

wir weder den Kern, noch was in ihm vorgeht, sehen. Wir sind daher auf Färbungsreaktionen angewiesen und müssen die Artefakte und Mißdeutungen in Kauf nehmen, die damit verbunden sind. Es liegen auch Angaben über Endopolyploidie bei Hefen vor. Wenn sie auch vorläufig wenig gesichert erscheinen, müssen erst eingehende Nachprüfungen erweisen, ob sie wirklich abzulehnen sind (vgl. Geitler) (2).

Wie aus dem Gesagten hervorgeht, fehlt es nicht an wissenschaftlichen Fragestellungen, die die Beschäftigung mit den Kleinpilzen aus dem Bereich der Protascomyzeten sehr interessant und reizvoll machen. Die Arbeiten sind allerdings schwierig und mühsam und erfordern Geduld und wieder Geduld. Die hohen Ziele können nur langsam erreicht werden und setzen voraus, daß man Hefen sammelt und bestimmt. Die lebende Hefesammlung von Hunderten bis Tausenden von Stämmen schafft die Grundlage für vergleichende Untersuchungen. So können die zur Bestimmung geeigneten Methoden weiter entwickelt und Bestimmungsschlüssel ausgearbeitet werden. Wenig bekannt ist, welche Eigenschaften in der Hauptsache für die Bestimmung von hefeartigen Pilzen verwendet werden können. Auf methodische Einzelheiten will ich hier nicht eingehen, sondern nur ein paar Hinweise geben. Einerseits werden die morphologischen Eigenschaften der Zelle und der Zellverbände geprüft, also entweder des durch Spitzenwachstum der Hyphen entstandenen Myzels oder des durch Sprossung gebildeten Pseudomycel, andererseits die Eigenschaften der Gärung und Assimilation von Zuckerarten und der Assimilation von Stickstoffverbindungen. Sowohl morphologische wie physiologische Eigenschaften können manchmal sehr wenig kennzeichnend sein; daher ist es immer nötig, auf möglichst viele Merkmale nebeneinander zu prüfen, denn man weiß nie vorher, welche Eigenschaften einem bei der Bestimmung weiter helfen werden. Die Vergärung und auch die Assimilation von Zuckerarten erfolgen nie wahllos, sondern streng nach den von Kluyver (3) gefundenen Regeln. Danach wird Glukose immer vergoren, wenn überhaupt Gärfähigkeit vorliegt. Nur wenn Glukose vergoren wird, können andere Zucker vergoren werden. Lävulose und Mannose werden qualitativ ebenso vergoren wie Glukose, daher kann man auf ihre Prüfung verzichten. Maltose und Laktose werden nie von derselben Hefe vergoren. Außer den schon genannten Zuckern (Glukose, Maltose und Laktose) wird noch auf die Vergärung von Saccharose und Raffinose geprüft. Für die Assimilation werden die gleichen Zuckerarten verwendet sowie die drei wichtigsten Pentosen: Xylose, Arabinose und Rhamnose. Hier gelten dieselben Gesetze. Dieselben Zucker, die vergoren werden, werden auch assimiliert. Es können aber oft Zucker assimiliert werden, die nicht vergoren werden. Wenn die Gärfähigkeit ganz fehlt, ist die Feststellung der Assimilationseigenschaften besonders wichtig. Auf die Bedeutung der Stickstoffassimilation soll noch in anderem Zusammenhang hingewiesen werden.

Unsere Vorstellungen von dem Reich der Hefen und seiner Gliederung sind noch im Fluß. Wer sich ernsthaft mit Bestimmen beschäftigt, findet nicht selten eine neue Art. Sicher bekannt sind über 200 Arten, darüber hinaus gibt es noch Hunderte von unsicheren und zweifelhaften Arten, die noch der Bearbeitung harren. Trotz der besonders in den letzten 20 Jahren erzielten Fortschritte ist unsere Kenntnis der Hefen, besonders hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer ökologischen Bedeutung, noch sehr lückenhaft.

Schrifttum:

- 1) Diddens, H. A. und Lodder, J.: Die anaskosporogenen Hefen. 2. Hälfte, Amsterdam 1942.
- 2) Geitler, L.: Fortschritte der Botanik. 13, 3, 1951.
- 3) Kluyver, A. J.: Biochemische Suikerbepalingen. Diss. Delft 1914.
- 4) Lodder, J.: Die anaskosporogenen Hefen, 1. Hälfte, Amsterdam 1934.
- 5) Lodder, J. und Kreger-van Rij, N. J. W.: The Yeasts. Amsterdam 1952.
- 6) Stelling-Dekker, N. M.: Die sporogenen Hefen. Amsterdam 1931.
- 7) Wickerham, L. J. und Burton, K. A.: J. Bact. 63, 449, 1952.

Über Antibiotika aus Pilzen und ihre Gewinnung in der Industrie

Von Adolf Oppermann.

Man weiß heute, daß ein erheblicher Teil der höheren und auch ein Teil der niederen Pilze unter bestimmten Bedingungen Stoffe ausscheidet, die auf andere Pilze oder auch auf Bakterien wachstumshemmend oder sogar abtötend wirken. Die Kenntnis, daß sich viele *Penicillium*-Arten antagonistisch zueinander und auch zu anderen Mikroorganismen

verhalten, ist schon seit langem bekannt. Eine systematische Untersuchung des Verhaltens von *Penicillium*-Arten zueinander und zu einigen Basidiomyceten führte Harder 1911 durch. Über die chemische Struktur der auftretenden Hemmstoffe war jedoch nichts bekannt; man wußte nur, daß einige dieser Stoffe thermolabil, andere thermostabil waren. In einzelnen mycologischen Arbeiten wurde dann noch gelegentlich von Hemmstoffen bei einzelnen Pilzen nebenbei berichtet, doch gründliche Untersuchungen dieses Phänomens wurden nicht angestellt. 1923 untersuchte Zopf die Wirkung eines von *Sparassis ramosa* produzierten Hemmstoffs auf den Hausschwamm, und im gleichen Jahr gelang es Wedekind und Fleischer, die chemische Struktur dieses Sparassol genannten Stoffes aufzuklären. Es handelt sich dabei um eine zyklische Verbindung, den Everninsäuremethylester.

Alle diese Untersuchungen hatten jedoch bis zu Flemings berühmt gewordener Beobachtung im Jahre 1927, daß ein von einer *Penicillium*-Art (*Penicillium notatum*) ausgeschiedener Stoff auch das Wachstum von krankheitserregenden Bakterien hemmt und also als Heilmittel brauchbar sein könnte, rein wissenschaftliches Interesse und waren nur einem relativ kleinen Kreis von Biologen bekannt. Mit der Anwendung des von *Penicillium notatum* ausgeschiedenen Penicillins in der Medizin aber bekamen diese vielfach bei der Bearbeitung anderer Probleme nebenbei gemachten Beobachtungen über einen Antagonismus verschiedener Pilze auch praktische Bedeutung. Es setzte nun an vielen Stellen eine systematische Untersuchung von Pilzen auf die Anwesenheit von Antibiotika ein. So hat z. B. Wilkins bisher über 1200 *Basidiomyceten* in Reihenuntersuchungen geprüft.

Am genauesten sind bis jetzt die *Ascomyceten* und *Fungi imperfecti* untersucht, von denen nach den bisherigen Ergebnissen etwa 40—60% in der Lage sind, antibiotische Stoffe zu bilden. Bei den Basidiomyceten sind es etwa 30—40%, während bei den *Phycomyceten* bisher nur vereinzelt Antibiotika nachgewiesen sind; doch ist diese Gruppe auch noch sehr wenig untersucht.

Ein großer Teil der von *Ascomyceten* und *Fungi imperfecti* gebildeten Antibiotika ist auch in der chemischen Zusammensetzung bekannt, so das Penicillin, weiterhin Kojisäure, Puberulinsäure, Puberulonsäure, Aspergillinsäure, Citrinin, Griseofulvin, Gliotoxin, Spinulosin und Fumigatin, um nur einige Beispiele zu nennen. Chemisch gesehen gehören sie sehr verschiedenen Stoffgruppen an; nur wenige, wie z. B. Spinulosin und Fumigatin, sind nahe verwandt (Chinonderivate).

Trotz der vielen auch bei *Basidiomyceten* festgestellten Hemmstoffe sind hier nur wenige chemisch genauer untersucht, so das schon erwähnte Sparassol, weiterhin z. B. eine aus *Lentinus Degener* isolierte Substanz, die chemisch dem Fumigatin ähnlich ist, ein 6-Methyl-1,4-naphthochinon aus *Marasmius graminum* und ein antibiotisch wirkender Stoff aus *Clitocybe diatreta*, der Polyacetylen-Struktur hat. Einige Untersuchungen sind auch über das Clitocybin (*Clitocybe gigantea*), das Pleurotin (*Pleurotus griseus*), das Nebularin (*Clitocybe nebularis*) und noch einzelne aus anderen *Basidiomyceten* isolierte antibiotisch wirkende Stoffe durchgeführt, ihre Struktur ist jedoch noch nicht ermittelt.

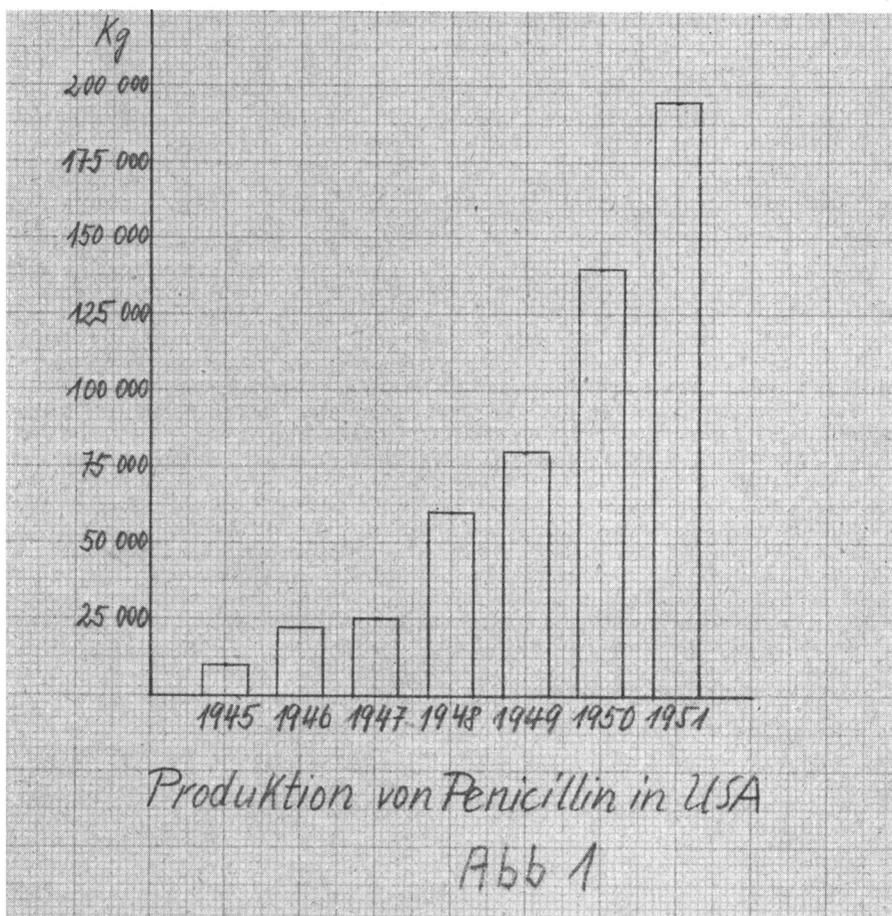
Von allen diesen von Pilzen gebildeten Antibiotika, die zum Teil bereits auf ihre Wirkungsbreite gegenüber pathogenen Mikroorganismen untersucht sind, werden aber bisher nur einzelne in größerem Maßstabe hergestellt und in der Medizin angewandt. Dies sind das Penicillin und in Indien auch das von Bose 1947 entdeckte Polyporin, das aus *Polyporus sanguineus* gewonnen wird. Vor allem das Penicillin wird in den letzten Jahren in erheblicher Menge industriell hergestellt. Die Abbildung 1 zeigt das Ansteigen der Penicillin-Produktion in den USA während der letzten Jahre. Obschon die chemische Struktur des Penicillins aufgeklärt und auch die chemische Synthese gelungen ist, wird das Penicillin ausschließlich auf mikrobiologischem Wege hergestellt. Die chemische Synthese bringt bisher so geringe Ausbeuten (0,07—0,14% der theoretisch zu erwartenden), daß sie der Biosynthese bisher keine Konkurrenz machen konnte.

Es soll hier kurz geschildert werden, wie man in der Industrie derartige Mengen von Penicillin, wie sie in Abbildung 1 angezeigt werden, herstellt.

Der für die ersten Versuche zur Gewinnung von Penicillin benutzte Stamm von *Penicillium notatum* wurde zunächst in großen, flachen Schalen gezüchtet. Man arbeitete mit Oberflächenkulturen, da eine gute Sauerstoffversorgung des Pilzes gewährleistet sein mußte. Um auf diese Weise größere Mengen Penicillin zu gewinnen, mußten sehr viele Schalen mit einer nur dünnen Nährlösungsschicht angesetzt werden; ein Verfahren, das für eine Großproduktion sehr unwirtschaftlich war. Wirtschaftlich wurde das Verfahren einer Penicillin-Produktion erst, als man feststellte, daß der Pilz bei ausreichender Sauerstoff-

zufuhr auch submers gut wächst und Penicillin bildet. Nach diesem Submersverfahren wird heute ausschließlich die Penicillin-Fermentation betrieben, wobei die Produktionsfermenter erhebliche Größe (bis zu 80000 Liter) erreichen.

Heute wird als Produktionsstamm hauptsächlich *Penicillium chrysogenum* benutzt. Man geht jeweils von Sporen aus, die in steriler Erde im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Sporen werden auf Agar-Nährboden gebracht und bei 24°C bebrütet. Wenn das auswachsende Mycel hier wieder Sporen gebildet hat, werden diese mit sterilem Wasser ab-



geschwemmt und mit ihnen eine Nährlösung in Erlenmeyer-Kolben beimpft. Diese werden bei 24°C geschüttelt; dabei findet eine weitere Vermehrung statt. Die auf diese Weise erhaltene Sporensuspension dient dann als Impfmateriel für die Vorfermenter.

Um die Züchtungszeit in dem Produktionsfermenter so weit wie möglich abzukürzen, wird der Pilz zunächst in kleinen Fermentern vorgezchtet. So wird mit der durch Schütteln in dem Erlenmeyer-Kolben erhaltenen Sporensuspension zunächst ein Vorfermenter mit 400 Liter Fassungsvermögen, der sterile Nährlösung enthält, beimpft. In diesem Vorfermenter ist ein Belüftungssystem eingebaut, durch das beliebig zu regelnde Luftmengen in die Nährlösung eingeblasen werden können, und weiterhin ein Rührer zur guten Durchmischung der Lösung und Verteilung der Luft. Die Beimpfung erfolgt, da steril gearbeitet werden muß, mit Hilfe eines besonders konstruierten Gerätes.

Nach 24—48stündiger Züchtungszeit, in der die Sporen ausgekeimt sind und sich Mycel gebildet hat, wird die Kultur in einen in seiner technischen Ausführung dem Vorfermenter ähnlichen Zwischenfermenter mit 4000 Liter steriler Nährlösung übergeführt; nachdem sich hier das Mycel genügend vermehrt hat, dient diese Kultur als Impfstoff für den Produktionsfermenter. In diesem 30000 bis 80000 Liter fassenden Fermenter befindet sich eine Nährlösung aus Maisquellwasser, Milchzucker und einigen Salzen, die beispielsweise folgendermaßen zusammengesetzt ist:

Maisquellwasser (Cornsteep-Liquor)	40 ccm
Lactose	27,5 g
NaNO ₃	3,0 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,4 g
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	0,2 g
Glucose (Monohydrat)	3,0 g
Aqua dest.	ad. 1000 ccm

Das Maisquellwasser, ein Abfallprodukt der Stärkeindustrie, hat sich als günstigste Stickstoffquelle für die Penicillinbildung erwiesen. Bei der Verwendung dieser komplexen N-Quelle ist die Penicillinbildung erheblich höher als bei Verwendung synthetischer Nährlösungen. Vermutlich sind bestimmte Aminosäuren und Eiweißverbindungen ausschlaggebend. Die Versuche von Szilvinyi und Klaushofer (1951) zeigen beispielsweise, daß durch Zugabe von Cystin zu Nährlösungen die Penicillinbildung erhöht werden kann. Möglicherweise dient diese schwefelhaltige Aminosäure als „precursor“ für den Aufbau des Penicillinmoleküls. Daß aber auch anorganischer Schwefel eingebaut wird, zeigen Versuche, bei denen der Nährlösung radioaktive anorganische Schwefelverbindungen zugegeben wurden. 10% dieses ³⁵S wurden im Penicillin wiedergefunden.

Von großer Wichtigkeit ist, daß die Kulturbedingungen in den Fermentern immer optimal sind. Die günstigste Züchtungstemperatur für *Penicillium chrysogenum* ist 24—25°C, sie wird automatisch gemessen, registriert und geregelt. Auch die Belüftung muß optimal sein. Ein Fermenter von 30000 Liter Inhalt braucht 600000 bis 800000 Liter Luft/Std. Diese Luft muß durch Filtration durch mit Baumwolle, Glaswolle oder Aktivkohle gefüllte Filtergefäße entkeimt werden. Das Röhrensystem wird durch Hitze sterilisiert.

Bekanntlich bildet *Penicillium chrysogenum* vier verschiedene Penicilline nebeneinander, die sich nur in der Seitenkette voneinander unterscheiden. Um zu erreichen, daß vom Pilz in der Hauptsache das Penicillin G (Benzylpenicillin), das sich als das therapeutisch wirksamste herausgestellt hat, gebildet wird, kann man Derivate der Phenyllessigsäure als „precursor“ zusetzen. Aus Versuchen mit markierten Atomen geht hervor, daß die Phenylacetylgruppe vom Pilz unverändert in das Penicillinmolekül eingebaut wird.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Ausbeute an Penicillin auch unter günstigsten Kulturbedingungen ist natürlich der Pilzstamm. Der erste, zur Penicillin-Herstellung benutzte Stamm von *Penicillium notatum* bildete etwa 30 I. E. Penicillin/ccm Nährlösung. Im Laufe der Zeit gelang es, Stämme zu züchten, die das 100fache an Penicillin erzeugen können, wie Tabelle 1 zeigt. Man nutzte dabei die Tatsache aus, daß man durch UV-Bestrahlung von *Penicillium*-Kulturen oder durch Zugabe bestimmter Chemikalien Mutanten erhalten kann, deren Penicillinbildungsvermögen erheblich erhöht ist.

Tabelle 1. Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Penicillinbildner:

Mikroorganismus	Penicillin-Ausbeute in 1 ccm Kultur- flüssigkeit
1. <i>Penicillium notatum</i> , zuerst isolierter Stamm	30 I. E.
2. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951	100 „
3. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951 natürliche Mutante B 25	250 „
4. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Mutante B 25 mit X-Strahlen behandelt = X 1612	500 „
5. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Mutante X 1612 mit UV-Licht bestrahlt = Wisc. Q 176	900 „
6. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Mutante Wisc. Q 176 mit Dichloräthylmethylamin behandelt	1350 „
7. <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951, Mutante Wisc. Q 176 mit UV-Licht bestrahlt = var. brevisterigma	3000 „

(nach Schweiz. Apoth.-Ztg. Nr. 24, 1953).

Nach Beendigung der Fermentation wird das Mycel mit Hilfe einer Filterpresse von der Kulturlösung abgetrennt und das Penicillin aus der blanken Kulturlösung durch Extraktion oder Adsorption gewonnen. In der Hauptsache wird heute die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Butylacetat, Amylacetat oder Chloroform durchgeführt. Dabei muß, um das Penicillin in die in den Lösungsmitteln lösliche freie Säure zu überführen, der pH-Wert auf 2,0—2,5 eingestellt werden. Die Trennung der beiden Flüssigkeiten erfolgt in speziellen Extraktionszentrifugen. Aus dem organischen Lösungsmittel wird das Penicillin durch Zusatz von Pufferlösung als Alkalisalz wieder in die wässrige Phase übergeführt. Zur weiteren Reinigung können diese Verfahren wiederholt werden, und schließlich erhält man durch Zugabe von geeigneten organischen Basen schwerlösliche Salze. Diese lassen sich dann nach verschiedenen Methoden, wie sie beispielsweise in dem Beitrag von Kimmig, Öppinger, Weygand und Wacker über Antibiotika in Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, 3. Bd., 1953, beschrieben werden, in die in der Hauptsache therapeutisch angewandten Salze (Kalium-, Natrium- und Procain-Salz) umwandeln.

Einige Pilzfunde aus Österreich

Von J. Gremmen.

(Forstliche Versuchsanstalt T.N.O., Wageningen, Niederlande)

Während der Tagung der österreichischen mykologischen Gesellschaft in Fritzens-Wattens im August 1952 war mir die Gelegenheit geboten, einige Exkursionen in der Umgegend von Fritzens, in dem Gnadenwald und nach der Urgesteinseite bei Tulfes (Voldertal) mitzumachen. Die folgenden niedrigen Pilze wurden damals gesammelt; hauptsächlich sind es Repräsentanten aus den Gruppen der Uredineen und Diskomyzeten. Weil das Wetter im August sehr trocken war, ist die Ausbeute mikroskopischer Pilze nicht groß gewesen.

Uredineen:

1. *Chrysoomyxa rhododendri* (D.C.) de Bary.

Dieser Pilz ist heteröcisch und die Aecidien werden auf den Nadeln von *Picea Abies* L. gebildet, während Uredo- und Teleutosporenlager auf den Blättern von *Rhododendron ferrugineum* L. gefunden werden. Es war möglich, Uredolager nachzuweisen und die Aecidien waren in so großer Anzahl zu finden, daß man in dem Voldertal von einem bedeutenden Befall sprechen konnte.

Klebahn schreibt: „Die Aecidiosporen infizieren die *Rhododendron*-Blätter, es entstehen Uredolager oder überwinterndes Mycel, an welchem im Frühjahr die Teleutosporenlager reifen. Die Teleutosporen keimen im Frühjahr etwas vor oder während der Blütezeit der Alpenrosen; die Sporidien infizieren die gleichzeitig aus der Winterknospe hervorbrechenden jungen Fichtennadeln.“

2. Die Gattung *Coleosporium* Léveille.

Aus dieser Rostpilzgattung wurden folgende Spezies gesammelt. Sie sind alle heteröcisch.

a) *Coleosporium melampyri* (Reb.) Kleb.

In der Umgebung von Fritzens war dieser Pilz sehr verbreitet. Er wurde als Uredo- und Teleutosporenlager auf *Melampyrum*-Species beobachtet. Klebahn hat nachgewiesen, daß der Pilz Aecidien hervorruft auf den Nadeln von *Pinus silvestris* L. und *Pinus montana* Mill.

b) *Coleosporium campanulae* (Pers.) Lév.

Auf den Blättern von *Campanula trachelium* L. war dieser Rostpilz ziemlich allgemein in der Umgebung von Fritzens. Es wurden Uredo- und Teleutosporenlager gefunden. Der Pilz gehört wahrscheinlich zur *forma specialis trachelii* Kleb. Auch diese *Coleosporium*-Art vermag Aecidien auf Nadeln von *Pinus*-Arten zu bilden.

c) *Coleosporium tussilaginis* (Pers.) Kleb.

Auf den Blättern von *Tussilago* mit Uredolagern in der Umgebung von Fritzens.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Pilzkunde](#)

Jahr/Year: 1953

Band/Volume: [21_15_1953](#)

Autor(en)/Author(s): Oppermann Adolf

Artikel/Article: [Über Antibiotika aus Pilzen und ihre Gewinnung in der Industrie 3-7](#)