72	96
24		334	282	421	330	408	456
48		1061	952	1097	951	1011	933
72		1290	1381	1477	1431	1232	1139
96		1691	1510	1726	1554	1400	1426

DISCUSSIONE

ROLINSON ⁽⁴⁾, HALLIDAY e ARNSTEIN ⁽⁵⁾ hanno dimostrato che il micelio lavato di *P. chrysogenum* continua a produrre penicillina in un terreno di sostituzione a base di corn steep-lattosio, ad un tasso uguale a quello che si ottiene in terreno a base di corn steep-lattosio dopo crescita regolare di micelio trasferito al 10%. Questi ultimi autori hanno messo in evidenza che la produzione di penicillina continua per tre ore al massimo, ad un tasso praticamente non diminuito, quando il corn steep o il lattosio, o entrambi, vengono omessi dal terreno, ma ad un tasso molto ridotto quando viene omesso il precursore che forma la catena laterale della benzil penicillina (acido fenilacetico); quando poi vengono omessi sia il corn steep che l'acido fenilacetico, la produzione di penicillina subisce una interruzione quasi completa.

Dai risultati riportati in questo lavoro è evidente che il micelio lavato, cresciuto in terreno a base di corn steep-lattosio, continua a produrre penicillina per periodi di 4 o 5 giorni in diversi terreni di sostituzione, incluso il terreno semplice di BRANDL, CARILLI e CHAIN ⁽²⁾ a base di arginina-sodio solfato. La produzione di penicillina continua anche per quattro giorni in un terreno di sostituzione contenente come soli costituenti una fonte di carbonio, come il lattosio, e, naturalmente, il precursore della catena laterale della benzil penicillina (acido fenilacetico), ma senza fonte di azoto e zolfo. Tuttavia in queste condizioni, in cui la formazione della molecola di penicillina avviene interamente a spese dei precursori intracellulari, sia il tasso di produzione di penicillina che i titoli finali raggiunti risultano circa la metà, e anche meno, di quelli ottenuti in un terreno di sostituzione che sopporta la crescita miceliale. Infatti massimi tassi di produzione di penicillina e alti titoli sono mantenuti e raggiunti solo quando il terreno di sostituzione è capace di sopportare la crescita, anche se in scala ridotta. Sembrerebbe poi che una leggera crescita di micelio nuovo sia richiesta per mantenere il tasso di produzione di penicillina al massimo livello. Questa considerazione è importante per quanto riguarda i metodi di produzione continua di penicillina. In beute agitate l'aumento totale del peso secco del micelio, dopo il trasferimento nel terreno di sostituzione a base di arginina e dopo 4-5 giorni, è dell'ordine del 50%, cioè circa 10% al giorno. Questo incremento del peso secco, che naturalmente può corrispondere ad un tasso di crescita alquanto più alto tenendo conto dell'autolisi del vecchio micelio, è sufficiente a mantenere alte produzioni di penicillina.

Per quanto riguarda il metabolismo dello zolfo, mentre su un ter-

reno che non sopporta la crescita, contenente come unico costituente il lattosio, l'aggiunta di solfato inorganico esterno non influenza nè il tasso di produzione nè il titolo finale di penicillina raggiunto, nel terreno di sostituzione con arginina, che è capace di sopportare la crescita, in assenza di solfato inorganico si producono quantità di penicillina molto basse. Evidentemente, le piccole quantità di zolfo derivanti dall'autolisi dello stesso micelio sono usate in preferenza per la crescita anzichè per la produzione di penicillina.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SOMOGYI M. - J. biol. Chem., 193: 19 (1952).
 - (²) BRANDL E., CARILLI A. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 203 (1961).
 - (³) PALADINO S. - Rend. Ist. sup. Sanità (Edizione inglese) 17: 143 (1954).
 - (⁴) ROLINSON G. N. - J. gen. Microbiol., 11: 412 (1954).
 - (⁵) HALLIDAY W. J. e ARNSTEIN H. R. V. - Biochem. J., 64: 380 (1956).
-