

SÔBRE A FERMENTAÇÃO DE PENICILINA POR Penicillium chry-
so-enum THOM, COM PARTICULAR REFERÊNCIA AO EMPREGO DE
AÇÚCARES QUE NÃO A LACTOSE.

0

Alcides Serzedello
Engenheiro - Agrônomo
Assistente do Departamento de Química
do
Instituto Zimotécnico
Piracicaba

0

Tese de doutoramento
Apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo.
1 9 5 4

E R R A T A

Alves de Paula

Pag.	Linha	onde se lê	Leia-se
1	26	de lactose	de que lactose
1	27	alto teores	altos teores
1	32	<u>Penicillium chrysogenum,</u> <u>Thom</u>	<u>Penicillium chrysogenum</u> <u>Thom</u>
3	24	<u>Penicillium notatum,</u> <u>Westling</u>	<u>Penicillium notatum</u> <u>Westling.</u>
3	29	toxidade	toxicidade
4	4	<u>Penicillium notatum,</u> <u>Westling</u>	<u>Penicillium notatum</u> <u>Westling.</u>
6	18	tampõp	tampão
6	23	3,000	3.000
7	7	se tem	se tenha
10	penúltima	imediate	imediato
11	6	integralmente espectativa	integralmente à expectativa
11	7	agitações	agitação
15	1	tereminação	determinação
16	penúltima	<u>Penicillium chrysogenum,</u> <u>Wisc. Q-176</u>	<u>Penicillium chrysogenum</u> <u>Wisc. Q-176</u>
18	penúltima	toxidade	toxicidade
21	23	prepaço	preparo
22	25	e sacarose	a sacarose
24	2	destonou-se	dêstinou-se
25	8	logartmo	logarítmo
25	10	logarpitmico	logarítmico
25	31	fosfato do tampão	fosfato tampão
27	2	estavn	estavam
28	12	atrs	atrás
28	13	são mais	são as mais
28	15	materias	materiais
28	22	câma	câmara

A. Inzevalb

C O N T E Ú D O

	Pag.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ASPECTOS GERAIS DA FERMENTAÇÃO DE PENICILINA	
2.1. Histórico.....	3
2.2. Constituição química e estrutura das penicilinas.....	6
2.3. Seleção de estirpes de <u>Penicillium</u>	9
2.4. Substrato para a fermentação.....	11
2.5. Precusores.....	12
2.6. Condições gerais da fermentação.....	14
2.6.1. Aeração e agitação.....	14
2.6.2. pH.....	15
2.6.3. Utilização de açúcares.....	16
2.6.4. Temperatura.....	18
2.6.5. Agentes anti espumantes.....	18
2.6.6. Assepsia.....	19
2.7. Extração.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Estirpe usada.....	20
3.2. Meio para esporulação.....	21
3.3. Preparo do inóculo.....	21
3.4. Meios de fermentação.....	22
3.5. Amostragem.....	23
3.6. Ensaio de potência.....	24
3.7. Análises de açúcares e de nitrogênio micelial.....	26
3.8. Cromatografia.....	27
3.9. Avaliação da aeração.....	27
3.10. Controle das contaminações.....	28
3.11. Soluções de açúcares para alimentação lenta e precursor.....	28
4. EXPERIMENTOS E RESULTADOS	
4.1. Fermentação com lactose.....	29
4.2. Fermentação com glucose.....	29
4.3. Fermentação com sacarose.....	30
4.4. Fermentação com melaço.....	31
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	31
6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	33
7. BIBLIOGRAFIA.....	34
8. AGRADECIMENTO.....	37

INTRODUÇÃO

a. Augusto

Um exemplo do que podem conseguir os cientistas, quando trabalhando em equipe, com programas bem delineados e claramente definidos, evidencia-se dos resultados obtidos com a série de pesquisas decorrentes da descoberta da penicilina. Esse esforço permitiu a realização de um dos mais empolgantes feitos da indústria química moderna - a indústria de antibióticos.

Relativamente pequenos foram os progressos que tais pesquisas fizeram, na Inglaterra, na fase inicial, país onde a penicilina foi primeiro estudada. As condições do estado de guerra não eram favoráveis; enquanto que nos Estados Unidos da América, as previsões indicavam ótimo campo para a pesquisa e produção daquele antibiótico que tão maravilhosamente se comportava nos casos clínicos em que havia sido ensaiado.

E de fato tal se deu; em poucos anos, o "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), em Peoria, Illinois; laboratórios das universidades de Wisconsin, de Minnesota, Stanford, e outros, estavam conseguindo rendimentos quase cem vezes maiores que aqueles iniciais obtidos pelos pesquisadores de Oxford. E isso graças à seleção de estirpes mais apropriadas do fungo, ao emprego de substratos mais favoráveis à fermentação e ao melhoramento das próprias condições fermentativas.

Do ponto de vista zimotécnico, foi o emprego de substratos adequados, um dos marcos culminantes que possibilitaram a produção em alta escala do antibiótico. A descoberta de que corn steep water - água de maceração do milho - como fonte de nitrogênio, e de lactose, como fonte de carbono, constituíam um meio excelente para a produção de penicilina em mais alto teor, veio proporcionar conhecimentos exatos, embora empíricos, das melhores condições dessa fermentação.

Por razões dificilmente explicáveis, a produção de antibióticos, em geral, se dá em condições, não totalmente adequadas à produção micelial. O Penicillium chrysogenum, Thom utiliza muito lentamente a lactose, o que confere condições de semi-penúria alimentar a meios de cultura onde esse açúcar é a única fonte de carbono.

Nas mesmas condições, quando são empregados glucose, frutose, manose, dextrina, amido e outros carboidratos, como fontes de carbono, observa-se um extraordinário desenvolvimento micelial e medíocre produção de penicilina.

O Professor MARVIN J. JOHNSON, da Universidade de Wisconsin estabeleceu o princípio de que se a produção de penicilina dependesse realmente desse estado de semi-penúria alimentar proporcionado por uma limitada fonte de carbono, qualquer açúcar rapidamen-

te metabolizável que fosse adicionado ao meio em proporção idêntica à de lactose utilizável por unidade de tempo, deveria proporcionar, conseqüentemente, àquelas mesmas condições de semi-penúria, levando a uma produção de penicilina, pelo menos, idêntica a do meio com lactose. Esse princípio foi perfeitamente demonstrado pelos resultados obtidos pela equipe de Wisconsin.

* * *

A instalação da indústria de antibióticos em nosso país viria exigir quantidades apreciáveis de lactose que ultrapassariam nossa capacidade de produção da mesma, criando destarte um problema econômico de extrema importância.

Segundo dados obtidos no Centro das Indústrias do Estado de São Paulo (informação obtida por carta), a nossa atual produção de lactose é de 20 toneladas anualmente. E, pelas estatísticas do Ministério da Agricultura, ainda segundo o referido Centro das Indústrias, nossa importação desse produto em 1953, foi de 384 toneladas. A essa sub-produção deve acrescentar-se o fato de ser o preço de custo da nossa lactose, duas a três vezes superior ao do produto importado.

A importância dessa indústria, sua rápida expansão em nosso país e, conseqüentemente, o agravamento do problema do suprimento de lactose, levou-nos a considerá-lo seriamente e, baseados nos trabalhos de Wisconsin, investigar um possível substituto daquela fonte de carbono para o Penicillium chrysogenum. Obviamente, o mel final das usinas de açúcar seria o primeiro produto a se considerar.

Uma série de fermentações, em diferentes circunstâncias foram processadas, com aquela finalidade, nos Laboratórios do Instituto Zimotécnico, e os resultados são aqui discutidos.

No presente trabalho, damos inicialmente uma breve notícia sobre os aspectos gerais da fermentação de penicilina. Uma apresentação de material e métodos e descrição de experimentos precedem à discussão dos resultados e nossas conclusões.

Com a apresentação desse trabalho, visamos prestar uma modesta contribuição à nascente indústria de antibióticos em nosso país, tendo em mente um dos mais sérios problemas que ela encontra em nosso meio.

2. ASPECTOS GERAIS DA FERMENTAÇÃO DE PENICILINA.

2.1. HISTÓRICO

Há quase um século, os pesquisadores em Microbiologia vem se preocupando com a questão de antibiôse.

Com efeito, já antes de 1897, cita-se que GOSIO (In WAKSMAN, 1948) descobriu numa espécie do gênero Penicillium uma substância cristalina dotada de capacidade inibidora sobre Bacillus anthracis e, tal substância, hoje bem conhecida, é o ácido micofenólico.

Posteriormente, ainda no terreno do estudo de ações inibidoras de fungos, aparecem pesquisas de DUCHESNE e VAUDRENER, sendo este o primeiro a ensaiar aplicações clínicas de um produto fúngico (WAKSMAN, 1948), todavia sem resultados concludentes.

O próprio PASTEUR, já em 1877, (ainda citado in WAKSMAN, 1948) preconizava aplicações terapêuticas da ação de certos micróbios sobre bactérias do carbúnculo, sem que experimentos fossem executados nesse sentido.

Em 1899, EMMRICH e LOEW (CHAIN e FLOREY, 1944) fizeram interessantes aplicações da descoberta de BOUCHARD (1899) de que Pseudomonas pyocyanea é antagonista contra outras espécies de bactérias, o que se atribuiu à ação da "piocianase".

Infortunadamente, essas primeiras observações em substâncias de atividade antibiótica pouca repercussão tiveram, sendo logo olvidadas, até que o Professor ALEXANDER FLEMING, do Hospital de St. Mary, em Londres, publicou a descrição de uma nova substância antibacteriana (FLEMING, 1929), a que denominou P E N I C I L I N A, e produzida pelo fungo Penicillium notatum, Westling, que apareceu como contaminante de uma placa de Staphilococcus aureus, com que FLEMING trabalhava no momento.

Tal substância, pareceu ao seu descobridor, ser de utilidade em terapêutica, caso fosse possível sua produção em grande escala.

Com efeito, já de início, notou-se sua quase nula toxicidade e possuindo espectro de ação bacteriostática muito interessante, o que possibilitaria seu emprego no combate a certas infecções que afligem o gênero humano, e causadas por certas bactérias.

Todavia, a não ser experimentos esparsos (CLUTTERBUCK et al, 1932, REID, 1933, BORNSTEIN, 1940) apenas confirmativos dos resultados de FLEMING, nenhum progresso importante foi registrado, em relação à penicilina, até o ano de 1940 (RAPER, 1952).

A essa época, pesquisadores da Escola de Patologia William Dunn - Universidade de Oxford - começaram um estudo de substâncias antibacterianas provindas de microorganismos e se interessaram logo pelo Penicillium notatum, Westling, pela sua faculdade de produzir penicilina (CHAIN et al., 1940).

Não só métodos fermentativos, mas também aplicações terapêuticas começaram a ser ensaiados. E, já nesse tempo, os pesquisadores de Oxford haviam criado a técnica para o ensaio do antibiótico pelos cilindros em placas e deram uma definição para a unidade de penicilina (ABRAHAM et al., 1941). E os resultados clínicos que se iam obtendo eram os mais surpreendentes, resolvendo casos desesperadores.

E, desse modo, não demorou que a penicilina começasse a ser usada no combate às infecções contraídas pelas tropas nas linhas de frente.

Viu-se, então, a necessidade premente de aumentar sua produção em ritmo acelerado, e os ingleses compreenderam que a penicilina que FLEMING descobrira cerca de dez anos antes, era uma produto estratégico. O mundo científico acompanhava com tal interesse as pesquisas de Oxford, que a Fundação Rockefeller proporcionou ao Prof. FLOREY e a HEATLEY seu assistente, que empreendessem uma viagem à América, com o fito de desenvolverem pesquisas relacionadas com a penicilina e, desse modo, atraírem a atenção das indústrias farmacêuticas para uma droga que, idubitavelmente, iria ser reconhecida como um bem social.

O que se passou nos Estados Unidos da América, daí por diante, em questão de pesquisa, foi algo admirável. Primeiro, foi em Peoria, Illinois, no "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), onde o problema foi sistematicamente atacado.

Quanto à nutrição do fungo, chegou-se à conclusão, após uma série de experimentos, que o meio de cultura deveria conter, como constituintes básicos, lactose e água de maceração de milho (MOYER e COGHILL, 1946a e b). A divisão de Fermentação de Peoria, que já possuía certa experiência em fermentações de fungos, adotou para a penicilina, o processo de cultura submersa (processo iniciado por KLUYVER e PERQUIN em 1933) com muito promissores resultados (RAPER, 1952).

No concernente ao emprego de água de maceração de milho, notou-se ainda que em fermentações com tal substrato, sempre predominava a penicilina G - benzil-penicilina - o que constitui interesse sob o ponto de vista farmacológico.

Por outro lado executava-se a seleção de estirpes de Penicillium capacitadas a produzirem com mais eficiência; e uma produção de 175-200 unidades por mililitro foi alcançada com a cultura NRRL B-21, contrastando com a potência de 2 a 4 u/ml demonstrada pelo fungo original de FLEMING (RAPER, 1952).

Um programa de trabalho para o isolamento de organismos mais produtivos, seja do solo, seja de vegetais, de alimentos, etc. culminou com a descoberta de Penicillium chrysogenum Thom, designado NRRL 1951, de um melão embolorado em Peoria. Daí por diante, pela seleção natural, pelo uso de raios X, de luz ultravioleta e do gás mostarda, outras estirpes mais potentes foram obtidas, entre as quais a famosa e importante Wis. Q-176, cujos meios fermentativos atingiam então 900 u/ml. Foi daquela cultura isolada em Peoria, NRRL 1951, que se originaram todas as atuais culturas altamente produtivas nos laboratórios de pesquisas e passando daí para as indústrias (JOHNSON, 1952).

Pelo uso adequado dos fatores mutagênicos mais conhecidos, uma série de estirpes foram obtidas (STAUFER e BACKUS, 1953), sobretudo no Departamento de Botânica da Universidade de Wisconsin, na "Carnegie Institution", na Universidade de Minnesota e noutros centros de pesquisas nos Estados Unidos da América.

Concomitantemente ao andamento desse programa para incremento da produção de penicilina por via fermentativa, uma outra equipe de pesquisadores iniciou a trabalhar na elucidação da sua constituição química, como base para a futura síntese. Supunha-se, então, que a biosíntese não haveria de ser capaz de fornecer o antibiótico na quantidade requerida pelo consumo, que aumentava dia após dia.

Assim, na Inglaterra, a Corporação de Pesquisa Terapêutica criou um sub-Comitê de Penicilina, movimentando grande número de cientistas americanos e ingleses, todos trabalhando com o objetivo único de projetar mais luz sobre a natureza química de tal substância. Deve salientar-se aqui a cooperação eficiente de inúmeras firmas e laboratórios anglo-americanos, cujo interesse em tais pesquisas eram igual ou superior ao oficial.

Uma série de trabalhos importantes foram executados e eram então reunidos numa publicação oficial, de distribuição limitada e que recebeu o nome "P E N". Para conhecimento detalhado de todos os progressos na química da penicilina, é interessante consultar a publicação de CLARKE et al., 1949.)

Embora tenha sido altamente eficiente o trabalho da elucidação da química da penicilina, o objetivo central não foi ainda conseguido : a síntese total em bases econômicas. E, embora já se tenha anunciado sínteses em laboratórios. (DU VIGNEAUD *et al.*, 1946 e SHEERMAN, 1953), até o momento são as fermentações que fazem o suprimento do antibiótico, aliás com uma eficiência que delas não se esperava nos primeiros anos de pesquisas nesse campo.

Por esse motivo aumenta de importância os experimentos executados para melhoramento das fermentações. Esse aspecto do problema da penicilina foi e continua sendo amplamente investigado por PETERSON, JOHNSON e colaboradores na Universidade de Wisconsin (RAPER, 1952) e por outros em diferentes partes do mundo.

O sistema das primeiras fermentações feitas em Oxford, inicialmente em pratos, depois em frascos de cerâmica, foi se mostrando deficiente, até que a experiência indicou o melhor para laboratório : frascos de Erlenmeyer de 500 ml, ou balões de 30 litros, todos de vidro, submetidos à esterilização prévia, fechados com tampão de algodão. Daí, para as instalações piloto, com recipientes de aço inoxidável, com agitadores mecânicos, etc., os progressos foram mais ou menos rápidos, até o momento atual, em que a penicilina é produzida em fermentadores de capacidade variando em torno de 50 mil litros, na grande indústria de antibióticos, com rendimento até 3,000 unidades por mililitro.

2.2. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E EXTRUTURA DAS PENICILINAS.

Denominam-se naturais os tipos de penicilinas que se formam nas fermentações de alguns fungos dos gêneros Penicillium e Aspergillus, em meio sintético, quando ao substrato não é acrescentado precursor algum. Diferenciam-se apenas na constituição do radical R. Todas são compostos resultantes da condensação dos núcleos beta-lactâmico e tiazolidina, conforme a estrutura que se admite no presente. A atividade bacteriostática qualitativa é a mesma, sendo que, com a natureza do radical R, varia a potência de 900 a 2.300 unidades por miligrama do antibiótico em estado cristalizado.

Por outro lado, as penicilinas não naturais, ou novas penicilinas biosintéticas são aquelas que não são produzidas no metabolismo normal; formam-se nos meios de cultivo, quando induzimos o fungo a se utilizar de uma substância de natureza precursora, portanto de composição relacionada ao novo tipo de penicilina que desejamos obter. Até o momento, uma grande série de compostos já foram ensaiados com o objetivo de obtenção de novas penicilinas

biosintéticas (BEHRENS, 1949); e, embora tais pesquisas apresentem bons resultados práticos, pertence, ainda, ao grupo das penicilinas naturais, aquela de maior aplicação terapêutica - a penicilina G ou benzil penicilina - por suas propriedades farmacodinâmicas.

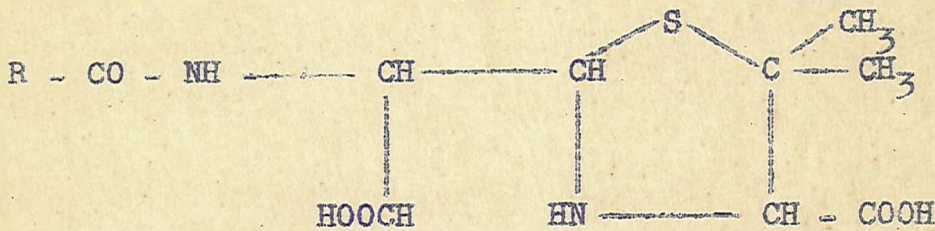
Todavia, por incrível que pareça, a natureza íntima da biosíntese das penicilinas, ainda é campo aberto à pesquisa (JOHNSON, 1952) embora alguma coisa já se tem feito nesse sentido (BEHRENS, 1949). O método para essas pesquisas consiste em acrescentar-se aos meios de cultivo os produtos de degradação da penicilina, analisando-se depois, a eficiência da incorporação de tais restos de molécula possíveis produtos metabólicos intermediários - considerados como precursores.

Desse modo, a degradação das penicilinas é importante artifício no esclarecimento da sua biosíntese; e, para ilustração, damos em seguida, um esquema dessa degradação, como é feita usualmente (MARAVALHAS, 1954) :-

Reações na pagina seguinte

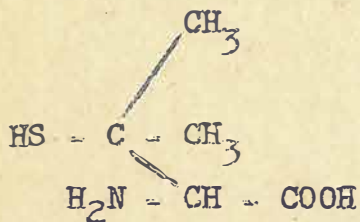


Ação da Penicilinase
ou
de álcali



Ác. Peniciloico

ácido
e
HgCl₂

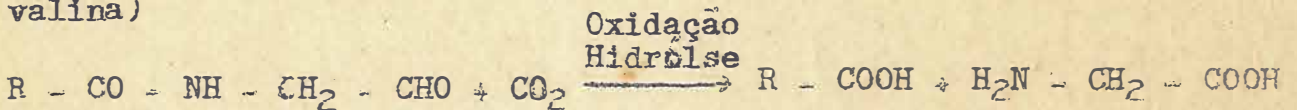


+



Penicilamina
(D-β-β-dimetil
cisteína ou D-tiol
valina)

Ác. Penáldico (aldeído N-ácil
serina)

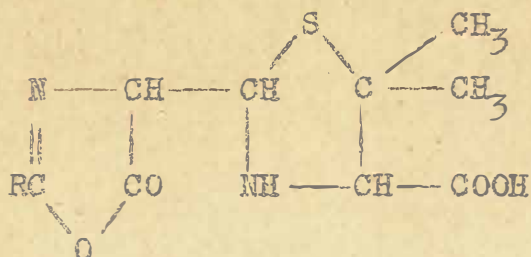


Penilo aldeído

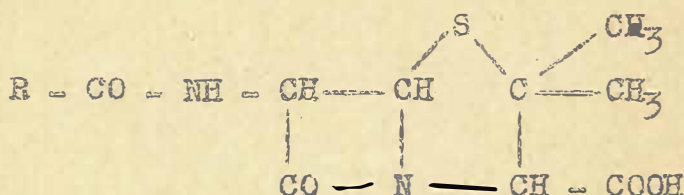
Glicina

DEGRADAÇÃO DAS PENICILINAS

Dezenas de químicos trabalhando na elucidação da constituição das penicilinas, admitiam até 1943, uma das estruturas seguintes para essas substâncias :-



FÓRMULA OXAZOLONA



FÓRMULA beta-lactâmica

E, no momento, a fórmula beta-lactâmica é a que melhor se coaduna com as propriedades das penicilinas. Tal estrutura, com dois nitrogênios em forma não básica, está perfeitamente de acordo com a verdadeira natureza desse grupo de substâncias: reação com álcalis para dar peniciloatos, reação com álcoois primários e aminas para dar alfa-ésteres ou alfa-amidas dos peniciloatos e isomerização dos ácidos penílicos (MARAVALHAS, 1954).

2.3. SELEÇÃO DE ESTIRPES DE PENICILLIUM

A cultura a ser usada numa fermentação deve ser o primeiro fator a nos preocupar, pois, em igualdade de condições fermentativas, organismos da mesma espécie podem apresentar comportamento muito diverso desde que sejam de raças diferentes.

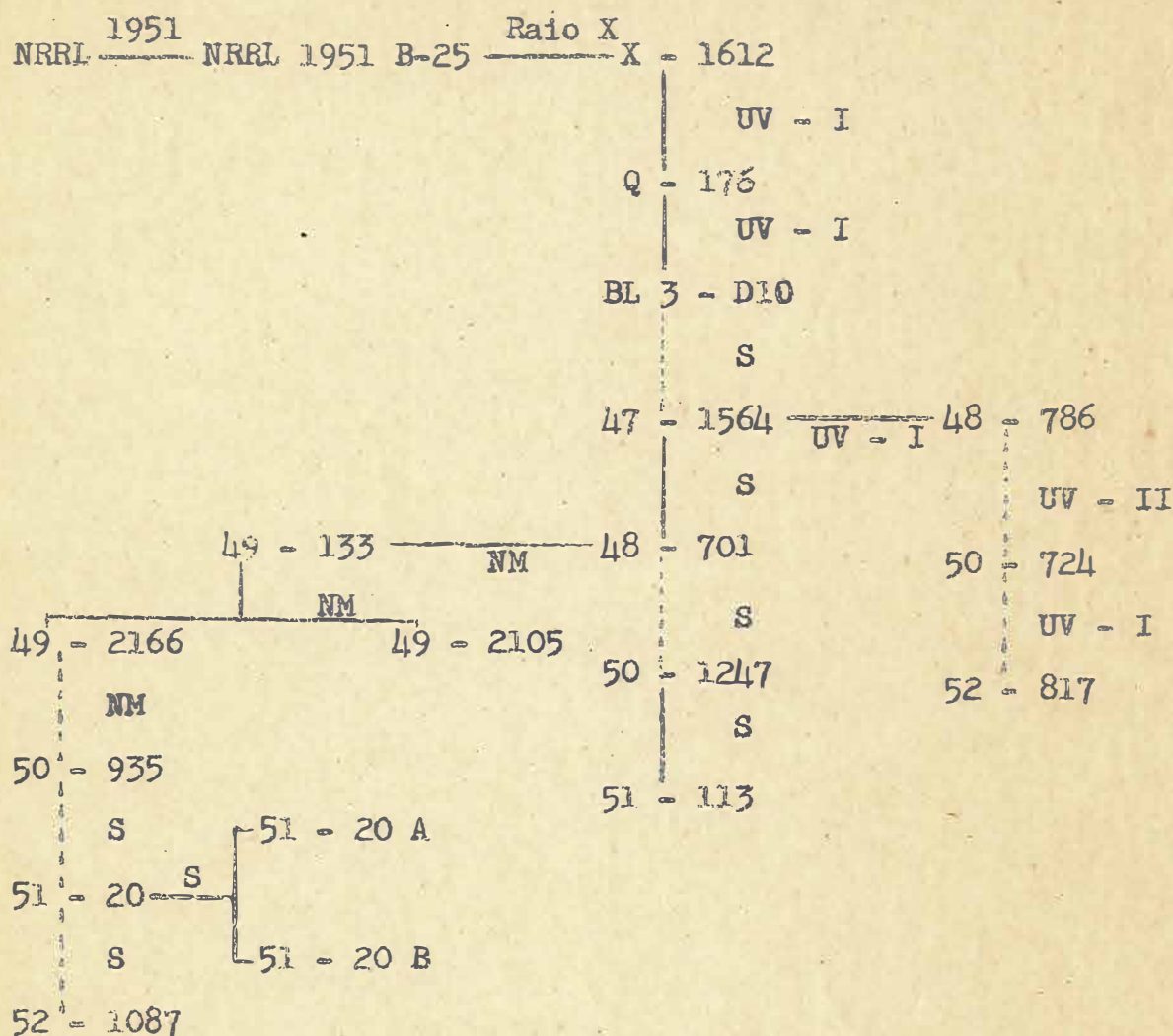
Reforça-se essa afirmação, citando a grande diferença de produção entre o Penicillium chrysogenum Thom, NRRL 1951 e o Penicillium chrysogenum Thom, Wisc, Q-176: a do primeiro 100 unidades por mililitro e a do segundo 900 unidades por mililitro. A estirpe Wisc. Q-176 proveio da NRRL 1951, por diversos processos mutagênicos. Em Peoria e em Wisconsin, para citar apenas dois centros de

Dr. Argyriello

pesquisas dos Estados Unidos da América, há departamentos executando interessantes programas de seleção de fungos. Para ilustrar reproduzimos em seguida, no quadro nº 1, a genealogia das principais estirpes obtidas nos Estados Unidos.

Como não poderia deixar de ser, em qualquer programa de seleção de culturas, após o isolamento das mesmas, os organismos colocados em idênticas condições fermentativas tem seu comportamento analisado com respeito à produção de penicilina, utilização de açúcares, incorporação dos precursores, percentagem de penicilina G formada, pigmentação, etc..

QUADRO Nº 1 : Esquema da genealogia das estirpes de Wisconsin.
(Adaptado de STAUFER e BACKUS, 1953)



ORIGEM DA DERIVAÇÃO DAS ESTIRPES :-

S - seleção sem tratamento;

NM - seleção seguindo tratamento com gás mostarda;

UV - seleção seguindo tratamento com luz ultra-violeta;

I - 2.750 Å

II - 2.534 - 37 Å

— - descendente imediata;

----- - duas ou mais gerações intermediárias.

Evidentemente, antes que tais culturas sejam fornecidas às indústrias devem passar por uma prova nos fermentadores piloto. Aí, as condições são mais ou menos idênticas àquelas encontradas nas instalações comerciais. Essa prova é indispensável, pois que algumas estirpes, embora muito produtivas nos frascos experimentais não correspondem integralmente à expectativa, quando transportadas para os fermentadores industriais, de aço inoxidável, com agitações mecânica e aeração (JOHNSON, 1952).

2.4. SUBSTRATO PARA A FERMENTAÇÃO

O primeiro meio de cultura para a obtenção de penicilina, usado por FLEMING (FLEMING, 1929) era um caldo comum usado em Bacteriologia; e, sobre sua composição não foram dados esclarecimentos, embora saibamos que encerrava peptona e proteína de carne. Alguns anos depois, na Inglaterra mesmo, descobriu-se que o Penicillium podia ser cultivado em meio sintético (CLUTTERBUCK et al., 1932).

Algumas pequenas modificações em meios sintéticos (FOSTER, WOODRUFF e MC DANIEL, 1943) apresentavam certo aumento na atividade penicilinógena, sobretudo quando se fornecia mais nitrogênio aos substratos. Verificou-se nesse particular a superioridade das fontes orgânicas ou naturais do fornecimento do nitrogênio requerido (MOYER e COGHILL, 1946 a e b).

Certos requisitos básicos devem ser considerados na seleção de matérias primas para substratos na fermentação de penicilina: necessidades alimentares do fungo, condições para a formação e acúmulo do antibiótico e sua posterior purificação e extração. Quanto à nutrição do fungo propriamente dita, devemos considerar principalmente: fontes de carbono, de nitrogênio e de sais minerais.

Sobre a fonte de carbono para a produção de penicilina, sabe-se que a lactose é o material preferido (MOYER e COGHILL, 1946 e STONE e FARREL, 1946) pois, sua utilização pelo Penicillium se faz de modo tal, que o fungo se mantém mal nutrido e produzindo o máximo de penicilina.

Quanto à razão desses fenômenos - utilização lenta da lactose e produção do antibiótico em condições adversas de nutrição - não encontramos ainda uma explicação plausível.

Outrossim, no momento, a lactose está sendo substituída por outros carboidratos. Sobre isso, daremos mais pormenores, nos capítulos seguintes.

A nutrição nitrogenada desempenha importante papel na fermentação, tanto que, desde as primeiras adições de água de milho ao meio de Czapek-Dox notou-se um aumento progressivo na produção de penicilina. A maior produção, nessas circunstâncias, foi realizada com 12,5 % de água de milho, em cinco dias de fermentação (MOYER e COGILL, 1946 a). Ficou patente a superioridade desse resíduo da industrialização do milho sobre as demais fontes de nitrogênio. Com a adição de água de milho, material nitrogenado de diversas naturezas e micro-nutrientes são incorporados, proporcionando nutrição satisfatória nesse particular.

MEIO SINTÉTICO



Um substrato de composição química definida permite, perfeitamente, a formação de penicilina. Ademais, oferece a vantagem de proporcionar uma extração e purificação finais mais fáceis. STONE e FARREL (1946) consideram indispensáveis, além de carbono, nitrogênio e fósforo, os seguintes elementos, para um tal meio sintético: potássio, magnésio, enxofre, ferro, zinco e cobre.

2.5. PRECURSORES

"O termo precursor é usualmente atribuído na literatura bioquímica, a um composto orgânico que sendo assimilado do meio, é incorporado diretamente, sem degradação prévia, à molécula de um dos produtos da fermentação. Em química e fermentação de penicilina, geralmente, subentende-se aquelas substâncias que irão constituir o resto R da molécula". (MARAVALHAS, 1954).

Como já vimos, linhas atrás, os principais tipos de penicilinas ditas naturais são especificados conforme a natureza do radical R. E, pelo conceito que hoje se tem das substâncias precursoras, a observação do Quadro Nº 2, permite-nos escolher entre os compostos orgânicos aquele de melhores possibilidades para a biosíntese da penicilina que se deseja obter (JOHNSON, 1952).

QUADRO N.º 2 : PRINCIPAIS PENICILINAS NATURAIS.

T I P O	D E N O M I N A Ç Ã O B R I T Â N I C A	R A D I C A L R
F	I	- CH ₂ - CH = CH - CH ₂ - CH ₃ Pentenil - 2
G	II	- CH ₂ -  Benzil -
X	III	- CH ₂ -  - OH p-Hidroxibenzil -
K	IV	- CH ₂ - (CH ₂) ₅ - CH ₃ n- Heptil
Dihidro F	Ácido Gigântico	- CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₃ amil-
Flavicina ou Flavici- dina.	-	- CH ₂ - CH ₂ - CH = CH - CH ₃ Pentenil - 3

Para o caso da benzil-penicilina, nenhum precursor se tem mostrado melhor que o ácido fenil acético e seus derivados (BEHRENS, 1949). Sobre esse fato, é interessante lembrar o papel da água de maceração do milho na fermentação de penicilina. A água de milho trás, geralmente, grande parte do material solúvel dos grãos de milho empregados para a obtenção do amido.

É, portanto, um resíduo encerrando muitos compostos, e, dentre todos, o próprio fungo escolheu aquele que melhores condições oferece para ser incorporado à molécula de penicilina, pois, em substratos à base de água de milho, sem adição de precursor, sempre há predominância da benzil penicilina (JOHNSON, 1952).

Pesquisas interessantes se fizeram no sentido de identificar qual composto ou grupos de compostos presentes na água de milho seriam os responsáveis pelo estímulo da produção de benzil penicilina. Nesse particular, há muitas evidências de que se trata da fenil alanina (BEHRENS, 1949).

Com adição de fenil alanina ao meio sintético de cultura, na proporção de 0,2 a 1%, a produção era estimulada. Experimentaram-se então, um grande número de compostos relacionados àquele amino-ácido, sobretudo produtos da sua descarboxilação, desaminação ou descarboxilação e desaminação. Nesse particular, comportaram-se melhor: o ácido fenil acético, a fenil acetamida e a fenil acetonitrila.

No momento, o precursor mais empregado é o ácido fenil acético ou um dos seus derivados.

Sobre o modo de emprego dos precursores, há certas regras a observar quanto à toxicidade de tais substâncias em relação a culturas novas. Para o caso do ácido fenil acético e seus derivados, por exemplo, a adição de precursor deve iniciar-se após 24 horas de fermentação e não exceder de uma grama por litro, por 24 horas. Melhor aproveitamento é obtido, quando as adições são repetidas, bem distribuídas durante o curso da fermentação.

2.6. CONDIÇÕES GERAIS DA FERMENTAÇÃO

2.6.1. Aeração e agitação.

A fermentação de penicilina coloca-se especificamente no grupo dos processos aeróbicos. E, no caso em apreço, aeração e agitação ligam-se intimamente pois, é por intermédio da agitação que se consegue a aeração da cultura. Por sua vez, o oxigênio fornecido ao fungo, quando em condições ideais, favorece a produção de penicilina e oferece melhores condições para a construção do micélio.

Nas condições de laboratório, a movimentação dos frascos, em agitador rotativo, à razão de 250 r.p.m., aproximadamente, fornece boas condições de aeração aos recipientes fechados com algodão. Todavia, deve salientar-se que a eficiência da aeração, controla-se pelo oxigênio dissolvido no meio de cultura e não pelo total de oxigênio que penetra no frasco.

A. L. Smith

Tal controle pode ser feito pelo método de terminação do valor de oxidação de sulfito (COOPER et al., 1944). Nos tanques fermentadores, de maior volume, avalia-se a aeração em volumes de ar por volume de meio, por unidade de tempo (STEFANIAK et al., 1946 e JOHNSON, 1946).

2.6.2. pH

Assume grande importância o controle do pH na fermentação de penicilina, devido, ao caráter instável dessa substância em valores de pH fora do limite de 5,5 a 7,5.

Todos os autores que tem estudado o assunto (MOYER e COGHILL, 1946; RAPER et al., 1944; FOSTER et al., 1943; STONE e FARRELL, 1946; JOHNSON, 1946 e STEFANIAK et al., 1946) concordam em que nessa fermentação, o pH normalmente varia de 4 a 8, sendo que o pH ideal para a formação e acúmulo de penicilina está compreendido ao redor de 7,0.

Evidentemente, a variação do pH está correlacionada ao metabolismo dos carboidratos fornecidos ao fungo, devido ao fato de que tais substâncias sempre produzem ácidos orgânicos quando em fermentação. Carboidratos como a glucose, rapidamente fermentescíveis, tendem a baixar o pH; contrariamente, a lactose possibilita mudanças suaves no pH, devido à sua utilização lenta pelo microorganismo.

Em substratos à base de água de milho as variações do pH são típicas. Com efeito, esse resíduo industrial encerra lactado e nitrogênio orgânico, além de muitos outros compostos; e o fungo, na sua necessidade de carbono, utiliza primeiro do ácido láctico diminuindo, portanto, a acidez; por sua vez, os compostos nitrogenados orgânicos sendo atacados, liberam nitrogênio amoniacal, criando assim condições tendentes à alcalinidade (FOSTER et al., 1946).

Outrossim, lançam-se mão de certos agentes para correção do pH ou para atuarem como substâncias tampão. A adição de hidróxido de sódio tem sido preconizada como corretivo, enquanto que o carbonato de cálcio, dificilmente solúvel, age como substância tampão. E, dessa forma, é frequentemente empregado nas fermentações de penicilina.

2.6.3. UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES.

Três condições fundamentais se enumeram para que haja sucesso na fermentação de penicilina: (JOHNSON, 1952) :

- a) Existência de micélio;
- b) Aeração da cultura, e
- c) Suprimento alimentar de carboidrato em condições de semi-penúria.

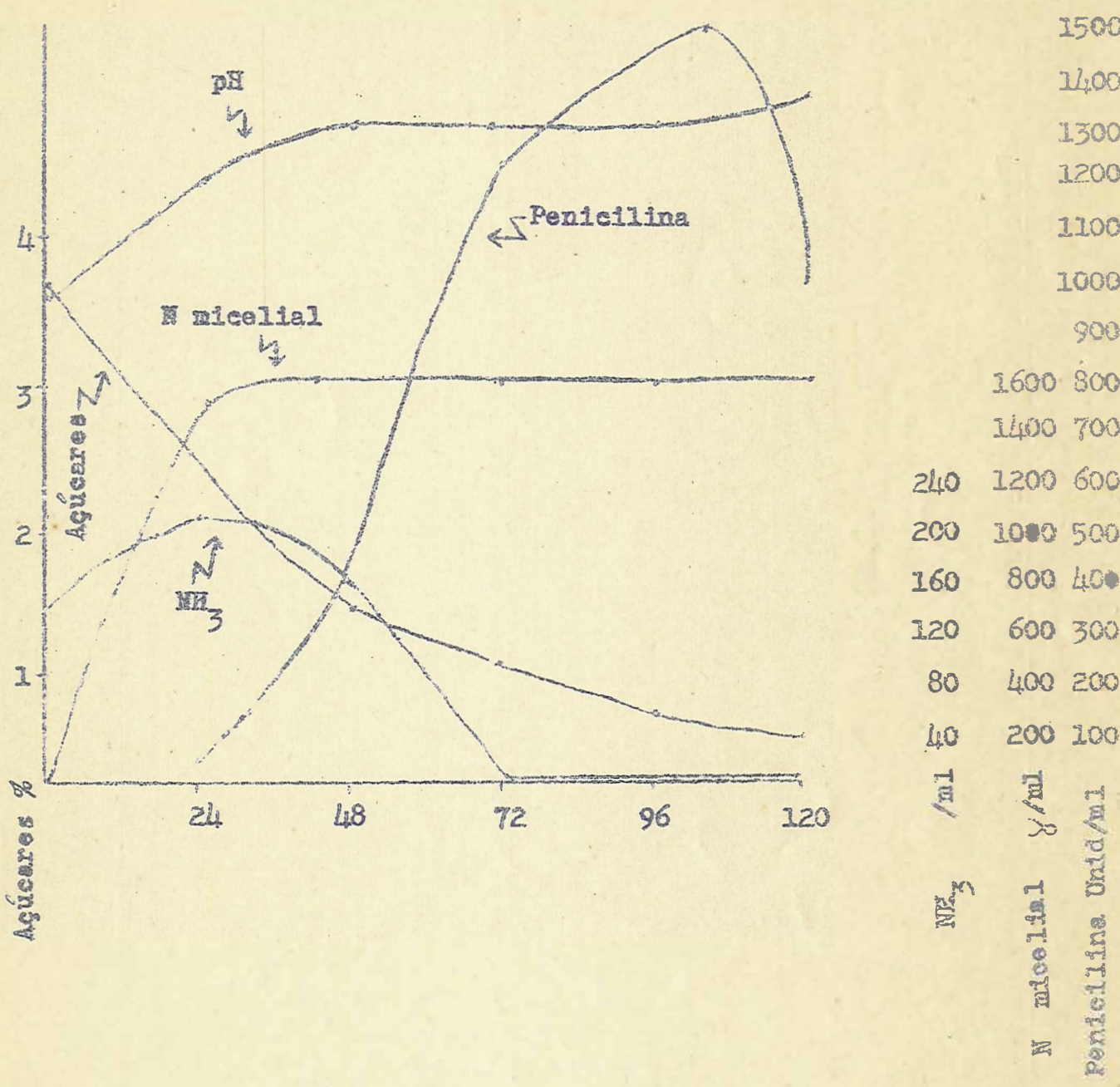
A última condição proporciona um estacionamento no crescimento do fungo ou, quando muito, um desenvolvimento muito limitado, e a um pH de 6,8 a 7,8, produzindo-se assim a penicilina. Esgotada a fonte de carboidrato, o pH sobe um pouco mais, a cultura entra em autólise e há certa destruição de penicilina.

A fase inicial da fermentação deve ser de um crescimento rápido, após um período muito curto, de natureza estacionária que se sucede à inoculação, e onde não se verifica crescimento.

O desenvolvimento micelial ótimo, nesta fermentação, geralmente, é conseguido por intermédio da glucose que se faz acompanhar da lactose nos meios de cultivo. E, assim, devido à sua rápida utilização pelo fungo, nessa fase o pH é baixo e não se forma penicilina. Esgotada a glucose, o fungo passa à fase de semi-penúria alimentar e, então, começa o período verdadeiramente produtivo.

Como vemos, a utilização dos açúcares está nitidamente relacionada à variação do pH, crescimento do micélio e produção de penicilina. O Gráfico Nº 1 resume as mudanças metabólicas, assim como a, produção de penicilina, verificadas numa cultura de Penicillium chrysogenum, Wisc. Q-176, em boas condições fermentativas. O crescimento micelial é medido em função do nitrogênio solúvel.

GRÁFICO Nº 1 : Mudanças metabólicas numa fermentação de Penicilina com a estirpe WISC. Q-176 (Dados fornecidos pelo Dr. Nelson Maravalhas).



2.6.4. TEMPERATURA

O ótimo de temperatura para a fermentação de penicilina localiza-se ao redor de 25°C. Os autores que têm executado pesquisas nesse sentido afirmam que há uma tolerância até 29°C., mas, que uma temperatura de 32°C. ocasiona baixa produção em todas as estirpes ensaiadas (STEPANIAK et al., 1946).

2.6.5. AGENTES ANTI-ESPUMANTES.

As fermentações efetuadas sob agitação e aeração ficam sujeitas à formação de espuma, razão porque muitos pesquisadores têm trabalhado, procurando substâncias e tipos de fermentadores destinados a sanar esse mal.

Admite-se, pelo menos em parte, que a formação de espuma nos substratos de fermentação de penicilina, seja devida à formação de substâncias tenso-ativas de natureza desconhecida. A espuma cresce nos fermentadores, ocupando o espaço livre, reduzindo a eficiência da aeração e comprometendo a assepsia. Daí a necessidade do emprego dos agentes anti-espumantes.

BROWN, e PETERSON (1950), aproveitando a experiência dos alemães que empregaram o fermentador tipo Waldhof, para produção de leveduras, chamam a atenção para esse tipo de fermentador no concernente à eficiência da aeração, quando se emprega um agente anti-espumante; relatam aqueles autores maiores produções de penicilina nos fermentadores tipo Waldhof que nos fermentadores convencionais. Experiências de ANDERSON (1951) confirmam tais resultados.

Estudando diversos agentes anti-espumantes, STEPANIAK et al., (1946) concluem que a banha, o óleo de banha e o óleo de banha com 3 % de octadecanol não são tóxicos, dando bom controle da espuma, quando empregados na proporção de 0,1 a 1,0 % nos meios de cultivo.

Óleos vegetais e minerais já têm sido experimentados visando combater a espuma, todavia, sempre levando em conta a exigência de não toxicidade e não incorporação de substâncias que dificultariam a extração e purificação da penicilina.

FOSTER et al., (1946) empregaram como anti-espumante citrato de tributilo.

Sobre o modo de ação do anti-espumante, explica-se pela sua propriedade em modificar a tensão superficial do meio. O seu emprego de modo correto, trás melhores condições fermentativas.

2.6.6. ASSEPSIA

Nenhuma fermentação exige tão rígidas condições de assepsia quanto a da penicilina, pois, qualquer contaminação, sobretudo bacteriana, por mínima que seja, acarreta certa destruição do antibiótico. Além disso, principalmente nas fermentações em tanques, oferece condições próprias para contaminações de naturezas diversas.

Para controle das contaminações a melhor providência é o rigor nas práticas operatórias. Não se usam, no momento, substâncias antisépticas, embora saibamos que o borax e o ácido bórico na proporção de 0,2 a 0,3 % sejam bons antissépticos em fermentações de penicilina (KNIGHT e FRAZIER, 1945 b), não interferindo no metabolismo do fungo.

Nas fermentações executadas em laboratório, o controle das contaminações é praticamente simples, desde que sejam seguidas as regras comuns de Bacteriologia.

Todavia, nas instalações piloto e nas indústrias, o problema é mais sério. Aí, devido ao maior volume de ar esterilizado requerido, ao grande conjunto de válvulas, encanamentos, junções, enfim à própria construção dos fermentadores, sempre há o perigo de remanescer, após a esterilização sob vapor, um microscópico foco de contaminação comprometendo todo o conjunto.

Dêsse modo, em toda fermentação de penicilina, um dos requisitos básicos - é fazer periodicamente o controle das contaminações pelos métodos correntes aplicados em Microbiologia.

2.7. EXTRAÇÃO

Extração e purificação são as fases finais do processo de fabricação da penicilina.

Na extração, principalmente, devem ser tomadas precauções, tendo em conta a instabilidade do produto e o perigo das contaminações que o destruiriam.

Após filtração do material fermentado, desprezando-se a massa micelial, o caldo deve ser mantido á temperatura inferior a 5°C sendo em seguida, tratado com ácido mineral para ajustagem de pH mais favorável á extração.

Geralmente a extração se faz por meio de solventes orgânicos a pH baixo - 2,0 a 2,5 - pois, nessas condições, a penicilina é mais solúvel nesses solventes que na água. Elevando-se o pH a 6,8, por exemplo, a solubilidade em água é maior e, então, elimina-se o solvente.

Seguem-se, uma filtração com auxílio de carvão ativado e cristalização sob baixa temperatura, purificação final e embalagem do produto nas indústrias farmacêuticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nossas experiências foram feitas apenas em frascos de Erlenmeyer de 500 ml, com 100 ml de meio, fechados com tampão de algodão e colocados em agitador rotativo á razão de 245 r.p.m., descrevendo círculo de 5 cm de diâmetro. Como agente anti-espumante, usamos 0,1 % de banha esterilizada, adicionada no fim das primeiras 24 horas. Todas as fermentações foram feitas em triplicata.

3.1. ESTIRPE USADA

O organismo usado foi o Penicillium chrysogenum Wisc. 49-133, de uma cultura estoque provinda da Universidade de Wisconsin, conservada em terra segundo o processo adotado por BACKUS, no Departamento de Botânica daquela Universidade.

Preferimos essa estirpe devido ao seu ótimo comportamento verificado por SOLTERO e JOHNSON (1952), quando comparado ao da cultura Wisc. Q-176, em condições de alimentação lenta. Ademais apresenta capacidade de esporulação superior á de outros mutantes permitindo, portanto, um desenvolvimento micelial mais rápido.

3.2. MEIO PARA ESPORULAÇÃO

Com auxílio de alça de platina, inoculamos placas de ágar nutritivo com a cultura estoque de *Wisc. 49-133*. Houve desenvolvimento satisfatório e esporulação abundante em 7-10 dias, em câmara de temperatura constante, ao redor de 25°C.

O meio para esporulação usado foi o de GALLEY et al., (1946) modificado por MARAVALHAS, cuja composição é vista a seguir:

Glicerol.....	7,50	g/l
Melaço.....	7,50	"
Vinhaça.....	2,50	" (pêso dos sólidos)
Pepôna.....	5,00	"
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05	"
KH ₂ PO ₄	0,06	"
NaCl.....	4,00	"
Ágar.....	25,00	"

Completoou-se a 1 litro com água de torneira.

Esse meio foi distribuído em tubos largos, esterilizados em autoclave a 1 atmosfera durante 20 minutos. Em seguida colocamos os tubos inclinados.

Desde que as placas de esporos se achavam bem desenvolvidas, eram guardadas em camara fria - de 3 a 5°C - sendo retiradas um pouco antes do momento de usar para tomar a temperatura ambiente.

3.3. PREPARO DO INÓCULO

Em tôdas as fermentações fizemos preparo de inóculo empregando 2% de uma suspensão de esporos em água destilada e esterilizada.

O meio para o preparo de inóculo proposto por MARAVALHAS foi o seguinte:-

Glucose.....	2,500 %
Água de milho.....	1,000 % (pêso dos sólidos)
$\text{CH}_3\text{COO-NH}_4$	0,300 %
KH_2PO_4	0,500 %
Na_2SO_4	0,040 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 %
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 %
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,002 %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001 %

completou-se a 100 ml com água de torneira.

O meio foi então distribuído em frascos de Erlenmeyer de 500 ml, na base de 100 ml por frasco os quais foram fechados com tampão de algodão e esterilizados durante vinte minutos em autoclave a uma atmosfera.

Ao mesmo tempo, distribuiu-se 0,5 grama de CaCO_3 por frascos de Erlenmeyer idênticos, úmidos, fechados de maneira semelhante, esterilizando-se.

Uma vez esterilizados e frios os frascos, agitou-se bem, vertendo-se o conteúdo de cada frasco do meio líquido em outro com CaCO_3 . Nesse momento, operando assépticamente, juntaram-se 2 ml da suspensão de esporos ao meio. Levou-se ao agitador rotativo, na câmara a 25°C, aí deixando por 48 horas, período suficiente para um bom desenvolvimento vegetativo.

3.4. MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Empregamos como fonte de carbono a lactose, a glucose, e sacarose e o mel final de usina de açúcar. Após pesagem do material sólido e medida dos ingredientes líquidos, completamos o volume com água de torneira. Distribuimos 100 ml em frascos de Erlenmeyer de 500 ml; fechamos com tampão de algodão e esterilizamos a uma atmosfera de pressão, durante vinte minutos em autoclave.

MEIO DE LACTOSE : Lactose..... 3,0 %
 Glucose..... 0,5 %
 Água de Milho... 5,0 % (sólidos)
 CaCO₃..... 0,5 %
 pH inicial..... 4,98

MEIOS DE GLUCOSE : Glucose..... 0,5 %
 Água de Milho... 5,0 % (sólidos)
 CaCO₃..... 0,5 %
 pH inicial..... 5,03

MEIO DE SACAROSE: Sacarose..... 0,5 %
 Água de Milho... 5,0 % (sólidos)
 CaCO₃..... 0,5 %
 pH inicial..... 4,93

MEIO DE MELAÇO : Melaço 1,0 %
 Água de milho 5,0 % (sólidos)
 CaCO₃ 0,5 %
 pH inicial 4,98

O melaço utilizado em nossas experiências encerrava 55,8 % de açúcares totais, fazendo-se inversão e determinando-se como glucose pelo método de SOMOGYI (1945).

Esterilizados e frios os meios, procedeu-se á inoculação, com 5% de inóculo, levando-se em seguida para o agitador rotativo, tendo-se antes retirado a primeira amostra da fermentação.

3.5. A M O S T R A G E M

A retirada de amostras dos frascos em fermentação foi feita diariamente tomando-se, de cada vez, 2 ml de material por meio de pipeta. Essa foi previamente esterilizada em estufa a 150°C durante uma hora. Na amostra determinou-se o pH em potenciômetro Cambridge. Em seguida, filtrou-se através de uma pipeta co algodão na ponta, desprezando-se o micélio.

Parte do caldo filtrado foi diluída em H₂SO₄ N/10, deixando-se o líquido a uma concentração de 1:10. Nesse material, determinou-se o nitrogênio total e os açúcares redutores.

Outra parte do material, diluída em solução de citrato-tampão ph 6,5 - destonou-se ao ensaio de penicilina.

A solução tampão de citrato usada foi preparada do seguinte modo:-

- Ácido cítrico monohidratado..... 10,0 gramas
- Água destilada 30,0 ml
- KOH para ajustar o pH a 6,5
- Completou-se a 100 ml com água destilada.

Essa solução estoque concentrada foi conservada em câmara fria, e conforme a necessidade, fazia-se a diluição para 1% com água destilad. A solução tampão assim diluída foi distribuída em frascos e esterilizadas em autoclave a uma atmosfera durante 20 minutos, sendo posteriormente guardada em câmara fria.

3.6. ENSAIO DE POTÊNCIA

O ensaio de penicilina foi feito por uma modificação do método de Oxford - cilindros em placas - segundo HEATLEY (1944), usando-se benzil penicilina cristalizada, sódica, como padrão. Para organismo teste usamos Bacillus subtilis, ATCC - 9945, procedente de "American Types Cultures Colection", cultura conservada na micoteca do Instituto Zimotécnico, sob Nº IZ-341.

Em cada placa de ensaio colocamos sempre uma série de padrões de 1/4, 1/2, 1, 2, e 4 unidades de penicilina por mililitro; para tanto tomamos a penicilina sódica cristalizada, apresentando 1.667 unidades por miligrama, desde que, por convenção internacional, uma unidade Oxford é a atividade contida em 0,6 gama de penicilina G.

Nessa definição, temos para as outras principais penicilinas:

T I P O	P O T Ê N C I A : U N I D A D E S / M I L I G R A M A
K	2.250
X	950
f	1.500

Os caldos filtrados, das fermentações, assim como as soluções padrões de penicilina, tamponados a pH 6,5, eram colocados em cilindros de vidros abertos nas duas extremidades, de 1,0 x 0,5 cm, sobre ágar inoculado com o organismo teste. Após 18 horas de incubação a 37°C, pela difusão do antibiótico pelo ágar, percebe-se nitidamente a região onde a bactéria não se desenvolveu e, então, mede-se a zona de inibição.

Essa zona de inibição é proporcional ao logaritmo de concentração da solução que a produziu.

Em papel semi-logarítmico, construímos a curva, colocando em ordenadas o diâmetro da zona de inibição e em abscissas as concentrações. No caso ideal deve dar uma reta. Nessa reta interpolando-se os valores dos diâmetros de inibição das amostras, obtêm-se as respectivas concentrações:

Para esse ensaio, preparamos uma placa de ágar para esporulação do Bacillus subtilis, segundo notas de laboratório do Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin e fornecidas por MARAVALHAS.

O meio constituiu-se do seguinte:

Peptona.....	0,5 %
Extrato de levedura.....	0,5 "
Extrato de carne.....	0,3 "
Glucose.....	1,0 "
Ágar.....	2,0 "

Completou-se a 100 ml com água de torneira.

Inoculamos placas desse meio com o organismo teste e incubamos a 37°C durante 7-10, dias para haver esporulação. Após esse período, fizemos uma suspensão de esporos em solução tampão de fosfato a 0,5 % - pH 7,0 - e esterilizada. Esperamos que se decantassem os fragmentos grosseiros e, em seguida, diluímos com 10 volumes do fosfato do tampão esterilizado.

Estando, pois, pronta a suspensão de esporos demos um choque de 80°C durante 10 minutos, em banho maria, para destruir as células vegetativas. Em seguida guardamos em câmara fria.

As placas de ensaio que usamos medem 21,5 X 34,0 centímetros sendo de vidro Pyrex, permitindo perfeita esterilização antes do uso.

Cada placa recebeu duas camadas de 150 ml de meio ágar, sendo a inferior nutritiva e a superior inoculada com o organismo teste. O meio usado para isso foi o seguinte:

Ágar.....	15,0 gramas
Extrato de levedura	1,0 "
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	1,0 "
Glucose.....	2,0 "
KH ₂ PO ₄	0,3 "

Completou-se a 1 litro com água de torneira.

O meio assim constituido foi esterilizado como os anteriores, em frascos Erlenmeyer de 500 ml. colocando-se 300 ml por frasco. Tirando-se os frascos da autoclave, esperou-se que a temperatura descesse a 50-60°C. Nesse momento colocou-se a primeira camada na placa, esperando-se que solidificasse para então colocar sobre ela a camada inoculada com 0,2 ml da suspensão de Bacillus subtilis.

Feito isso, cobriu-se a placa com uma lâmina de vidro forrada com papel de filtro, guardando-se em câmara fria. Daí era a placa retirada para uso, deixando-se-a antes retomar a temperatura ambiente.

3.7. ANÁLISES DE AÇÚCARES E DE NITROGÊNIO MICELIAL.

Nas amostras tiradas diariamente, diluídas em ácido e conservadas em câmara fria, determinaram-se açúcares redutores totais e nitrogênio total no ultimo dia de cada fermentação.

Açúcares redutores totais determinamos pelo método de SOMOGYI (1945).

Nitrogênio total foi determinado pelo método micro KJELDAHL (JOHNSON, 1941). E, por diferença com o nitrogênio inicial, obtemos o nitrogênio micelial. Ou seja :
N micelial = N inicial - N atual.

3.8. CROMATOGRAFIA

Usamos o processo de KARNOVSKY e JOHNSON (1949), apenas qualitativamente, para nos certificarmos se estavam aparecendo outras penicilinas além da G.

Trabalhamos com tiras de papel Whatman Nº 1, tamponadas com citrato de pH 6,5. Solvente foi o éter etílico lavado com água, depois saturado com uma solução de sulfato de amônio a 40 %. Para indicador da fronteira do solvente usamos o Sudan III em éter.

Os cromatogramas foram desenvolvidos por 18 horas em câmbia de temperatura controlada - 25°C - e, em seguida, colocados em placas inoculadas com Bacillus subtilis de maneira idêntica á usada para o ensaio de potência, anteriormente já descrito. Após isso, eram incubados a 37°C, durante 18 horas. Findo êsse prazo, notávamos sempre, apenas uma zona de inibição localizada na posição ocupada pela benzil penicilina do método relatado por KARNOVSKY e JOHNSON (1949).

3.9. AVALIAÇÃO DA AERAÇÃO

Nas fermentações de laboratório a aeração das culturas está em função dos seguintes fatores principais : número de rotações do agitador, tampão de algodão na boca dos frascos e volume do líquido em agitação:

Para a fermentação de penicilina, tem sido preconizado o agitador rotativo com velocidade ao redor de 250 r.p.m., descrevendo círculo de uma polegada de raio. O tampão de algodão que fecha os frascos deve ser colocado de modo a não privar a cultura da entrada de ar que lhe dá vitalidade. E quanto ao volume de líquido, o menor possível.

Além de observar atentamente tais fatores, fizemos ainda um controle da aeração pelo método de determinação de oxidação de sulfito (COOPER et al., 1944). Consiste êsse método em linhas gerais nos seguinte : Carregam-se frascos iguais aos de fermentação com o reagente (a), abaixo especificado, fechando-os na maneira usual e iniciando a aeração. Retiram-se amostras de 5 ml pipetando-as diretamente em 5 ml de solução de iodo-iodeto de potássio - reativo (b) Titula-se o excesso de iodo com tiosulfato - reagente - (c). A intervalos apropriados (5 minutos ou menos) retiram-se novas amostras, titulando-as. A proporção de aumento na titulação será constante se

se o grau de aeração for constante. Os resultados são, expressos em ml de tiosulfato N/10 por 5 minutos, por ml de amostra. Esse número é idêntico a milimoles de O₂ por litro e por minuto.

- REAGENTES:
- (a) Solução de sulfito de sódio aproximadamente normal (0,5M), contendo 0,005M CuSO₄. Essa solução deve ser preparada no momento do uso.
 - (b) Solução de iodo-iodeto de potássio, aproximadamente normal, porém mais forte que a de sulfito.
 - (c) Solução de tiosulfato de sódio 0,05 ou 0,1 N.
 - (d) Goma de amido.

3.10. CONTROLE DAS CONTAMINAÇÕES

Na fermentação de penicilina, como já dissemos atrás, as contaminações bacterianas são mais perigosas e ocorrem com frequência, se precauções não forem tomadas.

Em nossos materiais, procuramos sempre controlar ao microscópio a pureza das culturas, usando o método de GRAM para diferenciação de bactérias, modificado por HUCKER e CONN (1927).

3.11. SOLUÇÕES DE AÇÚCARES PARA ALIMENTAÇÃO LENTA E PRECURSORES.

Como precursor, para adjuvante da biosíntese da benzil penicilina, usamos o fenil acetato de potássio, na proporção de 0,1 % por dia. Conservamo-lo em solução aquosa e esterilizada, em câmara fria.

Para os meios de açúcares rapidamente metabolizáveis, usamos as soluções para alimentação lenta, já preparadas juntamente com a solução de precursor. Tais soluções de açúcares foram preparadas de modo a conter por mililitro a quantidade de açúcar desejada a ser suprida por cento e por hora. Assim, para um meio de sacarose, ao qual desejávamos fornecer 0,04 % de açúcar por hora, em quatro alimentações em 24 horas, preparamos uma solução de sacarose a 24 % em açúcar e a 2,5 % em fenil acetato de potássio. Numa solução assim, tínhamos, por ml, 0,24 g. de açúcar e 0,025 g. de fenil acetato de potássio. Fornecíamos 4 ml em 24 horas. Dêsse modo procedemos para a glucose e para o melado de usina, levando em conta nesse caso, sua riqueza em açúcares totais.

4. EXPERIMENTOS E RESULTADOS

4.1. FERMENTAÇÃO COM LACTOSE

O substrato lactose-água de milho, usualmente empregado em toda parte do mundo para produção de penicilina, foi o que usamos como ponto de referência.

A essa fermentação não adicionamos nutrientes suplementares durante o processo. O precursor foi adicionado depois das primeiras 24 horas uma vez ao dia, na proporção de 0,1 % por 24 horas.

O início do desenvolvimento micelial foi feito a custa de glucose, adicionada ao meio de cultura, na proporção de 0,5 % apenas.

Tal fermentação se processou satisfatoriamente, como podemos verificar no Quadro Nº 3, pelos valores do pH e da penicilina produzida. Tais valores representam a médias de cinco fermentações.

QUADRO Nº 3 : PRODUÇÃO DE PENICILINA E VALORES DO pH = MÉDIAS DE CINCO FERMENTAÇÕES COM LACTOSE EM TRIPLICATA.

HORAS	<u>0⁰⁰</u>	<u>24⁰⁰</u>	<u>48⁰⁰</u>	<u>72⁰⁰</u>	<u>96⁰⁰</u>
pH	4,98	5,79	6,81	7,38	7,52
PENICILINA U/ml	0,0	26,9	124,2	338,1	659,2

4.2. FERMENTAÇÃO COM GLUCOSE

As primeiras experiências feitas com glucose substituindo lactose (SOLTERO e JOHNSON, 1952) se processaram em meio sintético e logo depois em substratos à base de água de milho. Nesses trabalhos, verificou-se que, para certas culturas o rendimento em penicilina era igual ou superior ao do clássico processo de fermentação com lactose.

Fazendo inicialmente alimentação intermitente, viu-se mais tarde que a alimentação contínua e automática era mais eficiente ainda (SOLTERO e JOHNSON, 1954).

Em nosso trabalho, fizemos alimentação intermitente, de 6 em 6 horas e, para o caso da glucose, em 96 horas de fermentação, os resultados foram os que aparecem no Quadro Nº 4.

QUADRO Nº 4 : PRODUÇÃO DE PENICILINA E VALORES DO pH = MÉDIAS DE CINCO FERMENTAÇÕES COM GLUCOSE EM TRIPLICATA.

HORAS	0 ⁰⁰	24 ⁰⁰	48 ⁰⁰	72 ⁰⁰	96 ⁰⁰
pH	5,03	5,92	6,67	7,36	7,71
PENICILINA U/ml	0,0	40,0	217,3	491,6	724,0

Quanto á proporção de glucose empregada usamos a mesma de SOLTERO e JOHNSON (1952), ou seja 0,03 % por hora adicionada juntamente com o precursor.

4.3. F E R M E N T A Ç Ã O C O M S A C A R O S E

Em 96 horas de fermentação, o acúmulo de penicilina foi satisfatório, assim como o aspecto da cultura se apresentou normal, com desenvolvimento de micélio razoável. Resumimos nossos resultados no Quadro Nº 5.

QUADRO Nº 5 : PRODUÇÃO DE PENICILINA E VALORES DE pH - MÉDIAS DE TRÊS FERMENTAÇÕES COM SACAROSE EM TRIPLIACTA.

HORAS	0 ⁰⁰	24 ⁰⁰	48 ⁰⁰	72 ⁰⁰	96 ⁰⁰
pH	4,93	5,41	7,10	7,66	8,446
PENICILINA U/ml	0,0	10,4	179,3	373,3	720,0

A alimentação consistiu de 0,04 % de sacarose por hora, adicionada de 6 em 6 horas, juntamente com o fenil acetato de potássio, este na proporção de 100 mg. por dia e por cento.

4.4. F E R M E N T A Ç Ã O C O M M E L A Ç O

Dos dados que obtivemos, a melhor produção foi conseguida, alimentando-se a cultura com mel final em solução diluída em água destilada, de modo a incorporar 0,035 % de açúcares totais por hora, calculados como glucose. A alimentação sempre se processou de 6 em 6 horas, por meio de pipeta esterilizada na maneira usual. Nessa mesma solução era adicionado o precursor, na proporção de 100 mg. por dia, por frasco de cultivo. Damos em seguida os valores médios dessas fermentações, no Quadro Nº 6.

QUADRO Nº 6 : PRODUÇÃO DE PENICILINA E VALORES DE pH - MÉDIAS DE CINCO FERMENTAÇÕES EM TRIPLICATA COM MELAÇO.

HORAS	0 ⁰⁰	24 ⁰⁰	48 ⁰⁰	72 ⁰⁰	96 ⁰⁰
pH	4,98	5,38	6,50	6,71	7,86
PENICILINA U/ml	0,0	33,6	125,3	335,0	755,0

5. D I S C U S S Ã O D O S R E S U L T A D O S

As produções de penicilina que obtivemos em substratos à base de lactose, de glucose, de sacarose e de melaço de usina, em fermentações durando 96 horas, nos mostraram que, para a estirpe que utilizamos, a alimentação lenta é mais eficiente que o processo utilizando lactose.

É interessante notar que as primeiras pesquisas nesse sentido tenham nascido nos Estados Unidos da América, onde há grande produção leiteira e, conseqüentemente, não há o problema do suprimento de lactose. Para o Brasil, porém, como já ponderámos noutro capítulo, o problema existe, pois nossas condições são bem diferentes. E, por razões cuja discussão não cabe no presente trabalho, não podemos esperar para nosso país, num futuro próximo, grandes produções de lactose.

Outrossim, temos aqui uma indústria açúcareira já bem fundamentada na cultura de cana. No Estado de São Paulo, por exemplo, não se produz mais sacarose por questões relacionadas à colocação do produto. Ora desde que já estamos ingressando no campo da produção de antibióticos, começando pelo fabrico e pela pesquisa do principal deles - a penicilina - é razoável que se façam estudos visando o aproveitamento de um produto nacional de eficiência comprovada.

Pelo modo com que se desenvolveu o Penicillium chrysogenum Wisc. 49-133 em nossos frascos de fermentação em meios à base de água de maceração de milho e de mel final de usina de açúcar, ainda que com número limitado de fermentações realizadas, podemos dizer desse material, que se trata de ótima fonte de carboidrato para a produção de penicilina.

Quanto às mudanças metabólicas nos diferentes meios, durante as fermentações realizadas, não percebemos outras particularidades no comportamento dos açúcares usados. Tanto o pH, como o nitrogênio micelial variaram normal e indistintamente em todos os casos. Do mesmo modo, o aparecimento de espuma, quando se verificou, foi indistintamente observado nos vários açúcares estudados.

Ademais, os meios onde o melaço de usina é empregado como fonte de carbono, não oferecem dificuldades quanto à extração e purificação finais da penicilina. (MARAVALHAS).

6. SUMARIO E CONCLUSÕES

- 1- A fermentação de penicilina pode ser realizada sem utilização de lactose, como fonte de carbono, o que vem confirmar as conclusões de SOLTERO e JOHNSON (1952).
 - 2- O uso de melaço de usina de açúcar, na proporção de 0,035 % de açúcares, por hora, adicionado com o precursor fenil acetato de potássio, quatro vezes ao dia, apresentou produção de penicilina superior aos substratos de glucose e de sacarose em idênticas condições de alimentação.
 - 3- A sacarose, na forma de açúcar filtrado comum de usina, na proporção de 0,04 % por hora apresentou uma potência média de 720,0 unidades por ml, após 96 horas de fermentação.
 - 4- Desde que em fermentações com melaço, a extração e a purificação finais não apresentam dificuldades, esse resíduo da indústria açucareira encontra assim mais uma aplicação de interesse econômico.
 - 5- Já que a fermentação de penicilina, empregando-se sacarose em alimentação lenta, pode ser realizada tão bem ou melhor que com a lactose, produto de importação, é interessante relacionar esse fato com a grande facilidade que temos no Estado de São Paulo para produzir sacarose da cana de açúcar e estudar as vantagens econômicas das aplicações para um excedente de produção.
-

B I B L I O G R A F I A

- ABRAHAM, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A. e Florey, H.W.
1941 - Lancet. 2:177
- ANDERSON, R.F.
1951 - Antibiotics Research Report Nº 16-Dezº pag. 16
Universidade de Wisconsin.
- BACKUS, M.P.
1954 - Notas técnicas de laboratório fornecidas por intermédio do Dr. N. Maravalhas.
- BEHRENS, Otto K.
1949 - "The chemistry of penicillin" Editores: Clarke et al
Princeton University Press - Princeton - New Jersey.
- BORNSTEIN, Siegbert
1940 - J. Bact. 39: 383
- BROWN, W.E. e Peterson, W.H.
1950 - Ind. Eng. Chem. 42: 1823
- CHAIN, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Ewing, J. Orr e Sanders, A.J.
1940 - Lancet. 2: 226
- CHAIN, E. e Florey, H.W.
1944 - Endeavour. 3: 3
- CLARKE, Hans T., Johnson, John R. e Robinson, Robert (Editores)
1949 - "The chemistry of penicillin" - pag. 3
Princeton University Press. Princeton - New Jersey.
- CLUTTERBUCK, P.W., Lovell, R. e Raistrick, H.
1932 - Biochem. J. 26: 1907
- COOPER, C.M., Fernstron, G.A. e Miller, S.A.
1944 - Ind. Eng. Chem. 36: 504
- FLEMING, Alexander
1929 - J. Exptl. Path. 10: 226
- FOSTER, J.W., Woodruff, H.B. e Mc Daniel, L.E.
1946 - J. Bact. 51: 465

GAILEY, F.B., Stefaniak, J.J., Olson, B.H. e Johnson, M.J.
1946 - J. Bact. 52: 129

HEATLEY, N.G.
1944 - Biochem. J. 38: 61

HUCKER, G.J. e Conn, H.J.
1927 - N.Y. Agr. Exp. Sta., Tech. Bul. 128

JOHNSON, M.J.
1941 - J. Biol. Chem. 137: 575

JOHNSON, M.J.
1946 - Ann. N.Y. Acad. Sci. 48 (art.2): 57

JOHNSON, M.J.
1952 - Bull. World Hlth. Org. 6: 99

KARNOVSKY, M.L. e Johnson, M.J.
1949 - Anal. Chem. 21: 1125

KNIGHT, S.G. e Frazier, W.C.
1945 - J. Bact. 50: 505

KOFFLER, H., Emerson, R.L., Perlman, D. e Burris, R.H.
1945 - J. Bact. 50: 517

MARAVALHAS, Nelson
1954 - Ciencia e Cultura (no prelo)

MOYER, A.J. e Coghill, R.D. (a)
1946 - J. Bact. 51: 57

MOYER, A.J. e Coghill, R.D. (b)
1946 - J. Bact. 51: 79

RAPER, Kenneth B., Alexander, D.F. e Coghill, R.D.
1944 - J. Bact. 48: 639

RAPER, Kenneth B.
1952 - Mycologia, 44: 1

REID, R.D.
1933 - J. Bact. 25: 31

SHEEHAN, J.C.

1953 - 13th National Organic Chemistry Symposium, Am. Chem. Soc.
- Junho 1953, Ann Arbor.

SOLTERO, Fred V. e Johnson, M.J.

1952 - Antibiotics Research Report nº 17 - pag. 4 (junho-1)
Universidade de Wisconsin.

SOLTERO, Fred V. e Johnson, M.J.

1954 - Applied microbiology, 2: 41

SOMOXYI, M.

1945 - J. Biol. Chem. 160: 61

STAUFER, J.F. e Backus, M.P.

1953 - Symposium on Mycological Production of Penicillins - Joint
Meeting of the Microbiological Section of the Botanical So-
ciety of America and the Society for Industrial Microbiolo-
gy. Mad. Wisc.

STEFANIAK, J.J., Gailey, F.B., Brown, C.S. e Johnson, M.J.

1946 - Ind. Eng. Chem. 38: 666

STONE, R.W. e Farrell, M.A.

1946 - Science. 104 (2706): 445

DU VIGNEAUD, V., Carpenter, F.H., Holley, R.W., Livermore, A.A. e
Rachelle, J.R.

1946 - Science, 104: 431

WAKSMAN, S.A.

1947 - "Les antibiotiques" - pag. 18
Trois Conférences - Editor: Masson e Cia. - Paris

WAKSMAN, S.A.

1948 - "Antagonismes microbiens et substances antibiotiques".
pag. 109 - Trad. de Jacques Duche.
Société d'Édition d'Enseignement Supérieur - Paris.

8. AGRADECIMENTO

Pelo apôio moral, pelo interêsse que tomou por êste trabalho, somos gratos ao Professor Jayme Rocha de Almeida que, além disso, como diretor do Instituto Zimotécnico, nos proporcionou meios para trabalhar mais e melhor.

Ao Dr. Nelson Maravalhas, Chefe da Secção de Bioquímica do Instituto Zimotécnico, pela sugestão do problema, por nos ter iniciado na pesquisa de antibióticos, pela orientação que nos deu, nosso agradecimento.

Aos nossos colegas, sejam do Departamento de Química, sejam do Departamento de Microbiologia do Instituto Zimotécnico, reconhecemos a boa vontade e colaboração.

Usinas de açúcar Santa Helena, Bom Jesús, Paraiso e "Société des Sucreries Bresiliennes"; Refinações de Milho Brasil e Divisão de Penicilina das Indústrias Fontoura, Wieth S/A., nossa gratidão pela boa vontade fornecendo matérias primas e subprodutos para nossas experiências.

E, de um modo geral, a todos os funcionários do Instituto Zimotécnico, que, direta ou indiretamente contribuíram para o bom andamento dêste trabalho, nosso agradecimento.
