

# Zur kulturellen Gewinnung von Penicillin

Autor(en): **Ettlinger, L.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **56 (1946)**

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-39774>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Zur kulturellen Gewinnung von Penicillin.

Von *L. Ettliger*.

(Aus dem Institut für spezielle Botanik der  
Eidg. Technischen Hochschule in Zürich)

Eingegangen am 25. November 1946.

In der Zeit von 1942 bis 1945 hatte ich die Aufgabe, im Institut für spezielle Botanik der E. T. H. (Prof. Dr. E. G ä u m a n n) Roh-Penicillin herzustellen und Aktivitätsgehalte zu bestimmen für chemische Untersuchungen, die im organisch-chemischen Institut der E. T. H. (Prof. Dr. L. R u z i c k a) unter Leitung von Prof. Dr. Pl. A. P l a t t n e r durch die Herren Dr. L. H. W e r n e r, Dr. Ch. F. C r a m e r und Dr. W. S c h l e g e l ausgeführt wurden<sup>1</sup>. Diese Versuche waren nicht zur Veröffentlichung bestimmt, sollen nun aber als biologischer Teil eine Einleitung und Ergänzung zu den chemisch orientierten Publikationen von S c h l e g e l (im Druck) und C r a m e r (im Druck) bilden. Es sei dabei gleich zu Anfang bemerkt, daß sich der Erfolg unserer Arbeit nicht mit dem messen kann, was auf dem Gebiete der Penicillingewinnung in England und Amerika, z. T. in einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit von bisher unbekanntem Ausmaßen, geleistet worden ist. Wenn viele Befunde schon zu ihrer Zeit durch englisch-amerikanische Publikationen überholt waren, so möge man uns die durch den Krieg bedingte Abschließung von der Umwelt zugute halten.

Die Literaturangaben sind auf das Notwendigste beschränkt; im übrigen sei auf die bekannten Übersichtsreferate wie z. B. P l a t t n e r (1945), W e t t s t e i n (1944) und W e t t s t e i n und A d a m s (1945) verwiesen.

### 1. Penicillinbildende Stämme.

In der Anfangszeit verwendeten wir ausschließlich einen Stamm P 2, der im Hygieneinstitut der Universität Zürich (Prof. Dr. H. M o o s e r) von Herrn Dr. M y l o n isoliert worden war. Morphologisch und physiologisch zeigte er größte Übereinstimmung mit dem Fleming-Stamm, von dem wir später eine Abimpfung erhielten. Einen produktiveren Stamm ETH 1274 isolierten wir anfangs 1944 aus einer zufälligen Labo-

<sup>1</sup> Die Forschungskosten wurden weitgehend von der Firma Ciba AG., Basel, getragen. Eine Laboratoriumshilfe stand mir zunächst halbtägig, ab 1944 ganztägig zur Verfügung. Frau Y. H e n z i, Frl. Y. M o r f und Frl. N. H e d i g e r sei auch an dieser Stelle für ihre Mitarbeit bestens gedankt.

ratoriumsverunreinigung; seine Kulturen sind durch helle, fast weiße Farbe und geringes Sporenbildungsvermögen ausgezeichnet (Abbildung 1). Er gehört, wie auch Stamm P 2, zu der Art *Penicillium notatum* Westling. Im Juli 1945 erhielten wir durch die American Type Culture Collection die beiden Stämme NRRL 1249 B 21 (für Oberflächenkultur) und NRRL 832 (für Tauchkultur). Tabelle 1 gibt einen Vergleich in Ober-

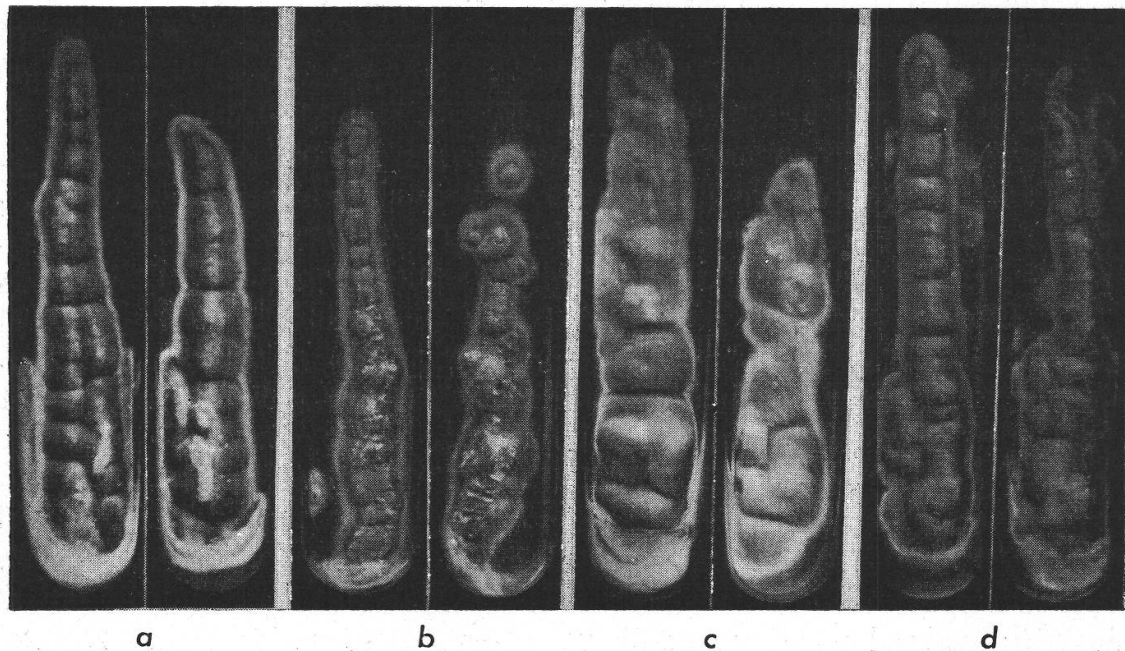


Abbildung 1.

Schrägagarkulturen von 4 Stämmen der Gattung *Penicillium notatum* Westl. mit deutlich erkennbaren Unterschieden im makroskopischen Aussehen.

*a* = NRRL 1249 B 21. *b* = NRRL 832. *c* = ETH 1274. *d* = P 2.

Photograph. Institut E. T. H.

flächenkultur auf verschiedenen Nährlösungen wieder. Das relative Verhältnis ist, wie man sieht, vom Medium abhängig (siehe auch S. 690). Interessanterweise konnten bei der Kleiekultur (siehe unten) keine wesentlichen Unterschiede in der Produktivität dieser vier Stämme festgestellt werden.

## 2. Züchtung auf Nährlösungen.

### a) Methodik.

Versuche für *Oberflächenkultur* wurden in 400-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas mit 100 cm<sup>3</sup> Nährlösung ausgeführt. Für größere Ansätze verwendeten wir daneben 2-l-Fernbachkolben mit 500 cm<sup>3</sup> Füllung. Eine große, gedeckte Wanne und ein Sterilinkubationsschrank erwiesen sich als ungeeignet, vor allem wohl wegen der schlechten Oberflächenbedeckung durch den Pilz. Versuche mit *Tauchkultur* machten wir von

Tabelle 1.  
Züchtung von 4 Stämmen *Penicillium notatum* Westl. in Oberflächenkultur auf 5 Nährlösungen:

Medium <sup>1</sup>	Anzahl Test-tage	Inku-bations-zeit (Tage)	Stamm			
			NRRL 1249 B 21	ETH 1274	NRRL 832	P 2
			Aktivität			
			OE/cc (rel.)	OE/cc (rel.)	OE/cc (rel.)	OE/cc (rel.)
E 15	2	10—14	27 (100)	23 (83)	17 (61)	12 (44)
K 10	5	8—12	39 (100)	38 (97)	29 (75)	13 (34)
K 1	5	11—15	44 (100)	28 (64)	8 (18)	6 (13)
Sch 2	5	8—12	21 (100)	17 (80)	13 (61)	7 (35)
Sch 1	2	10—14	10 (100)	16 (160)	12 (120)	6 (60)

- <sup>1</sup>E 15 = Nährlösung von Cook und Tulloch (1945) mit Preßsaft von 150 g grünen Erbsen pro Liter Nährlösung.  
 K 10 = Gleiches Rezept, aber statt Erbsensaft Kochextrakt von 100 g Weizenkleie pro Liter Nährlösung (vgl. Hirsch 1945, Wettstein 1946).  
 K 1 = Ebenso, aber nur 10 g Weizenkleie pro Liter.  
 Sch 2 = Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Glukose und 2 % Rübenschlempe.  
 Sch 1 = Ebenso mit 1 % Schlempe.

Mai 1943 an zunächst in 5-l-Steilbrustflaschen, dann in 30-l-Korbflaschen und schließlich in Zylinderfässern mit 50 bis 100 l Inhalt. Sie führten uns nicht über die Oberflächenkultur hinaus, weil — wie wir rückschauend feststellen können — die mechanische Durchmischung lediglich mit Hilfe des in großen Blasen durchgeleiteten Luftstromes erfolgte und auch nicht auf Konstanthaltung der Temperatur geachtet wurde.

Geimpft wurde mit trockenen Sporen einer Schrägagarkultur oder mit Sporensuspensionen. Das Wachstum erfolgte im Dunkeln bei 24° C. Jeder Versuch wurde in fünf Parallelen angesetzt, die jedoch nicht einzeln, sondern in Sammelproben untersucht wurden. Für pH-Messungen benützten wir Lyphanpapier-Indikatoren. Das Mycel wurde zur Gewichtsbestimmung mindestens 4 Stunden bei 105° getrocknet.

*Aktivitätstest:* Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität verwendeten wir anfänglich eine Verdünnungsreihenmethode in folgender Ausführung: Durch Übertragen mit einer 1-cm<sup>3</sup>-Pipette von einem Reagensglas zum nächsten in je 1 cm<sup>3</sup> sterile gewöhnliche Nährbouillon wurden von der Testlösung geometrisch steigende Verdünnungen im Verhältnis 1:10, 20, 40 usw. hergestellt. Jedes Röhrchen wurde mit einem Tropfen aus kapillar ausgezogenen Pipetten (zirka 0,01 cm<sup>3</sup> = 1 bis 5 Millionen Bakterien) einer 24stündigen Bouillonkultur von *Staphylococcus aureus* beimpft. Nach Bebrüten über Nacht wurde die höchste Verdünnung mit totaler Hemmungswirkung festgestellt. Dabei betrug die durchschnittliche Streuung der Teste desselben Tages  $\pm 30\%$ .

Schwankungen von einem Tag zum andern, die die täglichen Schwankungen überschritten, glichen wir später aus durch Umrechnung auf ein täglich neu getestetes Penicillin-Standardpräparat von bekannter Aktivität. Ab Mai 1945 gingen wir zu der allgemein üblichen Plattentestmethode über, wobei an Stelle von Zylindern als Flüssigkeitsträger Filterpapierscheibchen von 13 mm Durchmesser (Marke « Uto Blotting ») verwendet wurden (Sherwood, Falco und de Beer 1944, Vincent und Vincent 1944, Ettliger 1946). Jeder Test wurde dabei in vier Einzelbestimmungen ausgeführt und der dem mittleren Durchmesser der Hemmungszonen entsprechende Aktivitätswert an einer durch fünf Konzentrationen des Standardpräparates täglich neu bestimmten Standardkurve (auf halblogarithmischem Netzpapier aufgetragen eine Gerade) abgelesen. Die durchschnittliche Streuung betrug hierbei  $\pm 20\%$ . Genauere Werte mit  $\pm 8\%$  Streuung erhielten wir mit der von der U. S. Food and Drug Administration vorgeschriebenen Versuchsanordnung (Knudsen 1945, Federal Register 1945), die allerdings viermal mehr Arbeit erfordert.

Da wir bis November 1944, als wir die erste amerikanische Penicillinampulle erhielten, keine Möglichkeit hatten, unsere Aktivitätswerte zu eichen und in Oxford-Einheiten (OE) auszudrücken, wählten wir als Einheit « P » die Verdünnungseinheit, d. h. diejenige Aktivitätsmenge, die in 1 cm<sup>3</sup> gelöst gerade noch Totalhemmung bewirkt. Durch Indexbuchstaben (Pa, Pb, Pc usw.) wurde auf die jeweils angewandte Testmethode hingewiesen (vgl. Schlegel l. c.). Durch Vergleich mit dem internationalen Penicillin-Arbeitsstandard, der uns zusammen mit dem Teststamm *Staphylococcus aureus* FDA 209-P im November von der U. S. Food and Drug Administration zur Verfügung gestellt wurde, ermittelten wir ein Umrechnungsverhältnis von 1 OE = 45 P.

#### b) Versuche.

Als Grundlagen dienten uns die Angaben von Clutterbuck, Lovell und Raistrick (1932) und vor allem die klassische Publikation der Oxfordener Arbeitsgruppe (Abraham, Chain u. a. 1941). Nach beiden läßt sich Penicillin gewinnen auf einer modifizierten Czapek-Dox-Nährlösung folgender Zusammensetzung: 40 g Glukose, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O auf 1 Liter destilliertes Wasser.

Wir züchteten *Penicillium notatum* P 2 auf dieser Nährlösung und erhielten aktive Kulturfiltrate, mußten aber bald erkennen, daß die Aktivität nicht von Penicillin herrührte, sondern von einem anderen Stoff, der sich später an Hand der Literatur als die Glukoseoxydase Notatin identifizieren ließ. An Beobachtungen seien erwähnt:

Während des Pilzwachstums sinkt das pH von 4,5—5,0 nach der Sterilisation rasch ab und beträgt nach 8 bis 12 Tagen bei maximaler

Aktivität von 80—320 Verdünnungseinheiten (Test mit Bouillon *ohne* Glukosezusatz) 3,2—3,5; steigt es nach längerer Inkubationszeit (nach zirka 17 Tagen) wieder an, so verschwindet gleichzeitig die Aktivität. Steigende Glukose- oder Saccharosekonzentrationen in der Nährlösung erhöhen Säuregrad und Aktivität. Die optimale Züchtungstemperatur liegt bei 18—21° C. Kulturfiltrate bleiben 9 Monate bei 3° C aufbewahrt voll aktiv. 24stündige Einwirkung von 1—10 % Pepsin im Brutschrank wirkt nicht desaktivierend. Das aktive Prinzip ist empfindlich gegen pH-Änderungen und Erhitzen über 50° C; es läßt sich mit organischen Lösungsmitteln nicht aus dem Kulturfiltrat extrahieren (Schlegel l. c.) und wird durch Seitzfilter zurückgehalten. Die Wirkung ist bakterizid (höchste totalhemmende Testverdünnung nach 16 Stunden praktisch steril) und von der Bakterienzahl abhängig (Totalhemmung 1 : 250 bei Einsaat von 3 Millionen Bakterien/cm<sup>3</sup>; 1 : 70 bei 15 Millionen/cm<sup>3</sup>).

Als wichtigsten Unterschied gegenüber den Literaturangaben betrachteten wir den geschilderten pH-Verlauf in der Stoffwechsellösung. Nach Abraham, Chain u. a. (l. c.) beträgt nämlich das pH nach der Sterilisation 6,0, sinkt kurz ab, beginnt am dritten Tag wieder zu steigen und erreicht Werte von 7,0—8,0 zur Zeit der maximalen Aktivität nach 7—12 Tagen.

Wir versuchten nun vergeblich, zu aktiven *neutralen* Kulturfiltraten zu gelangen durch verschiedene Modifikationen der Nährlösung wie: Zugabe des Extraktes verschiedener Hefepräparate, Brunnenwasser statt destilliertem Wasser, zehnfache Phosphatpuffermenge, nachträgliche Zugabe sterilisierter Lauge (Abraham, Chain u. a. l. c.), Zugabe alten Kulturfiltrats (Challinor 1942), Ersatz von KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> durch K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Zugabe einzelner Spurenelemente wie B und Mn oder ganzer A—Z-Lösung nach Hoagland. Einen ersten Erfolg hatten wir schließlich durch Verwendung unseres sehr harten Leitungswassers oder destillierten Wassers mit 2 g/l CaCO<sub>3</sub> oder K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, wenn gleichzeitig die Zuckerkonzentration der Nährlösung von 4 % auf 2 % (Rohrzucker oder Glukose) herabgesetzt wurde. Dabei mußte aber eine Verzögerung des Pilzwachstums in Kauf genommen werden, die Penicillinausbeuten waren sehr gering (0,5—3 OE/cm<sup>3</sup> bei pH 7,5—8,5 nach 13—20 Tagen) und schwankend von einem Ansatz zum andern.

Auf einen gangbaren Weg brachte uns erst eine zufällige Beobachtung, die wir Anfang 1943 bei Vorversuchen für eine Arbeit des agrilkulturchemischen Instituts über den biologischen Abbau von Zellulose und Eiweiß im Boden machten. Wir suchten zelluloseabbauende Schimmelpilze und züchteten u. a. *Penicillium notatum* P 2 auf Nährlösungen, denen Watte, Filterpapier oder Holzschliff beigegeben waren. Dabei zeigte sich nicht nur eine deutliche Wachstumsförderung durch diese Zusätze, sondern auch eine in dem gesuchten Sinne regulierende Wirkung auf die Wasserstoffionenkonzentration der Stoffwechsellösung.

Gleiche Effekte waren auch mit wässrigen Auszügen zu erreichen oder schließlich mit einer « Holzwürze » (von der Holzverzuckerungs AG. Ems), die wir nun einprozentig für größere Ansätze verwendeten. Auf die Zugabe neutralisierender Substanzen wie Kalk oder Trikaliumphosphat mit ihrer wachstumsverzögernden Wirkung konnte dabei verzichtet werden; nach 6—8 Tagen ernteten wir regelmäßig Kulturfiltrate mit pH zwischen 7,0 und 8,0 und einer Aktivität von zirka 4 OE/cm<sup>3</sup>, die sich total als Penicillin extrahieren ließ (Tabelle 2, Abbildung 2).

Tabelle 2.

Aktivität, pH und Mycelgewicht im Verlauf des Wachstums von Stamm P 2 in Oberflächenkultur auf Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Glukose; Einfluß des Extrakts von 30 g Watte pro Liter Nährlösung.

Inkubationszeit (Tage)	Mit Watteextrakt			ohne Zusatz		
	Aktivität OE/cc	pH	Mycelgewicht mg/Kolben	Aktivität OE/cc	pH	Mycelgewicht mg/Kolben
3	0,1	5,2	212	0,0	4,4	209
4	0,6	6,1	384	0,0	4,0	310
5	1,9	6,4	549	0,0	3,7	405
6	3,0	6,9	695	0,2	3,8	439
7	4,0	7,3	711	0,6	3,7	457
8	4,0	7,5	699	0,5	3,5	531
9	3,9	7,6	691	0,0	3,6	485

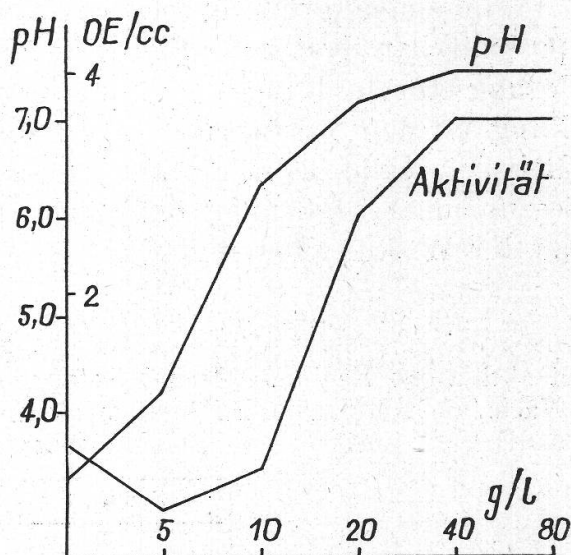
Nachdem somit erwiesen war, daß gewisse Zusätze zur Czapek-Dox-Nährlösung erforderlich sind, um mit dem Stamm P 2 überhaupt Penicillin zu gewinnen, versuchten wir auf verschiedenen Wegen, die Ausbeute zu erhöhen :

- a) durch Steigerung der Zuckerkonzentration bei gleichzeitiger Verwendung von Watte, Holzwürze u. dgl. Dies war nicht möglich, da bei Konzentrationen von mehr als 2 % Glukose oder Saccharose die pH-regulierende Wirkung nicht mehr ausreichte, um die Entstehung sauren Kulturfiltrats und damit die Bildung von Notatin statt Penicillin zu verhindern;
- b) durch höhere Dosierung der Zusatzstoffe. Auch dies brachte keine Ertragssteigerung, da von einer gewissen Konzentration an die Wirkung auf pH und Aktivität zwar zunächst konstant blieb, das Wachstum des Pilzes aber erschwert wurde. Mit Holzwürze z. B. setzte die Förderung der Penicillinbildung etwa bei 0,5 % ein und erreichte ihr Optimum bei 1 %; bei 10 % vermochte der Pilz nur noch einen Teil der Nährlösungs-Oberfläche zu bedecken (für Watteextrakt vgl. Abbildung 2);
- c) durch Auffindung anderer Naturstoffe mit stärkerem Förderungsvermögen auf die Penicillinbildung. Diese Aufgabe wurde uns weit-

gehend von den Mitarbeitern der Ciba-Forschungslaboratorien in Basel abgenommen, wo Herr Dr. Wettstein gute Erfolge erzielte mit Schotte, Rübenschlempe, Kleieextrakten u. a. (Wettstein 1946);

- d) durch Isolierung des oder der für die Wirkung von Watte usw. verantwortlichen Stoffe. Dabei hofften wir, eine Trennung der für die Penicillinbildung fördernden von den wachstumshemmenden Faktoren zu erreichen. (Außerdem strebten wir eine synthetische Nährlösung an, auf die man jederzeit zurückgreifen konnte. Es traten nämlich öfters Störungen unserer kleinen Produktion dadurch auf, daß bewährte Handelsprodukte unter den Kriegsverhältnissen bei erneutem Bedarf nicht mehr in der gleichen Qualität erhältlich waren. Schließlich enthielt z. B. die lange Zeit als Zusatz verwendete Rübenschlempe viele Ballaststoffe, die eine Aufarbeitung des Penicillins zu reinen Präparaten erschwerten.)

Abbildung 2.  
Aktivität und pH nach 7 Tagen Wachstum von Stamm P 2 auf Czapek-Dox-Nährlösung mit 2% Glukose; Wirkung geometrisch steigender Gaben von Watteextrakt. Abszisse: Watteextrakt, berechnet auf g Watte pro Liter Nährlösung. Ordinaten: linke Skala pH, rechte Skala Aktivität in Oxfordeinheiten pro cc Kulturfiltrat.



Für diese Untersuchungen verwendeten wir rohe Verbandwatte, da sie, im Vergleich mit andern Zusatzstoffen, ein relativ reines, standardisiertes Produkt darstellte und ihre Extrakte auch in Überdosierung am wenigsten wachstumshemmend wirkten. Ferner war uns bekannt, daß nach Schopfer und Rytz (1937) rohe, unentfettete Watte einen Wuchsstoff enthält.

Als erstes versuchten wir den Watteextrakt, um zu prüfen, ob die beobachtete Wirkung auf organische oder anorganische Bestandteile zurückzuführen sei. Es zeigte sich dabei, daß der «pH-Aufschwung» und damit auch — wenn nicht ganz, so doch zu einem großen Teil — die Förderung von Mycelwachstum und Penicillinbildung durch den Aschen-



anteil (= 0,4 % der Watte oder 20 % des Wasserextraktes) ausgelöst wird (Tabelle 3). Was wir zunächst suchten war also nicht ein organischer Wuchsstoff, sondern etwas Anorganisches, ein Spurenelement.

Tabelle 3.

Vergleich zwischen Watteextrakt und seiner Asche als Zugabe zu Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Glukose für Oberflächenkultur mit Stamm P 2. Die Zusätze entsprechen 25 g Watte pro Liter Nährlösung.

Zusatz	Inkubationszeit in Tagen						
	6		7		8	9	
	OE/cc	pH	OE/cc	pH	Mycelgewicht mg/Kolben	OE/cc	pH
Watteextrakt	3,5	7,4	4,5	7,4	682	4,0	7,9
Watteextrakt verascht	1,0	7,2	2,5	7,2	578	4,0	7,6

In einem größeren Serienversuch testeten wir 42 Elemente des periodischen Systems in je 6 Konzentrationen von 1  $\gamma$  — 100 mg/l Nährlösung einzeln durch, konnten aber bei keinem die pH-regulierende Wirkung auf den Stoffwechsel von *Penicillium notatum* P 2 feststellen. (Als Beispiel sei in Tabelle 4 der Versuch mit Zn angeführt.) Es war somit anzunehmen, daß nicht ein Element allein, sondern zwei oder mehrere an der Wirkung beteiligt sind.

Tabelle 4.

Reaktion des Mediums (Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Glukose) nach 7tägigem Wachstum von Stamm P 2 in Oberflächenkultur bei Zusatz von Zink in steigenden Konzentrationen.

ZnSO <sub>4</sub> g/l	pH
10 <sup>-1</sup>	4,1 *
10 <sup>-2</sup>	4,1 *
10 <sup>-3</sup>	4,8
10 <sup>-4</sup>	4,1
10 <sup>-5</sup>	3,8
10 <sup>-6</sup>	3,5
—	3,5

\* Wachstumshemmung.

Als nächster Anhaltspunkt dienten uns nunmehr die Untersuchungen von Nielsen und Mitarbeitern über den Einfluß von Filterpapier auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Nach diesen Autoren läßt sich ein Wuchsstoff synthetisch herstellen durch längeres Autoklavieren eines Zuckers mit einer organischen Säure oder deren Salzen, zum Beispiel,

nach Nielsen und Hartelius (1936), durch Erhitzen einer wäßrigen Lösung von 1 % Glukose und 1 % Ammontartrat während 50 Minuten auf 135° C; dieser « synthetische Wuchsstoff B », 10prozentig der Nährlösung zugesetzt, kommt aber erst zur Wirkung in Gegenwart von « Co-Wuchsstoff », als welcher Filterpapier oder dessen Asche oder schließlich ein aus ihr halb analytisch halb empirisch abgeleitetes Gemisch von 10 Metallchloriden in verschiedenen Mengenanteilen, nämlich Cd, Ba, Sr, Hg, Ca, Li, Be, Zn, Cu und Mn (Nielsen und Fang, 1937) fungieren kann.

« Synthetischer Co-Wuchsstoff » vermochte in unseren Versuchen die Watteextrakt-Asche nicht zu ersetzen, und zwar gleichgültig, ob « synthetischer Wuchsstoff B » dazu verabreicht wurde oder nicht.

Wir begannen daher, in engster Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des organisch-chemischen Laboratoriums, eine Fraktionierung der Watteextrakt-Asche, wobei im Test hauptsächlich auf das pH der Stoffwechsellösung abgestellt wurde. Wirkungsverluste waren dabei von Anfang an nicht zu vermeiden. Von den wirksamsten Fraktionen wurden schließlich Funkenspektren aufgenommen und mit den darin festgestellten Elementen in ziemlich willkürlich gewählten Quantitäten Mischungen bereitet. Der Gang dieser Untersuchung ist ausführlich bei Schlegel (l. c.) dargestellt. Erfolgreich war ein Gemisch aus Verbindungen von Ca, Si, Be, Ni und Zn. In einem Serienversuch, bei dem je ein Element oder mehrere zugleich ausgelassen wurden, ergab sich, daß *alle* Kombinationen mit Zn und *nur* diese Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration der Stoffwechsellösung ausübten. Wir schlossen daraus, daß Zn der gesuchte pH-Regulator sei, einzeln jedoch wegen seiner Giftigkeit nicht zur Geltung komme (Tabelle 4), und daß die beigegebenen andern Elemente wahrscheinlich entgiftend wirken.

Da unsere Mischung zehnmal mehr Zn enthielt, im übrigen aber stark an den « synthetischen Co-Wuchsstoff » erinnerte, versuchten wir es noch einmal mit diesem Rezept, aber in zehnfacher Konzentration, und fanden es dem unsrigen überlegen. In Kombinationsversuchen mit den einzelnen Bestandteilen der Mischung stellten wir fest, daß neben Zn auch Cu unentbehrlich ist, während die übrigen acht Elemente nach unseren Kriterien (pH und Aktivität) ebensogut weggelassen werden konnten. Optimale Wirkung erreichten wir durch Zugabe von 5 mg ZnSO<sub>4</sub> und 2 mg CuSO<sub>4</sub> pro 1 Nährlösung (Tabelle 5)<sup>1</sup>.

Als nächsten Schritt setzten wir der Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Saccharose neben dem auf Zn und Cu reduzierten Co-Wuchsstoff nun auch « synthetischen Wuchsstoff B » nach Nielsen und Har-

<sup>1</sup> Diese Versuche gelangten im April 1944 zum Abschluß. Im Mai erfuhren wir durch die Squibb-Referate (Squibb & Sons 1943), daß Foster (1943) schon längst auf die Bedeutung von Zn und anderen Spurenelementen für die Penicillinbildung hingewiesen hatte.

telius (l. c.) in Form einer hocherhitzten einprozentigen Glukose-Ammoniartratlösung zu. Damit erreichten wir nun endlich eine zum Teil beträchtliche Erhöhung der Penicillinausbeute. Unbehandelte Lösungen wirkten aber ebensogut wie hocherhitzte, ja wenn Ammoniartrat allein als Seitz-filtrierte Lösung dem sterilisierten Medium nachträglich beigegeben wurde, tat es dieselben Dienste. Unsere Versuche lassen daher keinen Schluß auf die Wuchsstoffeigenschaften derartiger Lösungen zu <sup>1</sup>.

Tabelle 5.

Aktivität, pH und Mycelwachstum zweier Stämme nach 7 Tagen in Oberflächenkultur auf Czapek-Dox-Nährlösung mit 2 % Rohrzucker, Zn und Cu; mit und ohne Zusatz der optimalen Menge Ammoniartrat.

Stamm	Ammoniartrat g/l	Aktivität OE/cc	pH	Mycelgewicht mg/Kolben
P 2	—	3,5	7,5	756
	0,5	8,0	7,5	780
ETH 1274	—	1,5	7,3	560
	8,0	24,0	7,0	738

Das Konzentrationsoptimum der Ammoniartrat-Beigabe gestaltete sich je nach dem verwendeten Stamm verschieden : P 2 lieferte maximal 8 OE/cm<sup>3</sup> bei 0,5—1 g/l Ammoniartrat, während ETH 1274 bei 8 g/l Ammoniartrat ein Optimum von 20—24 OE/cm<sup>3</sup> erreichte (Tabelle 5). Dieser Befund ließ sich in wiederholten Ansätzen und auch in größeren Kulturgefäßen verifizieren <sup>2</sup>.

### 3. Züchtung auf Kleie.

Auf die Methode der Kleiekultur zur Gewinnung von Penicillin wurden wir im Herbst 1944 durch ein Übersichtsreferat von C o g h i l l (1944) aufmerksam. Sie besteht darin, daß der Pilz auf einem Brei feuchter, sterilisierter Kleie in flacher Schicht oder in rotierenden Trommeln gezüchtet wird; nach 2—4 Tagen Wachstum lassen sich aus der verschimmelten Kleie 200—400 OE/g (bezogen auf trockene Kleie) extrahieren. Da wir schon in unseren ersten Versuchen die von C o g h i l l angegebene Produktionshöhe erreichten, und da uns für die Kultur auf Nährlösungen kein Corn steep liquor oder ein gleichwertiger

<sup>1</sup> Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, daß Dr. W e t t s t e i n aus der autoklavierten Glukose-Ammoniartrat-Lösung große Mengen von Weinsäure-monoammoniumsals kristallin isolieren konnte (Analyse) und daß diese in seinen Versuchen bessere « Wuchsstoff »-Wirkung hatte als freie Weinsäure oder Weinsäure-diammoniumsals.

<sup>2</sup> Eine teilweise Bestätigung erhielten wir auch hier nachträglich durch die Arbeit von C l a y t o n, H e m s u. a. (1944). Vgl. a. W e t t s t e i n (1946).

Ersatz zur Verfügung stand, und da schließlich während des Krieges bei uns Kleie leichter erhältlich war als Zucker, konzentrierten wir in der Folgezeit unsere Bemühungen allein auf die Ausarbeitung dieser Methode; nach einem halben Jahr konnten wir die Versuche im Rahmen unserer Laboratoriumsmöglichkeiten als abgeschlossen betrachten. Bestätigungen eigener Befunde lieferten uns hier die Publikationen von Rao (1944) und van Winkle und Herwick (1945).

Kleinere Versuche führten wir in 400-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyern aus, die mit 10 g Weizenkleie und 15 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit beschickt und täglich zweimal kräftig geschüttelt wurden.

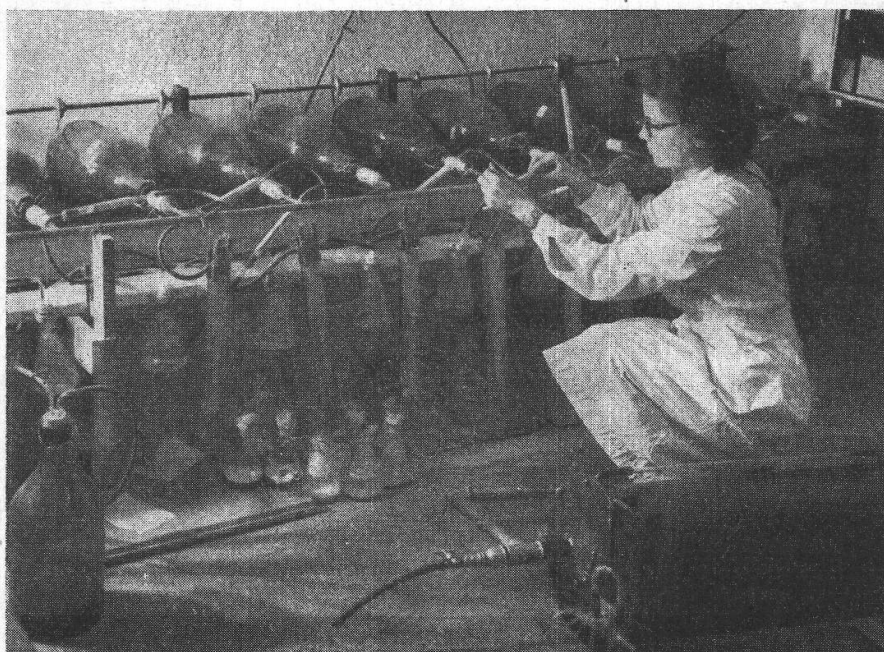


Abbildung 3.

Apparatur für die Kleiekultur. Die Flaschen rotieren auf zwei mit Gummirollen versehenen Achsen, die durch ein Vorgelege angetrieben werden. Sterilisierte, befeuchtete Luft (Wattefilter, Waschflaschen) tritt durch ein zentral gelagertes Glasrohr in die Flaschen-Rotoren ein und verläßt sie durch einen wattedichteten Vorstoß.

Photopreß.

Mit einer Apparatur (Abbildung 3) für 5-l-Glasflaschen als Rotoren<sup>1</sup>, gefüllt mit 300 g Kleie, untersuchten wir zunächst den Einfluß zweier Faktoren: die *Umdrehungsgeschwindigkeit* (Abbildung 4) und die benötigte *Luftmenge* (Abbildung 5).

Beim Übergang zu zehnmal größeren Gefäßen<sup>1</sup>, wofür auf Anregung von Prof. G ä u m a n n gewöhnliche Milchkanen aus Aluminium mit 3 kg Kleiefüllung verwendet wurden (Abbildung 6), machte sich die

<sup>1</sup>Für den Bau der Apparate sind wir Herrn Adjunkt A. Meiler vom Maschinenbaulaboratorium der E. T. H. zu Dank verpflichtet.

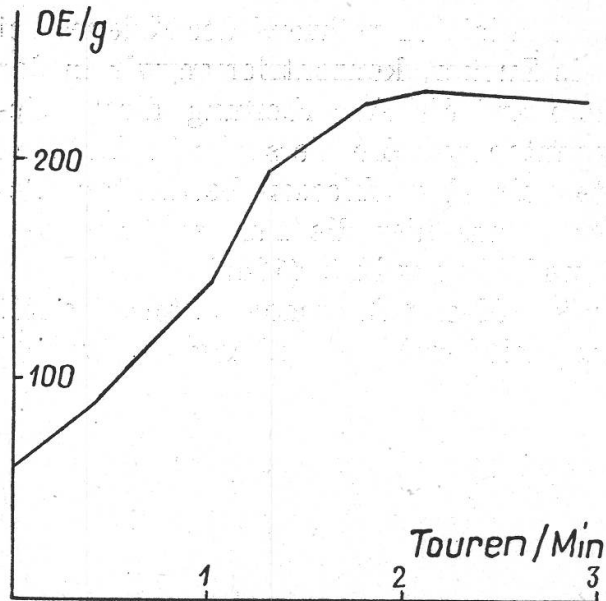


Abbildung 4.  
 Penicillinbildung durch Stamm P 2 auf Kleie mit Wasser in rotierenden Flaschen bei verschiedenen Tourenzahlen. Abszisse: Umdrehungsgeschwindigkeit in Touren/Minute. Ordinate: Aktivität nach 64 Stunden in Oxfordeinheiten pro g trockene Kleie.

während der Gärung entstehende *Oxydationswärme* störend bemerkbar. Ohne Kühlung erhitzen sich die Kannen bereits in den ersten 14 Stunden auf Temperaturen bis zu 36°, bei denen das Pilzwachstum zum Stillstand kommt. Selbst kurzdauernde Überschreitungen der Optimaltemperatur von 24° C um nur wenige Grade hatten beträchtliche Ertrags-einbußen zur Folge, wobei in der Abluft Ammoniak nachzuweisen war. Um die überschüssige Wärme abzuleiten, berieselten wir die Kannen oberflächlich mit Wasser, dessen Menge nach Maßgabe einer mit eingebauten Thermoelementen ständig durchgeführten Temperaturkontrolle von Hand reguliert wurde.

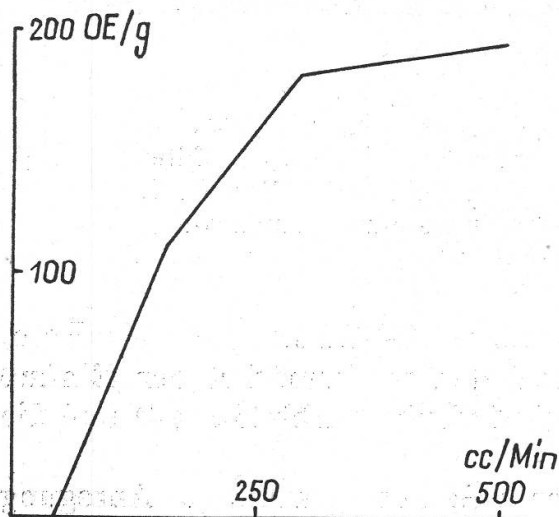


Abbildung 5.  
 Penicillinbildung durch Stamm P 2 auf Kleie mit Wasser in rotierenden Flaschen bei verschieden starker Belüftung. Abszisse: Stärke des Luftstroms in cc pro Minute pro Flasche. Ordinate: Aktivität nach 64 Stunden in Oxfordeinheiten pro g trockene Kleie.

Es zeigte sich dabei, daß der oben erwähnte Einfluß der Umdrehungsgeschwindigkeit eine reine Temperaturfrage darstellt: mit konstant gehaltener Gärungstemperatur war im Bereich von  $\frac{1}{2}$  bis 8 Um-

drehungen pro Minute kein Unterschied im Penicillinertrag mehr zu beobachten. Die Abhängigkeit der Penicillinbildung von der Menge der durchgeleiteten Luft blieb dagegen in gleichem Maße wie bei den Flaschenrotoren bestehen, da diese nicht der Kühlung dient, sondern vollauf zur Atmung des Pilzes benötigt wird.

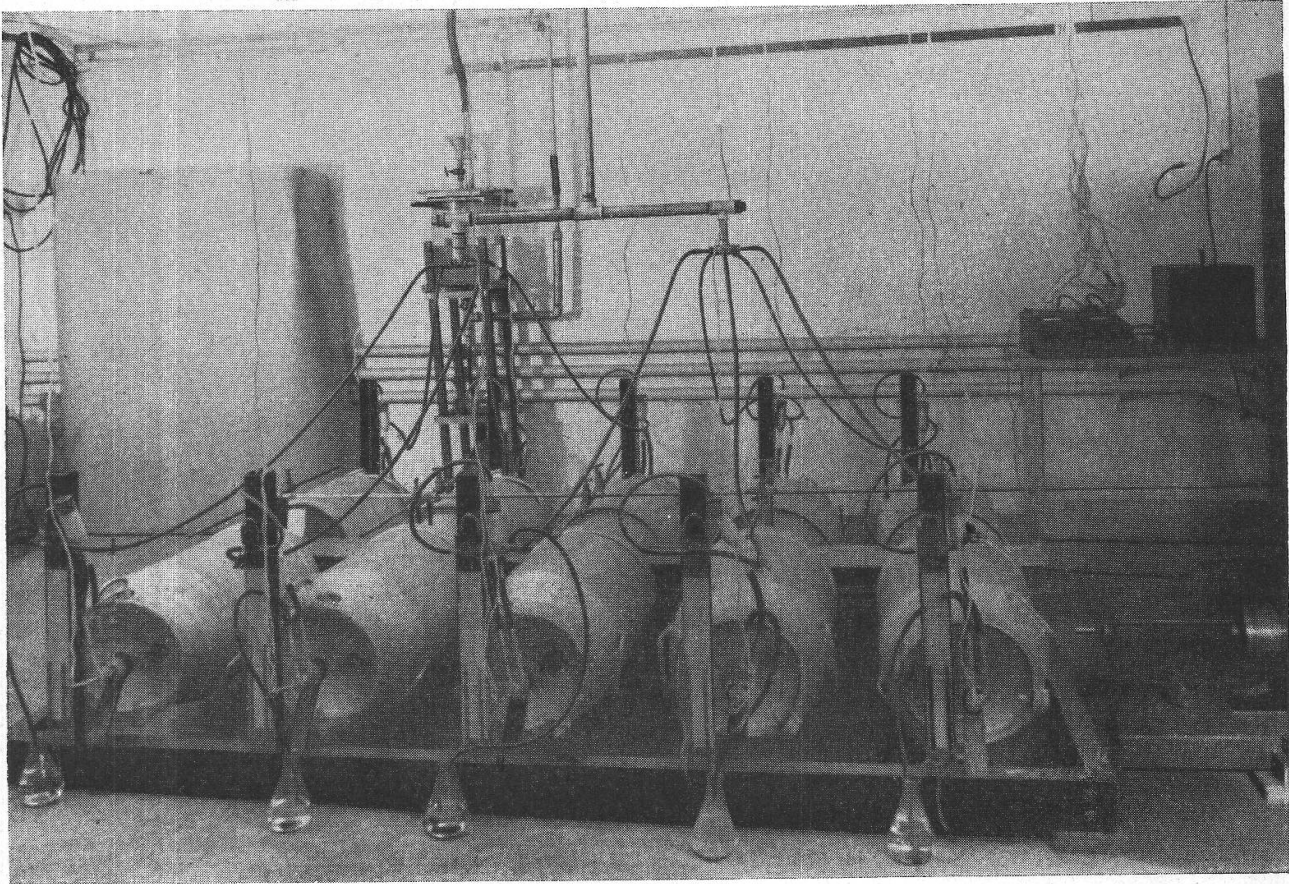


Abbildung 6.

Apparatur für Kleiekultur. Die rotierenden Milchkanen von 40 Liter Inhalt sind axial gelagert und angetrieben. Etwa 10 cm über jeder Kanne ist eine Wasserleitung zur Berieselung sichtbar. Rechts hinten Galvanometer und Schalttafel mit den Kabelenden der Thermoelemente. Links hinten die Luftbefeuchtung.  
Photogr. Institut E. T. H.

Eine Verdoppelung der Penicillinausbeute erreichten wir schließlich durch Befeuchten der Kleie mit einer zuckerfreien, vierfach konzentrierten Czapek-Dox-Nährlösung statt mit destilliertem Wasser. Auf diese Weise wurden innerhalb 64 Stunden 400—450 OE/g trockene Kleie als Serierendurchschnitte mehrerer Ansätze zu je 10 Kannen gewonnen.

(Nach Mitteilung von Herrn Dr. Wettstein sind mit dieser Methode in Basel neuerdings in noch kürzerer Zeit wesentlich höhere Penicillinausbeuten erhalten worden.)

### Zusammenfassung.

1. Es wurde ein Stamm *Penicillium notatum* isoliert, der auf einer synthetischen Nährlösung, bestehend aus Czapek-Dox mit 2 % Rohrzucker, 0,8 % Ammontartrat sowie Spuren von Zn und Cu, in 7 Tagen 24 OE/cm<sup>3</sup> Penicillin bildete.
2. Es wurde eine Laboratoriums-Apparatur erstellt, die mit einem Medium aus Weizenkleie, Wasser und anorganischen Salzen in einem Arbeitsgang von 3 Tagen bis zu 13,5 Millionen OE Penicillin lieferte.

### Zitierte Literatur.

- Abraham, E. P., Chain, E., Fetcher, C. M., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G. and Jennings, M. A., 1941. Further observations on penicillin. (Lancet, **241**, 177—188.)
- Challinor, S. W., 1942. Production of penicillin. (Nature, **150**, 688.)
- Clayton, J. C., Hems, B. A., Robinson, F. A., Andrews, R. D. and Hunwicke, R. F., 1944. Preparation of penicillin. Improved method of isolation. (Biochem. J., **38**, 452—458.)
- Clutterbuck, P. W., Lovell, R. and Raistrick, H., 1932. The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin — the antibacterial substance of Fleming. (Biochem. J., **26**, 1907—1918.)
- Coghill, R. D., 1944. Penicillin, science's Cinderella. (Chem. Eng. News, **22**, 588—593.)
- Cook, R. P. and Tulloch, W. J., 1945. Green pea juice as a medium for the production of penicillin. (Nature, **155**, 515.)
- Cramer, Ch. F., Diss. E. T. H., im Druck.
- Ettlinger, L., 1946. Zur Prüfung von Penicillinsalben. (Pharm. Acta Helv., **21**, 214—216.)
- Federal Register, 1945. Tests and methods of assay for antibiotic drugs. Penicillin. (F. R. Sept. 8, 1945, 11 478—11 485.)
- Foster, J. W., 1943. Microbiological aspect of penicillin formation. (J. Bact. **45**, 65.) Dch. Squibb & Sons, 1943, Nr. 86.
- Hirsch, J., 1945. Penicillin-Studien in vitro. (C. r. ann. arch. Soc. Turque Sci. Phys. Nat., **12**, 1—88.)
- Knudsen, Lila, F., 1945. Penicillin assay. (Science, **101**, 46—48.)
- Nielsen, N. und Fang, Sing-Fang, 1937. Vergleichende Untersuchungen über die Wuchsstoffwirkung auf verschiedene Arten von Hefe- und Schimmelpilzen. (C. r. trav. Lab. Carlsberg, **22**, 141—154.)
- und Hartelius, V., 1935. Über die Co-Wuchsstoffwirkung einiger Metallmischungen. (Biochem. Z., **276**, 183—185.)
- Plattner, Pl., A., 1945. Penicillin. (Exper., **1**, 167—179.)
- Rao, S. S., 1944. Production of penicillin. (Nature, **154**, 83.)
- Schlegel, W., Diss. E. T. H., im Druck.
- Schopfer, W. H. et Rytz, W. jr., 1937. La ouate comme source de facteur de croissance de microorganisme. (Arch. Microbiol., **8**, 244—248.)

- Sherwood, Marion, B., Falco, Elvira, A. and de Beer, E. J., 1944. A rapid, quantitative method for the determination of penicillin. (*Science*, **99**, 247—248.)
- Squibb & Sons, 1943. Penicillin and other antibiotics produced by microorganisms. Brooklyn, New Brunswick, New York, 1943, 104 S.
- Vincent, J. G. and Vincent, Helen, W., 1944. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 162—164.)
- Wettstein, A., 1944. Penicillin. Experiment und Klinik, eine Gesamtübersicht. (*Schweiz. Med. Wschr.* **74**, 617—625.)
- 1946. Molke und andere Naturstoffe als Substrate für Penicillin bei der Penicillinherstellung. (*Exper.* **2**, 407—408.)
- und Adams, C., 1945. Penicillin. Experiment und Klinik, eine Gesamtübersicht über das neueste Schrifttum. (*Schweiz. Med. Wschr.*, **75**, 613—625.)
- Van Winkle, W. jr. and Herwick, R. P., 1945. Penicillin, a review. (*J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **34**, 97—109.)
-