

Über die Bildung von Ferrichrysin, einem Sideramin aus *Aspergillus melleus* Yukawa, und ihre Verknüpfung mit dem Intermediärstoffwechsel

Autor(en): **Eberle-Haegi, Rose Marie**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **76 (1966)**

PDF erstellt am: **20.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-53576>

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.

Über die Bildung von Ferrichrysin, einem Sideramin aus *Aspergillus melleus* Yukawa, und ihre Verknüpfung mit dem Intermediärstoffwechsel

Von *Rose Marie Eberle-Haegi*

Aus dem Institut für Spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen
Hochschule, Zürich

Manuskript eingegangen am 5. Juli 1966

Einleitung

1. Definition der Sideramine

Ferrichrysin, ein Sideramin aus *Aspergillus melleus* Yukawa (Stamm ETH 2853), gehört zur Stoffgruppe der Siderochrome. Darin wurden ursprünglich Naturstoffe zusammengefasst, welche sich durch Eisengehalt und eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 420 und 440 m μ auszeichneten (Bickel und Mitarb., 1960b; Prelog, 1963a und 1963b; Mikeš und Turková, 1964). Heute sind die Siderochrome chemisch klar umschrieben und definiert als Stoffe biologischen Ursprungs, die in einer Anordnung, welche die Bildung eines Eisen(III)-trihydroxamat-Komplexes erlaubt, drei freie Hydroxamsäuregruppen in einem Molekül vereinigen. Siderochrome mit wachstumsfördernder Wirkung werden als Sideramine, Siderochrome mit wachstumshemmender Wirkung als Sideromycine bezeichnet. In Tabelle 1 sind die bisher isolierten Siderochrome zusammengestellt. Die Gliederung der Sideramine nach ihrer Bildung durch Bakterien, Actinomyceten oder Pilze geht mit Unterschieden im Molekülbau parallel.

2. Vorkommen der Sideramine

Die Sideramine sind ausserordentlich weit verbreitet, doch kommen sie zumeist nur in sehr geringen Mengen vor. Während der Nachweis einer Sideraminwirkung in der Regel leichtfällt, bereitet die Isolierung von Reinsubstanz oft Mühe.

a) Sideramine aus Bakterien

Bei zahlreichen Bakterien – alle den Aerobiern angehörig – konnten Sideraminaktivitäten nachgewiesen werden (Hesseltine und Mitarb., 1953; Lochhead, 1957 und 1958; Cook und Lochhead, 1959; Zähler und Mitarb., 1960; Burnham und Neilands, 1961). Bis dahin ist jedoch

Tabelle 1

Siderochrome (der Veröffentlichung von Keller und Mitarb. [1964] entnommen
und ergänzt [Zähner, 1965])

	Literatur
<i>Sideramine</i> Aus Bakterien: Terregensfaktor Aus Actinomyceten: Ferrioxamine A ₁ , A ₂ , B, C, D ₁ , D ₂ , E, F, G Aus Pilzen: Ferrichrom Ferricrocin Ferrichrysin Ferrirhodin Ferrirubin Coprogen	 (Lochhead und Mitarb., 1952; Lochhead und Burton, 1953a) (Bickel und Mitarb., 1960a und 1960b; Keller und Prelog, 1962) (Neilands, 1952) (Zähner und Mitarb., 1963) (Zähner und Mitarb., 1963) (Zähner und Mitarb., 1963) (Zähner und Mitarb., 1963) (Hesseltine und Mitarb., 1952; Pidacks und Mitarb., 1953)
<i>Sideromycine</i> Aus Actinomyceten: Grisein Albomycin-Gruppe Ferrimycine A ₁ , A ₂ , B Succinimycine Danomycin La 5352 La 5937	 (Reynolds und Mitarb., 1947; Kuehl und Mitarb., 1951) (Gause und Brazhnikova, 1951; Gause, 1955) (Bickel, 1960b und 1960c) (Bickel, 1960b; Haskell und Mitarb., 1963) (Zähner, 1965) (Sensi und Timbal, 1958) (Sensi und Timbal, 1958)
<i>Siderochrome ohne biologische Aktivität</i> Aus Pilzen: Ferrichrom A	 (Garibaldi und Neilands, 1955)

erst ein Sideramin aus Bakterien eingehend untersucht worden, nämlich der Terregensfaktor aus *Arthrobacter pascens*, der von Lochhead und Mitarbeitern (Lochhead und Mitarb., 1952; Lochhead und Burton,

1953a und 1953b; Burton und Mitarb., 1954) erstmals beschrieben worden ist. An dieser Stelle sei noch ein weiteres Stoffwechselprodukt aus Bakterien, das Mycobactin aus *Mycobacterium phlei* (Francis und Mitarb., 1953; Snow, 1954a und 1954b) erwähnt, das den Sideraminen sehr nahe steht, indem es einerseits wachstumsfördernde Wirkung zeigt und andererseits mit Eisen-III-Ionen einen stabilen 1:1-Komplex zu bilden vermag. Da es aber nur zwei Hydroxamsäuregruppen je Molekül enthält, wird es nicht zu den Siderochromen gerechnet.

b) Sideramine aus Actinomyceten

Alle bisher eingehend untersuchten Stämme aus den Gattungen *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* und *Streptosporangium* bilden Sideramine. Dabei ist Ferrioxamin B, in selteneren Fällen auch Ferrioxamin E die Hauptkomponente (Zähner und Mitarb., 1962).

Tabelle 2

Bisher rein dargestellte Sideramine aus Pilzen (aus Keller und Mitarb. [1964])

Art	Gebildetes Sideramin (Hauptkomponente)	Literatur
<i>Penicillium</i> sp.	Coprogen	(Hesseltine und Mitarb., 1952)
<i>P. urticae</i> Bainier	Coprogen	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>P. notatum</i> Westling	Coprogen	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>P. camemberti</i> Thom	Coprogen	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Coprogen	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>P. sp.</i> aus der <i>Citrinum</i> -Reihe	Coprogen	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Neurospora crassa</i> Shear et B.O.Dodge	Coprogen	(Keller und Mitarb., 1964; Padmanaban und Sarma, 1964 und 1965)
<i>Ustilago sphaerogena</i> Burill ex Elis et Everh.	Ferrichrom	(Neilands, 1952)
<i>Aspergillus niger</i> v. Tieghem	Ferrichrom	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Penicillium resticulosum</i> Birkinshaw	Ferrichrom	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Aspergillus melleus</i> Yukawa	Ferrichrysin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>A. terreus</i> Thom	Ferrichrysin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	Ferricrocin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>A. humicola</i> Chaudhuri et Sachav	Ferricrocin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboshi	F'crocin + F'rhodin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>A. nidulans</i> (Eidam) Winter	F'crocin + F'rhodin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Penicillium variabile</i> Sopp	Ferrirubin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Spicaria</i> sp.	Ferrirubin	(Zähner und Mitarb., 1963)
<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier	Ferrirubin	(Zähner und Mitarb., 1963)

c) Sideramine aus Pilzen

Für zahlreiche Pilzstämme verschiedenster Gattungen wie *Aspergillus* (Zähner und Mitarb., 1963), *Chaetomium* (Keller und Mitarb., 1964), *Fusarium* (Lochhead und Cook, 1961), *Giberella* (Keller und Mitarb., 1964), *Glomerella* (Keller und Mitarb., 1964), *Neurospora* (Keller und Mitarb., 1964; Padmanaban und Sarma, 1964 und 1965), *Paecilomyces* (Zähner und Mitarb., 1963), *Penicillium* (Hesseltine und Mitarb., 1952 und 1953; Zähner und Mitarb., 1963), *Saccharomyces* (Burnham und Neilands, 1961), *Spicaria* (Zähner und Mitarb., 1963) und *Ustilago* (Neilands, 1952; Keller und Mitarb., 1964) wurde die Bildung von Substanzen, die als Sideramine wirken, nachgewiesen; bei einigen sogar gelang die Isolierung und Charakterisierung des betreffenden Sideramins (bzw. mehrerer Sideramine): In Tabelle 2 sind alle Pilzstämme, deren Sideramine bisher rein dargestellt wurden, aufgeführt.

Eine eingehende Untersuchung von zahlreichen Stämmen aus der Familie der Aspergillaceen zeigt ferner, dass Sideramine innerhalb dieser Pilzgruppe häufig anzutreffen sind, im Unterschied zu den Sideraminen aus Actinomyceten aber in grösserer Vielfalt vorkommen.

d) Sideramine anderer Herkunft

In verschiedenen Pflanzen (Page, 1952; Lyr, 1953; Zähner und Mitarb., 1960) und Leberextrakten (Lochhead und Burton, 1953b; Hendlin und Demain, 1959; Zähner und Mitarb., 1960) konnten Substanzen, die als Sideramine wirken, nachgewiesen werden, doch liess sich bisher noch keine in reiner Form isolieren.

3. Chemie der Sideramine

Sideramine zeichnen sich durch ihre eisenbindende wie auch wachstumsfördernde Wirksamkeit aus. Den Sideraminen aus Actinomyceten und denjenigen aus Pilzen ist die Art der Eisenbindung in Form eines Trihydroxamat-Komplexes gemeinsam. Alle Sideramine aus Pilzen, die bisher eingehend untersucht worden sind, folgen einem bestimmten Bauplan, während den Ferrioxaminen ein anderes Prinzip zugrunde liegt. In der Sideraminbildung scheint demnach eine Gruppenspezifität vorzuliegen.

a) Bauprinzip der Sideramine aus Pilzen

Emery und Neilands (1959, 1960, 1961) haben wichtige Beiträge zur Konstitutionsbestimmung des Sideramins Ferrichrom und des Siderochroms Ferrichrom A geliefert, während sich Zähner und Mitarbeiter (1963) mit dem chemischen Aufbau einiger weiterer Sideramine aus

Pilzen befassten. In Tabelle 3 sind die Bausteine der Sideramine aus Pilzen zusammengestellt.

Tabelle 3
Bausteine der Sideramine aus Pilzen (aus Keller und Mitarb. [1964])

Sideramin	δ -N-Hydroxyornithin bzw. 2-Amino-5- hydroxylamino- valeriansäure	Serin	Glycin	Carbonsäuren
Ferrichrom	3	—	3	3 Essigsäure
Ferrirococin	3	1	2	3 Essigsäure
Ferrichrysin	3	2	1	3 Essigsäure
Ferrirhodin	3	2	1	3 cis-5-Hydroxy-3-methyl- penten-(2)-säure
Ferrirubin	3	2	1	3 trans-5-Hydroxy-3-methyl- penten-(2)-säure
Coprogen	3	—	—	3 trans-5-Hydroxy-3-methyl- penten-(2)-säure

Ein wesentliches Merkmal der Sideramine aus Pilzen besteht somit darin, dass stets 3 δ -N-Hydroxyornithine gleichzeitig mit 3 Carbonsäuren – entweder Essigsäure oder cis- bzw. trans-5-Hydroxy-3-methyl-penten-(2)-säure – in einem jeden Molekül enthalten sind, welche zur Bildung von 3 freien Hydroxamsäuregruppen, dem charakteristischen Kennzeichen der Siderochrome, führen. Coprogen als einziges kommt mit diesen Bausteinen allein aus, während die andern 5 zusätzlich noch 3 weitere Aminosäuren – Glycin allein oder in Kombination mit Serin – enthalten. Der Aufbau des Pilzsideraminmoleküls aus den einzelnen Bausteinen ist nicht minder charakteristisch als diese selbst; die basischen und sauren Gruppen der Bausteine eines jeden Sideramins sind peptid- und hydroxamsäureartig miteinander verknüpft. Alle sechs Aminosäuren sind in einem cyclischen Hexapeptid angeordnet, während sich die drei Carbonsäuren hydroxamsäureartig an den drei Hydroxylaminogruppen der δ -N-Hydroxyornithine fortsetzen.

Die Sequenz der Aminosäuren im Hexapeptidring ist festgelegt für Ferrichrysin, Ferrirhodin und Ferrirubin, noch nicht aber für Ferrirococin.

Weniger weit fortgeschritten sind die Untersuchungen beim Coprogen. Es wird jedoch vermutet, dass die drei δ -N-Acyl- δ -N-Hydroxyornithinreste – weitere Aminosäurebausteine sind nicht vertreten – im Unterschied zu den übrigen Sideraminen aus Pilzen nicht zu einem Ring, sondern zu einer Tripeptidkette vereinigt sind, die am Aminoende durch eine Acetylgruppe geschützt ist. Noch ist ungewiss, wie der Rest am Carboxylende aussieht; ein solcher Rest muss angenommen werden, da

Coprogen eine neutrale Molekel darstellt, doch liess sich ausser den bereits erwähnten Bausteinen kein weiterer nachweisen, der hiefür in Frage käme.

b) Konstitutionelle Unterschiede innerhalb der Sideramingruppe

Die Sideramine aus Actinomyceten unterscheiden sich in ihren Bausteinen sehr deutlich von denjenigen aus Pilzen (vgl. Tab. 3 und 4).

Tabelle 4

Bausteine der Sideramine aus Actinomyceten (aus Keller und Mitarb. [1964])

Sideramin	1-Amino-5-hydroxyl-amino-pentan	1-Amino-5-hydroxyl-amino-butan	Bernstein-säure	Essigsäure
Ferrioxamin A ₁	2	1	2	1
Ferrioxamin A ₂	1	2	2	1
Ferrioxamin B	3	—	2	1
Ferrioxamin D ₁	3	—	2	2
Ferrioxamin D ₂	2	1	3	—
Ferrioxamin E	3	—	3	—
Ferrioxamin G	3	—	3	—

Während bei ersteren stets 3 1-Amino-5-hydroxylamino-pentane (bzw. das niedrigere Homologe davon) gleichzeitig mit 2 oder 3 Dicarbonsäuren (mit Bernsteinsäure identisch) in einem Molekül vorkommen, weisen letztere statt dessen 3 δ -N-Hydroxyornithine sowie 3 Carbonsäuren auf. Die Ferrioxamine enthalten somit 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan (bzw. das niedrigere Homologe davon), die Sideramine aus Pilzen jedoch δ -N-Hydroxyornithin als wesentlichen Baustein. Diese beiden Bauelemente tragen die Hydroxylaminogruppen, welche die Bildung der charakteristischen Hydroxamsäuregruppen ermöglichen.

Im weitem bestehen ausgeprägte Unterschiede in der Art und Weise der Bausteinverknüpfung. Bei den Actinomyceten sind die essentiellen basischen Bausteine in wechselnder Folge durch Amid- und Hydroxamsäurebindungen mit den sauren derart zu einem Fadenmolekül verknüpft, dass sich am einen Ende eine freie Aminogruppe und am andern ein Acylrest befinden. Die Ferrioxamine D₂ und E liegen zwar als cyclische Verbindungen vor, doch folgen auch sie diesem Bauprinzip. Bei den Sideraminen aus Pilzen hingegen bilden die sechs (im Fall von Coprogen die drei) Aminosäurebausteine ein cyclisches Hexapeptid, in welchem die drei wesentlichen δ -N-Hydroxyornithine unregelmässig angeordnet sind. Während sich bei den Actinomyceten die essentiellen Bausteine gleich-

mässig und durch Bernsteinsäure verknüpft über die Molekülkette bzw. den Molekülring hinweg verteilen, liegen bei den Pilzen alle drei auf der einen Ringhälfte unmittelbar nebeneinander.

4. Beziehungen zwischen Sideraminen und Sideromycinen

Die antibiotisch wirksamen Siderochrome, die Sideromycine (vgl. Tab. 1), konnten bisher nur in Kulturen von Actinomyceten nachgewiesen werden im Unterschied zu den Sideraminen, die ein breites Bildungsspektrum besitzen. Als charakteristisches Merkmal weisen erstere gegenüber Bakterien eine hohe Wirksamkeit auf, zeichnen sich jedoch gleichzeitig durch hohe Resistenzraten aus (ein resistenter Keim auf 10^4 bis 10^5 empfindliche).

Die Sideromycine zeigen mit den Sideraminen eine enge chemische Verwandtschaft, und zwar entweder mit den Sideraminen aus Actinomyceten oder dann mit denjenigen aus Pilzen: Die Ferrimycine und die Succinimycine sind mit ersteren, Albomycin bzw. Grisein – nach Stapley und Ormond (1957) sowie Waksman (1957) handelt es sich dabei um Gemische gleicher Komponenten in verschiedenen Verhältnissen – mit letzteren chemisch nahe verwandt. Albomycin δ_2 , eine der Komponenten von Albomycin bzw. Grisein, besitzt beispielsweise dasselbe Baugerüst wie Ferrichrysin, trägt aber am Glycinbaustein zusätzlich noch eine Seitenkette in Gestalt eines Schwefelsäureesters. Ferrimycin A hingegen steht dem Ferrioxamin B sehr nahe; es unterscheidet sich wiederum nur durch eine zusätzliche Seitenkette. Die gegenseitige Beziehung zwischen Sideromycinen und Sideraminen beschränkt sich nicht allein auf den Molekülbau, sondern äussert sich auch in der biologischen Wirkung: Sideromycine sind kompetitive Antagonisten der Sideramine; sie wirken somit nicht in gleicher, sondern in entgegengesetzter Richtung. Über die Funktion im Stoffwechsel bestehen erst Hypothesen (Zähner und Mitarb., 1962; Knüsel und Nüesch, 1965).

5. Problemstellung

Die chemische Struktur der Sideramine ist weitgehend aufgeklärt. Über die Bedeutung der Sideramine im mikrobiellen Stoffwechsel besteht jedoch noch keine Klarheit. Offen ist auch die Frage, weshalb die eisenfreien Grundkörper der Sideramine bei Eisenmangel in verhältnismässig grossen Mengen in das Medium ausgeschieden werden, wogegen sie bei genügender Eisenversorgung kaum in Erscheinung treten (Zähner und Mitarb., 1962). Im folgenden soll nach den Gründen für dieses besondere Verhalten im Intermediärstoffwechsel gesucht werden.

Methoden

a) Anzucht

Impfmateriel: Malzagarröhrchen, die von *Aspergillus melleus* gleichmässig überwachsen waren und bei einer Temperatur von 8 °C aufbewahrt wurden, dienten als Ausgangskultur. Daraus wurden mit Hilfe einer Impfnadel möglichst kleine Myzelstücke abgetrennt und jeweils zu dritt auf den keimfreien Reisnährboden eines 500-ml-Erlenmeyerkolbens verteilt, der zuvor mit Reiskörnern dünn übersät, dann mit 10 ml destilliertem Wasser versetzt und anschliessend während 20 min bei 1 atü im Autoklav sterilisiert worden war. Die beimpften Reiskolben – rund das Dreifache der erforderlichen Zahl, weil sich der Pilz mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbreitet – wurden für 8 bis 10 Tage in den 27-°C-Raum gebracht, damit der Pilz den Nährboden überwachse und Sporen bilde. Sobald dieses Stadium erreicht war, wurden die günstigsten Kulturen herausgesucht, mit je 200 ml steriler Tween-80-Lösung (0,1 % des Netzmittels) vermischt und sorgfältig geschüttelt, damit einerseits möglichst viele Pilzsporen den Myzelbereich verliessen, das Myzel selbst jedoch intakt blieb. Die sporenhaltige Flüssigkeit wurde nun in ein steriles Zentrifugenglas dekantiert und während 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Die oberständige Flüssigkeit, welche vorab die Verunreinigungen enthielt, wurde entfernt, der sporenhaltige Bodensatz hingegen in 200 ml Kochsalzlösung (0,9 %) aufgeschwemmt. Diese Sporensuspension diente als Impflösung und wurde nur in frischem Zustand verwendet.

Kulturen: Im Unterschied zum Impfmateriel wurden für die eigentlichen Versuche Schüttelkulturen angelegt. Dabei gelangte die folgende Grundnährlösung zur Anwendung:

ZnSO ₄	0,002 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,500 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,000 g
K ₂ HPO ₄	1,000 g
Asparagin	5,000 g
Glukose	20,000 g
dest. H ₂ O	1000,000 ml

Für den 5. Versuch wurde das Grundmedium nach diesen Angaben hergestellt; im 2., 4. und 6. Versuch stand neben Asparagin (5,0 g/l) noch Ornithin (0,1 g/l) als zusätzliche Stickstoffquelle zur Verfügung. Im 3. Versuch wurde die Stickstoffquelle nicht erweitert, sondern gegen andere stickstoffhaltige Verbindungen, wie Glycin, Serin, Alanin, Phenylalanin, Ornithin, Lysin, Glutaminsäure, Asparagin, sek. Ammoniumphosphat oder Calciumnitrat (5,0 g/l), ausgetauscht, und im 6. Versuch geschah sowohl das eine wie das andere. Auch Eisengehalt und Kulturdauer traten als variable Grössen auf.

Für jeden Versuch wurde die Grundnährlösung im grossen hergestellt und nach Zusatz der variablen Mengen von Eisen oder Stickstoffverbindungen in Mengen von 100 ml auf die Erlenmeyergefässe (500 ml) verteilt. Für eine Kulturvariante wurden jeweils 5 Parallelen angesetzt. Die abgefüllten Versuchsgefässe wurden mit Wattestopfen (in Verbandgaze eingewickelt) verschlossen, dann einzeln mit Quadraten aus Aluminiumfolie bedeckt und unmittelbar darauf während 20 min im Autoklav bei 1 atü sterilisiert. Es wurde darauf geachtet, dass kein eisenhaltiges Kondenswasser in die Versuchsgefässe gelangen konnte und die Sterilisationszeit genau eingehalten wurde, damit sich die Glukose des Mediums nicht zersetzte. Im abgekühlten Zustand wurden sie mit der zuvor beschriebenen Sporensuspension beimpft (1 ml Impflösung/100 ml Nährlösung) und anschliessend auf der Schüttelmaschine bei 27 °C inkubiert. Schon nach wenigen Stunden konnte von Auge ein Pilzwachstum als Trübung festgestellt werden, und nach einem Tag bereits hatte der Pilz deutlich erkennbares Myzel in Form von kleinen Kugeln oder Fetzen gebildet und die ursprünglich farblose Nährlösung leicht gelblich gefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit

wurde jede Pilzkultur einzeln am Wasserstrahlvakuum in Myzelteil und Kulturfiltrat aufgetrennt. Die Filterpapiere bildeten das Ausgangsmaterial für die Myzelgewichtsbestimmung (vgl. b). Von jeder Kulturfiltratprobe wurde rund ein Fünftel unmittelbar untersucht und der Rest bei -20°C separat eingefroren (vgl. c bis h).

b) Myzelwachstum

Die Myzelgewichte wurden wie folgt bestimmt: Die Kulturen wurden der Reihe nach einzeln auf das befeuchtete Filterpapier (Schleicher & Schuell Nr. 595, $\varnothing$ 9 cm) einer Porzellannutsche gegeben und am Wasserstrahlvakuum filtriert. Das Pilzmyzel blieb dabei auf dem Filter zurück und wurde anschliessend erst mit rund 100 ml heissem Wasser (60°C) und dann mit wenig Ionentauscherwasser aus der Spritzflasche gewaschen. Die Filterpapiere, die vor Gebrauch für 2 h auf Fliesspapier ausgelegt und dann einzeln eingewogen worden waren, wurden nach erfolgter Filtration wieder auf dieser Unterlage verteilt, während 3 h bei 100°C getrocknet, 2 h bei Raumtemperatur aufbewahrt und unmittelbar darauf gewogen.

c) Sideraminbildung

Die im folgenden beschriebene Nachweismethode erfasst sämtliche Sideramine und im Fall von *Aspergillus melleus* also sowohl Ferrichrysin als auch die als Nebenprodukte auftretenden Sideramine.

Colorimetrische Sideraminbestimmung: Nicht die Kulturfiltrate, sondern Extrakte davon bildeten das Ausgangsmaterial. 5 ml Kulturfiltrat wurden zusammen mit 1 g Kochsalz, 1 ml Eisenchloridlösung ($5\text{ g/l FeCl}_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$) und 10 ml Chloroform-Phenol (1 Volumen- : 1 Gewichtsteil) im Reagenzglas geschüttelt; dies geschah für eine grössere Zahl von Proben (maximal 50) gleichzeitig. Anschliessend wurden die Teströhrchen während 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert, so dass sich eine Trennschicht bildete. Die wässrige Phase wurde am Wasserstrahlvakuum weggesaugt, die verbleibende organische Phase durch ein Faltenfilter gereinigt. Die verschiedenen Chloroform-Phenol-Extrakte wiesen, wenn nebeneinander betrachtet, deutliche Farbübergänge von Gelb bis Rot auf. Diese Rotfärbung kommt durch die Anwesenheit von Eisen-III-trihydroxamatkomplexen zustande und kann somit als Mass für die vorhandene Sideraminmenge dienen. Mittels eines Spektralphotometers liessen sich die unterschiedlichen Rotintensitäten genau feststellen, indem bei einer Wellenlänge von $440\text{ m}\mu$ die Extinktionen der einzelnen Testlösungen gemessen wurden. Unter Zuhilfenahme einer Eichkurve konnten die Messresultate unmittelbar als Sideramingehaltszahlen ausgedrückt werden, bedurften jedoch noch einer Korrektur. Die Sideraminwerte lagen alle etwas zu hoch, weil die Probenextrakte noch Spuren von Verunreinigungen aufwiesen, die bei einer Wellenlänge von $440\text{ m}\mu$ eine zusätzliche Extinktion bewirkten. Die absoluten Werte liessen sich mit Hilfe des Antagonismustests ermitteln.

Biologische Sideraminbestimmung: Der Antagonismustest (Zähner und Mitarb., 1960) baut auf der Wechselbeziehung zwischen Sideraminen und Sideromycinen auf. Er besitzt gegenüber dem optischen Test den Vorteil, dass hier der Sideraminnachweis spezifisch ist und die Nachweisgrenze tiefer liegt. Da der Arbeitsaufwand jedoch wesentlich grösser ist, wurde dieser Test nur angewandt, um colorimetrisch ermittelte Versuchswerte stichprobenartig zu überprüfen und entsprechend zu korrigieren oder um Testproben mit geringem oder scheinbar gar keinem Sideramingehalt nachträglich noch mit einer feinern Methode zu untersuchen. Dabei wurde folgendermassen vorgegangen: Auf Antibiotica-Testplatten mit *Staphylococcus aureus* Rosenbach wurden kreuzweise Papierstreifen, die mit Sideromycin- bzw. Sideraminlösung getränkt waren, gelegt – in der einen Richtung 4 lange Streifen mit Ferrimycin-Standardlösung ($0,01\text{ g/l}$), in der andern bis zu 28 kurze Streifen, von denen 13 mit den verschiedenen Testkulturfiltraten, 13 mit deren Verdünnungen (10fach) und 2 mit Ferrichrysin-Standardlösungen ($0,3$ sowie $0,03\text{ g/l}$) getränkt waren.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurden die Enthemmstrecken ausgemessen. Aufgrund der Tatsache, dass sich jede Enthemmstrecke dem Logarithmus der Sideraminkonzentration im betreffenden Teststreifen proportional verhält, liessen sich die entsprechenden Sideraminkonzentrationen nach den Angaben von Zähler und Mitarbeitern (1960) direkt berechnen.

d) Sideraminidentifizierung

Die vorausgehende Anreicherung der Sideramine erfolgte nach den Angaben von Zähler und Mitarbeitern (1963), ebenso die Identifizierung der Rohextrakte. Für die Papierchromatographie diente n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) als Lösungsmittelgemisch (Bickel und Mitarb., 1960a), im Unterschied zu früher nun im absteigenden Verfahren.

e) Glukoseverbrauch

3,4-Dinitrobenzoesäure reagiert mit Ascorbinsäure bei Zimmertemperatur und mit Zuckern in der Hitze in alkalischer Lösung zu einem violetten Farbstoff unbekannter Konstitution. Diese Farbreaktion wurde von Borel (1953) zu einer empfindlichen Nachweismethode für Zucker ausgebaut und gelangte in abgewandelter Form zur Anwendung.

Von jeder Versuchsprobe wurde 1 ml Kulturfiltrat – je nach dem Glukosegehalt entweder unverdünnt oder entsprechend verdünnt – zusammen mit 1 ml Reagenzlösung in ein Teströhrchen gegeben. Das Farbreagenz setzte sich dabei aus 1,0 g 3,4-Dinitrobenzoesäure und 15,9 g Natriumcarbonat, in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, zusammen. Gleichzeitig wurden noch 3 Glukosestandardlösungen (0,5, 1,0 und 1,5 g/l) zur Prüfung in die Testfolge aufgenommen, was zu einer Eichkurve führte, welche später bei der Auswertung dieser Versuchsserie, doch nur bei dieser einen, benützt werden sollte. Damit liess sich die beträchtliche Versuchsstreuung um einiges herabsetzen. Die vorbereiteten Teströhrchen wurden nun für 2,5 min in ein dampfendes Wasserbad gestellt und darauf am fliessenden Wasser rasch abgekühlt. Die Testlösungen wurden dann auf ein Volumen von 10 ml ergänzt und 30 min nach Reaktionsbeginn deren Farbintensitäten mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 548 m μ gemessen. Vorgängig jedoch war eine ausführliche Eichkurve bei einer Glukosekonzentration von 0, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00 oder 3,00 g/l aufgenommen worden, um abzuklären, wo der günstige lineare Messbereich liegt. Dabei erwiesen sich Glukosegehalte von 0,5 bis 1,5 g/l bzw. entsprechende Extinktionswerte von 0,2 bis 0,8 für die Messung als geeignet. Die Anwesenheit von Ferrichrysin beeinflusst die Farbreaktion nicht, doch haben schon geringe Abweichungen in der Reaktionstemperatur und Reaktionszeit beträchtliche Versuchsstreuungen zur Folge.

f) Säurebildung

20 ml Kulturfiltrat von jeder Versuchsprobe wurden mit Natronlauge (0,04n) auf pH = 8,0 titriert (Kontrolle pH-Meter Beckman). Einem Laugenverbrauch von 1 ml kam dabei ein Säuregehalt von 1 mMol/l 2wertige Säure (anorganische wie organische) gleich.

g) Säureidentifizierung

Die Schwierigkeit bestand hier vor allem darin, ein Verfahren zu finden, das auch bei stark verunreinigtem Probenmaterial noch gute Trenneffekte ergab. Es wurde nämlich beabsichtigt, die Kulturfiltrate in der ursprünglichen Form (nicht etwa als Extrakte) aufzutragen, um alle Säurekomponenten (nicht bloss ausgewählte Beispiele) gleichzeitig erfassen und nachweisen zu können. Ausserdem sollte die Methode einen möglichst weiten Anwendungsbereich umfassen. Nach langem Suchen konnte in der Literatur ein Fall ausfindig gemacht werden, bei dem ähnliches mit Erfolg versucht worden war: Halliwell (1952) gelang es, in unveränderten Kulturen von *Aspergillus niger* verschiedene organische Säuren

papierchromatographisch nachzuweisen, nämlich als freie Säuren (Lugg und Overell, 1947) oder als 2,4-Dinitrophenylhydrazone (Cavallini und Mitarb., 1949). Die von diesem Autor angewandte Säurebestimmungsmethode nach Lugg und Overell wurde auch bei Kulturfiltraten von *Aspergillus melleus* erprobt und ergab günstige Versuchsergebnisse. Im einzelnen wurde dabei folgendermassen vorgegangen:

n-Butanol/Ameisensäure (90 %ig)/Wasser (4:1:5), welches allgemein zur Trennung von Dicarbonsäuren, Oxyssäuren und Oxydicarbonsäuren geeignet ist, diente als Lösungsmittelgemisch. Es hat den Vorteil, für eine grosse Zahl von organischen Säuren der verschiedensten Untergruppen gleichzeitig gute Trenneffekte zu ergeben. Als Nachteil wird jedoch empfunden, dass flüchtige Säuren – beispielsweise der Ferrichrysinbaustein Essigsäure – dabei nicht erfasst werden. Die 24 Testlösungen – 10fach eingeeengte Kulturfiltrate vom 1. bis 12. Versuchstag, je mit und ohne Eisenzusätze – wurden in Mengen von 3 μ l (bzw. 2 bzw. 1 μ l) in engem Abstand (9 mm) als möglichst kleine Substanzflecke auf die Startlinie aufgetragen. Dabei wurden die eisenfreien Proben stets auf die eine, die eisenhaltigen auf die andere Seite gebracht. Mit den jüngsten Proben (1. Tag) wurde stets in der Mitte begonnen, um dann mit den nächst älteren gegen aussen hin fortzufahren. Zuäusserst auf der Startlinie wurde noch je ein Fleck mit 5 γ α -Ketoglutar säure als Vergleichssubstanz gesetzt. Diese Chromatogrammanordnung bewährte sich, wenn eine oder mehrere Säurekomponenten über die ganze Versuchsdauer hinweg zu verfolgen waren. Galt es, eine einzelne Säurekomponente zu identifizieren, wurde die Testlösung in geringen Mengen von 1 μ l nur bei weiterhin engem Abstand (9 mm) abwechselungsweise mit der Vergleichssäure (5 γ /Fleck) auf die Startlinie gegeben. Handelte es sich dabei um dieselbe Substanz, so kamen die Säureflecken auf eine Parallele zur Startlinie, im andern Fall auf eine Zickzacklinie zu liegen.

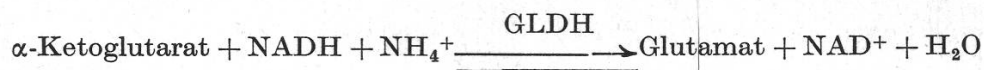
Die Chromatographiepapiere wurden anschliessend für 30 min ohne Lösungsmittel in ein geschlossenes Gefäss gehängt, das mindestens 24 h vor Gebrauch mit beiden Lösungsmittelphasen gesättigt worden war. Dann erst wurde die mobile Phase durch ein Loch des Gefässdeckels eingefüllt. Nach 7 h wurden die Papiere herausgenommen, dann 1 bis 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschliessend mit dem Farbreagenz besprüht. Zur Farbentwicklung diente Bromphenolblau; 40 mg davon wurden in 100 ml 95 %igem Alkohol gelöst und mit 0,1n Natronlauge auf pH = 5,0 bis zur Purpurfärbung gebracht. Nach dem Besprühen der Chromatogramme erschienen anstelle der Säuren gelbe Flecken auf purpurnem Grund.

Allgemein wurde darauf geachtet, dass die Testlösungen in möglichst kleinen Mengen aufgetragen wurden, weil die Salze aus der Nährlösung dann weniger ins Gewicht fielen und damit eine bessere Trennung erfolgen konnte (Godin, 1953).

h) α -Ketoglutar säurebildung

Nachdem im Kulturfiltrat von *Aspergillus melleus* mehrere organische Säuren aufgedeckt und als Intermediärprodukte des Zitronensäurezyklus identifiziert werden konnten, musste nach einer Methode zur exakten Bestimmung der wichtigsten Komponente, der α -Ketoglutar säure, gesucht werden. Dabei bewährte sich ein enzymatisches Verfahren.

Nach dem Prinzip des «optischen Tests» von Warburg arbeitend, weisen die enzymatischen Testmethoden im Vergleich zu andern, rein chemischen Analyseverfahren eine überlegene Spezifität auf; die einfache Arbeitsweise bedeutet einen weiteren Vorteil. Grundlage der enzymatischen optischen Tests ist die Messung von Extinktionsänderungen eines der an einer enzymatischen Reaktion teilnehmenden Coenzyme oder Substrate. Für solche Tests werden am häufigsten die Coenzyme Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) herangezogen; die reduzierten Formen beider Verbindungen, NADH und NADPH, weisen ein Absorptionsmaximum bei 340 m μ auf. Bei der enzymatischen Bestimmung der α -Ketoglutar säure-Konzentration nun tritt NADH als Messgrösse auf und wirkt an folgender Reaktion als Wasserstoffdonator mit:



Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) dient dabei als Katalysator. Bei einem Überschuss an NH_4^+ -Ionen und NADH und gleichzeitiger Anwesenheit von GLDH wird α -Ketoglutar-säure quantitativ in Glutamat überführt; die Reaktion verläuft also stöchiometrisch. Daher lässt sich aus dem NADH-Verbrauch, welcher als Extinktionsdifferenz (ΔE) be-stimmt wird, unmittelbar die ursprünglich vorhandene α -Ketoglutar-säurekonzentration ableiten. Das Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von α -Ketoglutar-säure mit NADH und GLDH wurde von Wallenfels und Christian (Bergmeyer, 1962) ausgearbeitet. Es gestattet, α -Ketoglutar-säure in biologischem Material spezifisch und quantitativ zu bestimmen. Die Firma C.F.Boehringer, Mannheim, hat es zu einem gut funktionierenden Test (als α -Ketoglutar-säure-Test-Kombination TC-E 15 975 im Handel) für die Klinik weiter entwickelt, welcher unter Weglassen der Enteiweissung hier zur Anwendung gelang-te.

Als Prüflösungen dienten 24 Kulturfiltrate (1. bis 12. Versuchstag, bei -20°C aufbe-wahrt), von denen jedes ein Gemisch aus 5 analogen Versuchsproben, zu gleichen Teilen verwendet, darstellte; je 2 stammten vom selben Versuchstag, das eine mit, das andere ohne Eisenzusatz. Die α -Ketoglutar-säurebestimmung erfolgte für sämtliche Testlösungen gleichzeitig, und zwar je in zwei verschiedenen, geeigneten Verdünnungen (als 50- bzw. 25 %ige oder dann als 10- bzw. 5 %ige Lösung). Zu diesem Zweck wurden nacheinander

2,00 ml Prüflösung	(50- bzw. 25 %ig oder 10- bzw. 5 %ig),
1,75 ml Pufferlösung	(0,1 M TRIS/HCl, pH 7,6)
und 0,05 ml NADH	(in der Testkombination enthalten)

in eine 10-mm-Küvette pipettiert, dann mit einem Plasticspatel gemischt und unmittelbar darauf die Extinktion (E_1) bei einer Wellenlänge von $340\text{ m}\mu$ gemessen. Anschliessend wurden noch weitere

0,05 ml GLDH (in der Testkombination enthalten)

mit dem Plasticspatel eingemischt. Nach 5 min wurde nochmals die Extinktion (E_2) abgelesen. Da die Enzymreaktion unter den angegebenen Bedingungen stöchiometrisch verlief, konnte aus der Extinktionsdifferenz (ΔE) die in der Küvette enthaltene α -Keto-glutar-säuremenge unmittelbar abgeleitet werden, und zwar gilt die folgende Beziehung (vgl. Arbeitsvorschrift der α -Ketoglutar-säure-Test-Kombination):

$$\Delta E \frac{\text{Schichtlänge} = 10\text{ mm}}{\text{Wellenlänge} = 340\text{ m}\mu} \cdot 90,4 = \text{Anzahl } \gamma \text{ } \alpha\text{-Ketoglutarat/Küvette}$$

Ergebnisse

1. Sideraminbildung in Abhängigkeit vom Eisengehalt

Bei *Aspergillus melleus* ist von Zähler und Mitarbeitern (1962) beobachtet worden, dass die Ferrichrysinbildung je nach Eisengehalt der Nährlösung extreme Werte annimmt – verhältnismässig hohe bei Eisen-mangel und verschwindend kleine bei genügender Eisenversorgung –, während sich im Myzelwachstum keine wesentlichen Unterschiede zeigen. Bei welchen Eisenkonzentrationen diese Extremwerte auftreten, sollte an erster Stelle abgeklärt werden.

Zu diesem Zweck wurden 40 Kulturen von *Aspergillus melleus* mit Eisenzusätzen von $10^{-5,0}$, $10^{-5,5}$, $10^{-6,0}$,, $10^{-8,0}$ oder 0 Mol/l ange-
setzt. Nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen wurden bei sämtlichen Ver-
suchsproben Ferrichrysingehalt und Myzelgewicht bestimmt.

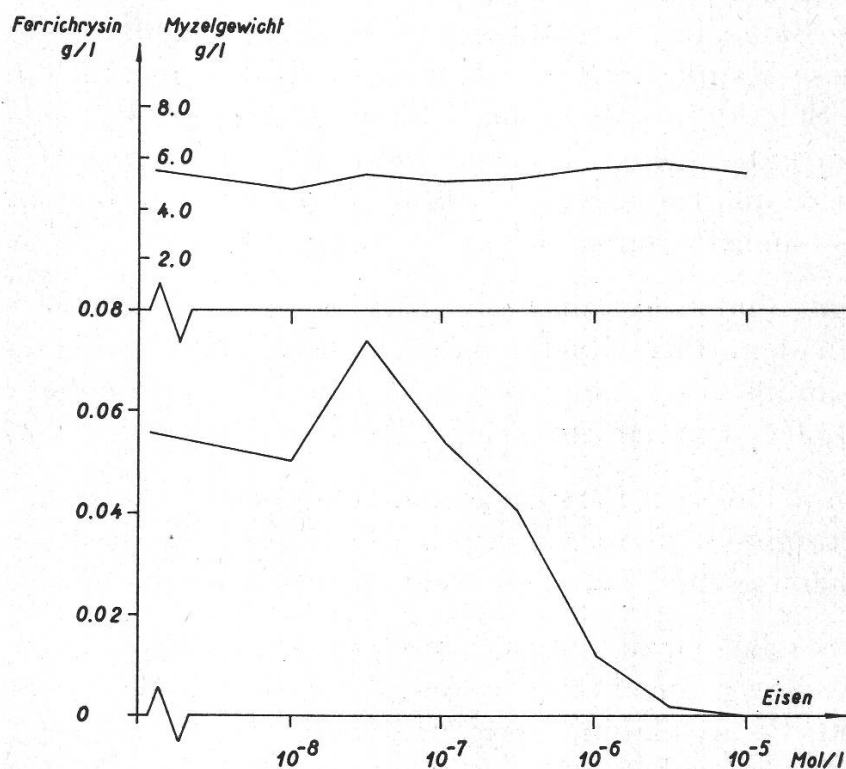


Abbildung 1

Sideraminbildung in Abhängigkeit vom Eisengehalt. Abszisse: Eisenzugabe zur Nährlösung (Grundnährlösung + 0,1 g/l Ornithin). Ordinaten: Myzelgewicht bzw. Ferrichrysingehalt nach 8 Tagen

Bei Eisenzusätzen von $10^{-7,5}$ Mol/l erreichte die Ferrichrysinbildung mit 0,074 g/l ihren Höchstwert, wogegen bei $10^{-5,0}$ Mol/l keine nachweisbaren Ferrichrysinmengen mehr gebildet wurden. Im Myzelwachstum machten sich keine nennenswerten Unterschiede geltend. Dass der Pilz bei Eisenzugaben von $10^{-5,0}$ Mol/l keine messbaren Ferrichrysinmengen liefert, bedeutet wohl, dass er sich bei genügend grossem Eisenangebot auf die Produktion von geringen Mengen einstellt, die eben ausreichen, um als spezifische Eisendonatoren eines eiseneinbauenden Systems wirken zu können. Die Feststellung, dass Eisenmangel eine Steigerung der Sideraminbildung bewirkt, ohne das Myzelwachstum zu beeinflussen, weist darauf hin, dass damit eine Änderung im Stoffwechsel eintritt, die mit dem Aufbau von Zellmaterial nicht unmittelbar zusammenhängt. Ferner fällt auf, dass die Ferrichrysingehaltskurve zwischen $10^{-8,0}$ und 0 Mol/l Eisen nicht weiter absinkt, sondern nochmals leicht ansteigt; der

Eisengehalt im Versuchsgefäß kann offenbar ohne besondere Reinigung nicht unter eine bestimmte Grenzkonzentration gebracht werden.

2. Sideraminbildung in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle

Im Ferrichrysinmolekül kommen verschiedene Aminosäuren nebeneinander als Bausteine vor, und zwar Glycin, Serin und δ -N-Hydroxyornithin. Diese Mannigfaltigkeit an stickstoffhaltigen Bauelementen gab Anlass, die Sideraminbildung und deren Abhängigkeit von der Stickstoffquelle zu untersuchen. Die Sideraminbildung kann sich in verschiedener Hinsicht, quantitativ wie qualitativ, ändern, so dass sich die beiden folgenden Versuchsfragen stellten:

a) Erreicht die Sideraminbildung sehr unterschiedliche Werte, je nachdem, ob dem Pilz Glycin, Serin, Alanin, Phenylalanin, Ornithin, Lysin, Glutaminsäure, Asparagin, sek. Ammoniumphosphat oder Calciumnitrat (5,0 g/l) als einzige Stickstoffquelle dient?

b) Wird in jedem Fall Ferrichrysin gebildet, und können daneben auch andere Sideramine – bis dahin wurde bei *Aspergillus melleus* nur Ferrichrysin nachgewiesen – entstehen, wenn die Stickstoffquelle variiert wird?

Um dies entscheiden zu können, wurde in einem Versuch das Asparagin in der Nährlösung durch eine andere Stickstoffquelle ersetzt (Glycin, Serin, Alanin, Phenylalanin, Ornithin, Lysin, Glutaminsäure, Asparagin, sek. Ammoniumphosphat oder Calciumnitrat [5,0 g/l]), je Verfahren 10 Kolben. Nach 10 Tagen wurde die eine Hälfte der Versuchsproben (5 Analoge von jeder Kulturvariante) für die Myzelgewichts- und Sideramingehaltsbestimmung, die andere für die Sideraminidentifizierung verwendet. Die Resultate zur Frage a sind in Abbildung 2 dargestellt. Um eine allfällige Beziehung zwischen Sideraminbildung und Stickstoffquelle sichtbar zu machen, wurden sie in ein kartesisches Koordinatensystem eingetragen. Somit waren die Resultate jeder einzelnen Versuchsvariante (Stickstoffquelle = Glycin, Serin,, sek. Ammoniumphosphat oder Calciumnitrat) darin als bestimmte Punkte (x, y) dargestellt, deren Koordinaten sich einerseits aus dem mittleren Sideramingehalt (y) und andererseits aus dem berechneten Stickstoffgehalt (x) der betreffenden Nährlösung zusammensetzten. Sollte sich die Sideraminbildung nun vom Stickstoffgehalt der Nährlösung als abhängig erweisen, müsste sie mit zunehmender Stickstoffkonzentration entsprechend ansteigen. Im Fall von Abhängigkeit lägen also die Versuchspunkte mehr oder weniger auf einer aufsteigenden Geraden durch den Nullpunkt, bei Beziehungslosigkeit jedoch auf einer Geraden parallel zur x-Axe.

Zu a: Die Sideraminbildung erreichte je nach Stickstoffquelle sehr unterschiedliche Werte – sie erwies sich von den einen als abhängig, für

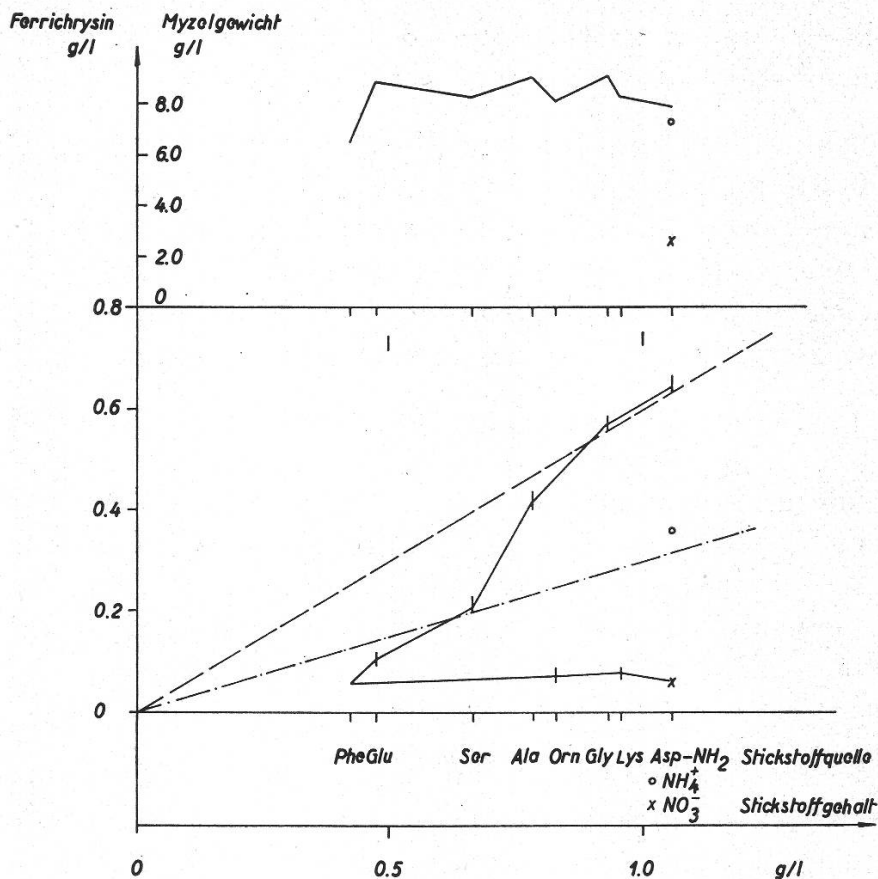


Abbildung 2

Sideraminbildung in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle. Abszisse: Stickstoffquelle und Stickstoffgehalt der Nährlösung. Ordinaten: Myzelgewicht bzw. Ferrichrysingehalt nach 10 Tagen. Gestrichelt (strichpunktiert): theoretischer Kurvenverlauf, wenn 10 % (5 %) Stickstoff ins Ferrichrysinmolekül eingebaut werden

andere wieder als unabhängig: Unabhängigkeit für Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Calciumnitrat, hingegen Abhängigkeit für Glutaminsäure, Serin, sek. Ammoniumphosphat, Alanin, Glycin und Asparagin. Diese Abhängigkeit äusserte sich darin, dass die Sideraminbildung mit zunehmendem Stickstoffgehalt der Nährlösung gleichfalls anstieg. Für Glutaminsäure, Serin und sek. Ammoniumphosphat betrug der relative Stickstoffeinbau ins Ferrichrysinmolekül rund 5 %, für Alanin, Glycin und Asparagin sogar rund 10 %; auffällig ist, dass Ornithin nicht dazuzählte (vgl. Ergebnisse von Versuch 5). Asparagin, das in der Grundnährlösung als einziger stickstoffhaltiger Bestandteil auftrat, zeigte sich somit neben Glycin und Alanin als Stickstoffquelle sehr geeignet und fand demnach in den folgenden Versuchen weiterhin Verwendung. Bei den 6 Stickstoffquellen, von welchen sich die Sideraminbildung als abhängig erwies, handelt es sich entweder um Bausteine von Ferrichrysin selbst (Gly und Ser) oder um Verbindungen (Ala, Asp-NH₂, Glu und NH₄⁺), die am Syntheseweg von δ -N-Hydroxyornithin, einem weiteren Ferrichrysinbaustein, liegen, rings um den Zitronensäurezyklus angeordnet – ein

Hinweis, dass zwischen der Biogenese von Ferrichrysin und dem Zitronensäurezyklus eine gewisse Beziehung bestehen könnte.

Bei 7 von den insgesamt 10 verschiedenen Kulturvarianten wurde die Sideraminbildung auch qualitativ überprüft – nämlich bei all denjenigen, welche eine gewisse Abhängigkeit der Sideraminbildung von der Stickstoffquelle zeigten (Glu, Ser, NH_4^+ , Ala, Gly und Asp- NH_2) und ausserdem noch bei der Calciumnitratvariante. Die papierchromatographischen Untersuchungen führten dabei zu folgendem Ergebnis:

Zu b: Ferrichrysin konnte in jedem Fall eindeutig nachgewiesen werden. Zudem wies eine der Proben mit Glycin als Stickstoffquelle neben Ferrichrysin noch drei weitere Sideramine ($R_f = 0,60-0,70$; $0,77-0,81$; $0,86$ bis $0,87$) auf. Weil es sich dabei um höchstens 10% der Gesamtmenge handelte, wurde nicht darauf eingegangen. Für Serin schien dasselbe wie für Glycin zuzutreffen, doch traten dort die NebenkompONENTEN in derart geringen Mengen auf, dass sie nicht mehr mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten.

Aspergillus melleus kann also je nach Stickstoffquelle neben Ferrichrysin gleichzeitig noch andere Sideramine bilden, doch bleibt Ferrichrysin stets Hauptprodukt. Der Pilz ist somit trotz Variierung der Stickstoffquelle spezifisch auf die Bildung dieses einen Sideramins eingestellt, welches ausnahmsweise von geringen Mengen anderer Sideramine begleitet sein kann. Demzufolge liegen bei *Aspergillus melleus* ähnliche Verhältnisse vor, wie sie früher schon bei Actinomyceten angetroffen wurden (Zähner und Mitarb., 1962).

3. Sideraminbildung im Verlaufe der Versuchszeit

In den beiden vorangehenden Versuchen wurde festgestellt, dass die Ferrichrysinbildung, wenn zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt (8. bzw. 10. Versuchstag) bestimmt, je nach Eisengehalt bzw. Stickstoffquelle der Nährlösung wesentliche Unterschiede aufwies. Die Vermutung lag nahe, dass sich die Ferrichrysinbildung unter den einzelnen Versuchsbedingungen nicht nur an dem einen Stichtag, sondern während der ganzen Versuchsdauer entsprechend charakteristisch verhalten könnte. Aus diesem Grund wurde im folgenden der zeitliche Verlauf der Sideraminbildung im Fall von Eisenmangel überprüft, und zwar im Anschluss an Versuch 1 bei Proben mit $10^{-7,5}$ Mol/l Eisen im Zeitraum von 10 Tagen täglich. Gleichzeitig wurde eine weitere Versuchsfrage behandelt, nämlich, ob sich die im Zusammenhang mit Eisenmangel auftretende Ferrichrysinbildung nachträglich beeinflussen liesse, indem anfänglicher Eisenmangel ($10^{-7,5}$ Mol/l) am 3. Versuchstag in Eisenüberschuss ($10^{-5,0}$ Mol/l) verwandelt wurde.

Im Hinblick darauf erhielten 85 Kolben zur Grundnährlösung einen Zusatz von $10^{-7,5}$ Mol/l Eisen; am 3. Versuchstag wurde der Eisengehalt von 35 Kolben auf $10^{-5,0}$ Mol/l erhöht. Während 10 Tagen wurden täglich Myzelwachstum und Sideraminbildung bestimmt (Abb. 3).

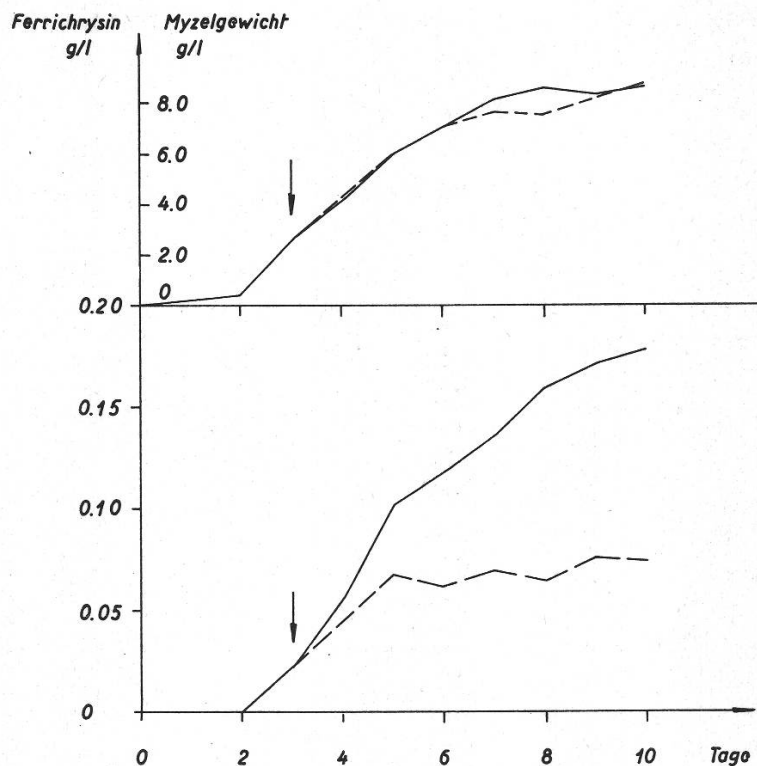


Abbildung 3

Sideraminbildung im Verlaufe der Versuchszeit. Abszisse: Inkubationszeit. Ordinaten: Myzelgewicht bzw. Ferrichrysin Gehalt. Ausgezogene Kurven: $10^{-7,5}$ Mol/l Eisenzugabe; gestrichelte Kurven: $10^{-5,0}$ Mol/l Eisenzugabe. Pfeil: Eisenzugabe (siehe Text)

Bei einem Eisengehalt von $10^{-7,5}$ Mol/l nahmen Myzelgewicht und Sideramingehalt stetig zu; nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen hatte der Pilz Wachstum und Sideraminbildung noch nicht abgeschlossen. Wurde aber die Eisenkonzentration der Nährlösung auf $10^{-5,0}$ Mol/l erhöht, liess die Ferrichrysinbildung allmählich nach, und nach einer Übergangsperiode von 2 Tagen blieb die Ferrichrysinmenge im wesentlichen konstant. Das Myzelwachstum wurde dabei nicht beeinflusst. Die im Zusammenhang mit Eisenmangel auftretende übermässige Sideraminproduktion stieg somit einerseits bis zum Versuchsabbruch gleichmässig an, liess aber allmählich nach, sobald genügend Eisen vorhanden war. Demzufolge bewirkt Eisenmangel im Intermediärstoffwechsel nicht eine irreversible, sondern eine reversible Änderung.

4. Sideraminbildung und Säurehaushalt

Nachdem im vorhergehenden die Ferrichrysinbildung in ihren Grundzügen erkannt werden konnte, wurde nach deren Verknüpfung mit dem Intermediärstoffwechsel gefragt.

Zu diesem Zweck wurden 120 Kulturen von *Aspergillus melleus* auf dem Grundmedium angesetzt; die Hälfte der Versuchssproben erhielt ausserdem einen Zusatz von $10^{-5,0}$ Mol/l Eisen, die andere blieb «eisenfrei». Während 12 Tagen wurden deren Stoffwechselverhältnisse täglich überprüft und verglichen. In diesem Versuch wurden daher gleichzeitig bestimmt: der Säuregrad (titrimetrisch), die Art und Menge der gebildeten organischen Säuren (papierchromatographisch, semiquantitativ) und insbesondere der α -Ketoglutarsäuregehalt (enzymatisch), daneben auch

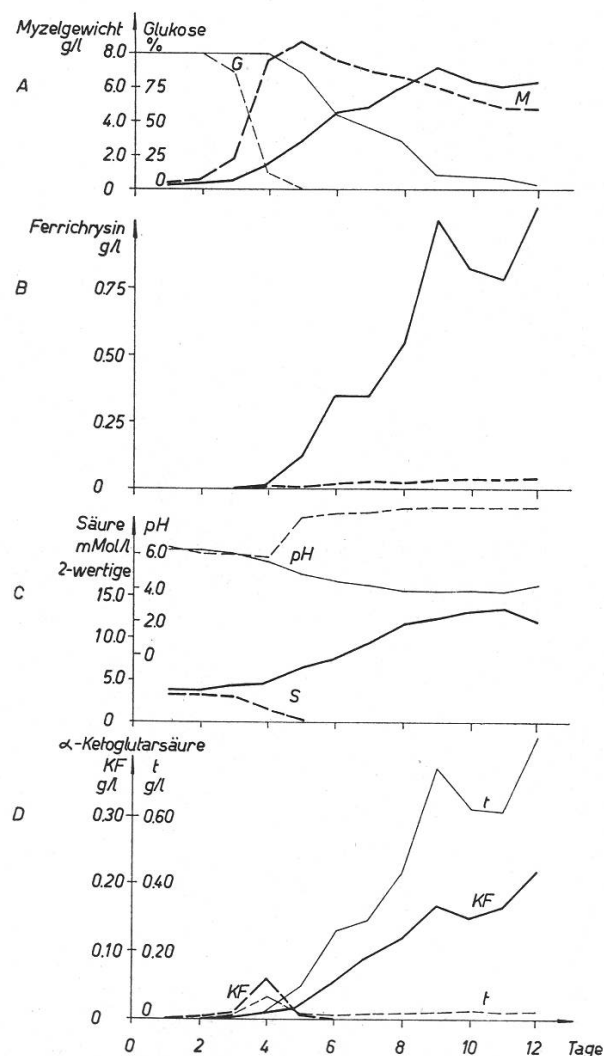


Abbildung 4

Sideraminbildung und Säurehaushalt. Ausgezogene Kurven: ohne Eisenzugabe; gestrichelte Kurven: mit Eisenzugabe ($10^{-5,0}$ Mol/l). A: Myzelgewicht M und Glukosegehalt G. B: Ferrichrysingehalt. C: Säuregehalt S und pH-Wert. D: α -Ketoglutarsäure im Kulturfiltrat (KF) und total (t: im Kulturfiltrat und eingebaut in Ferrichrysin)

Myzelgewicht, Glukose- und Ferrichrysinkonzentration. Damit war es möglich, das biologische Verhalten der betreffenden Kulturen über eine gewisse Zeit graphisch festzuhalten und allfällige grundsätzliche Unterschiede als Folge von extremen Versuchsbedingungen (Eisenzugabe von 0 oder $10^{-5,0}$ Mol/l) klar hervorzuheben (Abb. 4). Die Versuchsergebnisse zeigten folgendes:

Für Myzelwachstum, Ferrichrysinbildung, Säurebildung und α -Ketoglutarsäurebildung liegt allgemein eine Abhängigkeit vom Eisenangebot vor (Abb. 4A bis 4D). Im einzelnen äusserte sich Eisenmangel im Vergleich zu genügendem Eisenangebot durch verzögertes Myzelwachstum (Maximum erst am 9. statt am 5. Versuchstag), erhöhte Ferrichrysinbildung (bis zu 1,050 g/l gegenüber höchstens 0,040 g/l Ferrichrysin), erhöhte Säurebildung (bis zu 13,35 mMol/l gegenüber höchstens 3,25 mMol/l 2wertige Säure), insbesondere α -Ketoglutarsäurebildung (bis zu 0,835 g/l gegenüber höchstens 0,065 g/l α -Ketoglutarsäure). Gleichzeitig wurde deutlich, dass bei Eisenmangel am 3. bzw. 4. Versuchstag im Intermediärstoffwechsel eine entscheidende Wendung eintritt; im «pathogenen» Fall (Eisenzusatz 0 Mol/l) setzte zu diesem Zeitpunkt eine vermehrte Bildung von Ferrichrysin, Säure und α -Ketoglutarsäure ein, die bis zum 9. Versuchstag stetig zunahm, während sich im Normalfall (Eisenzusatz $10^{-5,0}$ Mol/l) eine Tendenz zur Abnahme feststellen liess.

Zwischen den 4 genannten Grössen besteht ferner eine Wechselbeziehung, die im Fall von Eisenmangel deutlich zu erkennen ist (Abb. 4A bis 4D): Die betreffenden Myzelwachstums-, Ferrichrysinbildungs-, Säurebildungs- (allerdings zu wenig eindeutig) wie auch α -Ketoglutarsäurebildungskurven wiesen alle zu demselben Zeitpunkt, nämlich am 9. Versuchstag, ein Maximum auf, stimmten also zeitlich überein.

Die bei sämtlichen Kulturfiltratsproben gleichzeitig vorgenommenen papierchromatographischen Untersuchungen zeigten, dass verschiedene organische Säuren an der bei Eisenmangel auftretenden, erhöhten Säurebildung beteiligt sind. Zitronensäure (R_f 0,350), Äpfelsäure (R_f 0,455), α -Ketoglutarsäure (R_f 0,595), Bernsteinsäure (R_f 0,725) und Fumarsäure (R_f 0,820) konnten als Säurekomponenten identifiziert werden; alle 5 traten gleichzeitig auf, doch bildete α -Ketoglutarsäure stets das Hauptprodukt. Diese Feststellung gab damals Anlass zur exakten Untersuchung der α -Ketoglutarsäure-Gehaltsverhältnisse in den Pilzkulturfiltraten.

Aus der Korrelation Ferrichrysinbildung/ α -Ketoglutarsäurebildung einerseits und der Abhängigkeit dieser beiden Grössen vom Eisenangebot andererseits und ausserdem noch gestützt durch die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchungen folgt somit: Ein primärer Effekt von Eisenmangel besteht darin, dass dadurch eine Störung im Tricarbonsäurezyklus bzw. ein «Disorder» im Glukoseendabbau, und zwar ab

Pyruvat, eintritt. Erhöhte Sideraminbildung infolge Eisenmangels ist demnach auf eine Störung im Tricarbonsäurezyklus zurückzuführen.

5. Sideraminbildung und Ornithinverwertung

Die Sideramine aus Pilzen enthalten δ -N-Hydroxyornithin als charakteristischen Baustein. Diese Aminosäure verdient besondere Aufmerksamkeit, wenn nach der Entstehungsweise der Sideramine gefragt wird. Im einzelnen wurde hier die Frage untersucht, ob der Pilz Ornithin, das in Mengen von 0,1 g/l zu verschiedenen Nährlösungen mit variabler Stickstoffquelle zugesetzt wurde, zur Bildung von Ferrichrysin verwerten könne. – Absichtlich ist hier von Ornithinverwertung und nicht von Ornithineinbau die Rede, weil sich diese weitere Frage erst mit Hilfe von Isotopen beantworten liesse.

50 Kulturen (zehnmal 5 Analoge) wurden auf dem asparaginfreien Grundmedium unter Zusatz von je einer der 10 verschiedenen Stickstoffquellen (Glycin, Serin,, sek. Ammoniumphosphat oder Calciumnitrat [5,0 g/l] und von Ornithin (0,1 g/l) angesetzt. Dies geschah gleichzeitig mit dem zuvor beschriebenen Versuch 2, so dass diesen ornithin-

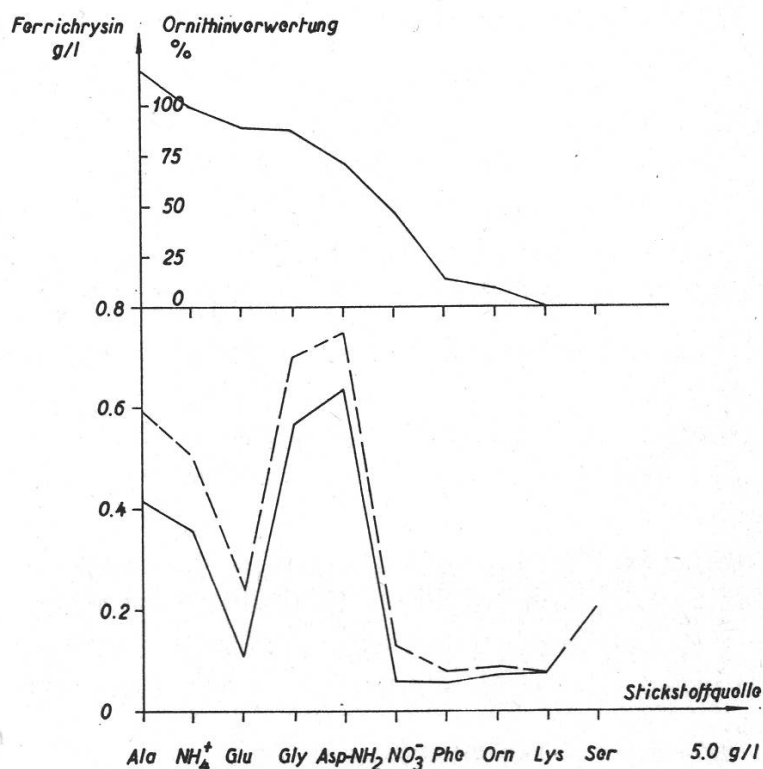


Abbildung 5

Sideraminbildung und Ornithinverwertung. Abszisse: Stickstoffquelle. Ordinaten: Ferrichrysingehalt ohne Ornithin (ausgezogene Kurve) und mit 0,1 g/l Ornithin (gestrichelte Kurve) bzw. Ornithinverwertung (Ferrichrysinzuwachs in % des theoretischen Wertes von 0,148 g/l Ferrichrysin/0,100 g/l Ornithin) nach 10 Tagen

haltigen Kulturen nochmals gleichviele ornithinfreie gegenüberstanden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurden bei sämtlichen Proben Myzelgewicht und Sideramingehalt bestimmt. Aus den Sideraminbildungswerten bei Ornithinabwesenheit wie Ornithinanwesenheit konnte durch Bildung der Differenz der Sideraminbildungszuwachs für die 10 verschiedenen Stickstoffquellen ermittelt werden. Daraus ergab sich Abbildung 5, die folgendes aussagt:

Ein geringer Zusatz von Ornithin (0,1 g/l) zu jeder Stickstoffquelle bewirkte in Gegenwart von Alanin, sek. Ammoniumphosphat, Glutaminsäure, Glycin und Asparagin einen extrem hohen, in Gegenwart von Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Serin nur einen geringen Sideraminbildungszuwachs; in Gegenwart von Calciumnitrat bewegte sich der Zuwachs zwischen den beiden Extremen. Im Fall von Alanin, sek. Ammoniumphosphat, Glutaminsäure, Glycin und Asparagin entsprach die Sideraminzunahme einer Ornithinverwertung von mindestens 72%, im Fall von Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Serin einer solchen von höchstens 14%. Die Ornithinverwertung erwies sich damit als verhältnismässig hoch für Stickstoffquellen in der Nachbarschaft des Tricarbonsäurezyklus und als eher gering für solche, die abseits davon zu suchen sind. Dies ist ein weiterer Hinweis auf einen engen Zusammenhang zwischen der Biogenese von Ferrichrysin und dem Tricarbonsäurezyklus (vgl. Ergebnisse von Versuch 2). Ferrichrysinbildung und Ornithinverwertung stehen somit in enger Beziehung zueinander; Ornithin wird in Gegenwart einer andern geeigneten Stickstoffquelle zum grössten Teil (zu mindestens 72%) für den Aufbau von Ferrichrysin verwendet. Ob Ornithin dabei als ganzes Molekül oder nur in Form von Bruchstücken (als NH_4^+ z.B.) ins Ferrichrysinmolekül eingebaut wird, bleibt noch offen.

Im weitem wurde festgestellt, dass sich Ornithin in Anwesenheit von sek. Ammoniumphosphat (5,0 g/l) beinahe zu 100%, unter Ausschluss desselben jedoch zu 1% nur an der Biogenese des Ferrichrysin beteiligt:

			Ferrichrysin- bildung g/l	Ornithin- verwertung %
Grundmedium (asparaginfrei)	+ Ornithin (5,0 g/l)		0,072	1,0
Grundmedium (asparaginfrei)	+ NH_4^+ (5,0 g/l)		0,356	—
Grundmedium (asparaginfrei)	+ NH_4^+ (5,0 g/l)	+ Ornithin (0,1 g/l)	0,502	98,8

Aspergillus melleus kann somit Ornithin nur dann voll in die Ferrichrysinbiogenese einbeziehen, wenn es von einer geeigneten zusätzlichen

Stickstoffquelle – NH_4^+ schon genügt – begleitet wird. Dies weist darauf hin, dass Ornithin nicht nur durch die Aminogruppen, sondern als ganzes Molekül an der Ferrichrysinbildung beteiligt ist. Entweder wird es als ganzes eingebaut, oder aber es dient als spezifischer Aminogruppenlieferant für eine Aminotransferase.

Diskussion

Die geschilderten Versuche zeigen, dass in Kulturen von *Aspergillus melleus* Yukawa bei Eisenmangel α -Ketoglutarsäure (begleitet von kleineren Mengen von Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure) angereichert wird. Die Anreicherung dieser Säuren deutet auf eine Störung im Tricarbonsäurezyklus hin.

Ähnliche Erscheinungen sind auch bei anderen Organismen beschrieben worden. *Penicillium brevi-compactum* bildet in Gegenwart von Calcium (0,5 Mol/l) grössere Mengen organischer Säuren (Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Oxalessigsäure und Gluconsäure; Godin, 1953). *Aspergillus niger* bildet in Gegenwart von Arsen (0,01 Mol/l) 4 verschiedene Ketosäuren, darunter α -Ketoglutarsäure (Walker und Mitarb., 1951).

Die Natur der durch Eisenmangel verursachten Störung des Tricarbonsäurezyklus ist noch nicht bekannt. Denkbar wäre zunächst eine Störung der oxydativen Decarboxylierung von α -Ketoglutarsäure; dabei würde α -Ketoglutarsäure angereichert, während sich die anderen Säuren von der Oxalessigsäure ableiten liessen. Andererseits könnte die Störung bei den 4 Verknüpfungsstellen von Tricarbonsäurezyklus und Atmungskette gesucht werden. Der Tricarbonsäurezyklus läuft nur in Verbindung mit der Atmungskette ab; die Coenzyme liegen in katalytischen Mengen vor und werden stets regeneriert. Flavinenzyme der Atmungskette dehydrieren die reduzierten Pyridin-Coenzyme (NADH) des Tricarbonsäurezyklus; in einigen von ihnen konnte nicht hämgebundenes Eisen nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass sich Eisenmangel primär auf diese Verknüpfungsstellen auswirkt und dadurch den normalen Ablauf des Tricarbonsäurezyklus stört.

Eisenmangel führt zur Anreicherung von α -Ketoglutarsäure und ausserdem zu erhöhter Ferrichrysinbildung. α -Ketoglutarsäure stellt eine Vorstufe des Ornithins bzw. des δ -N-Hydroxyornithins, des entscheidenden Ferrichrysinbausteins, dar. Ob der Aufbau des δ -N-Hydroxyornithins über Glutamat oder über das N-Acetyl-Glutamat verläuft, bleibt noch offen. Ungeklärt ist auch, auf welcher Stufe die Hydroxygruppe in die endständige Aminogruppe des Ornithins eingeführt wird. Die relativ starke Steigerung der Ferrichrysinbildung durch Ornithinzugabe in An-

wesenheit geeigneter Stickstoffquellen weist auf die Möglichkeit eines direkten Ornithineinbaus hin.

Der eisenfreie Grundkörper des Ferrichrysin wird bei Eisenmangel als Folge eines gestörten Tricarbonsäurezyklus angereichert. Desferrichrysin zeigt (wie die übrigen Sideramine) ein selektives Bindungsvermögen für Eisen-III-Ionen und dient nach der Hypothese von Keller und Mitarbeitern (1964) als spezifischer Eisenspender eines eiseneinbauenden Systems. Die Wirkungsweise der Sideramine im mikrobiellen Stoffwechsel bleibt jedoch noch näher abzuklären; die Bedeutung der erhöhten Ferrichrysinbildung bei Eisenmangel ist deshalb noch ungewiss.

Zusammenfassung

Aspergillus melleus bildet bei Eisenmangel verhältnismässig grosse, bei genügender Eisenversorgung jedoch verschwindend kleine Mengen von Ferrichrysin. Die Ferrichrysinbildung wurde einerseits in Abhängigkeit von Eisenangebot, Stickstoffquelle und Versuchszeit und andererseits auf ihre Stellung im Intermediärstoffwechsel hin untersucht.

1. (Abb. 1) Bei Eisenzusätzen von $10^{-7.5}$ Mol/l erreichte die Ferrichrysinbildung mit 0,074 g/l ihren Höchstwert, wogegen bei $10^{-5.0}$ Mol/l keine nachweisbaren Ferrichrysinmengen mehr gebildet wurden. Das nach 8 Tagen bestimmte Myzelgewicht wies keine wesentlichen Unterschiede auf.

2. (Abb. 2) Die Ferrichrysinbildung wurde von den einen Stickstoffquellen (Glutaminsäure, Serin, sek. Ammoniumphosphat, Alanin, Glycin und Asparagin) beeinflusst, von den andern (Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Calciumnitrat) nicht. Für Glutaminsäure, Serin und sek. Ammoniumphosphat betrug der relative Stickstoffeinbau ins Ferrichrysinmolekül rund 5 %, für Alanin, Glycin und Asparagin sogar rund 10 %.

3. Je nach der Stickstoffquelle können neben Ferrichrysin gleichzeitig noch andere Sideramine entstehen ($R_f = 0,60-0,70$; $0,77-0,81$; $0,86$ bis $0,87$), doch bleibt Ferrichrysin stets Hauptprodukt. Ähnliche Verhältnisse sind von Actinomyceten bekannt.

4. (Abb. 3) Bei Eisenzusätzen von $10^{-7.5}$ Mol/l nahmen Myzelgewicht und Ferrichrysingehalt stetig zu; nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen hatte der Pilz Myzelwachstum und Ferrichrysinbildung noch nicht abgeschlossen. Wurde die Eisenkonzentration der Nährlösung auf $10^{-5.0}$ Mol/l erhöht, liess die Ferrichrysinbildung nach; das Myzelwachstum wurde dabei nicht beeinflusst. *Eisenmangel verursacht somit im Intermediärstoffwechsel eine reversible Änderung.*

5. (Abb. 4) Eisenmangel (kein Eisenzusatz) bewirkte im Vergleich zu genügendem Eisenangebot (Eisenzusatz $10^{-5,0}$ Mol/l) verzögertes Myzelwachstum, erhöhte Ferrichrysinbildung, erhöhte Säurebildung, insbesondere α -Ketoglutarsäurebildung (bis zu 0,835 g/l gegenüber höchstens 0,065 g/l α -Ketoglutarsäure). Myzelwachstum, Ferrichrysinbildung, Säurebildung wie auch α -Ketoglutarsäurebildung zeigten bei Eisenmangel einen zeitlich übereinstimmenden Kurvenverlauf. An der erhöhten Säurebildung waren verschiedene organische Säuren, ausschliesslich Intermediärprodukte des Tricarbonsäurezyklus, beteiligt, nämlich Zitronensäure, α -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure; alle fünf traten gleichzeitig auf, doch bildete α -Ketoglutarsäure stets die Hauptkomponente. *Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei Eisenmangel eine Störung im Tricarbonsäurezyklus eintritt. Die erhöhte Ferrichrysinbildung infolge Eisenmangels ist auf diese Störung zurückzuführen.*

6. (Abb. 5) Ein geringer Zusatz von Ornithin (0,1 g/l) zu jeder Stickstoffquelle (5,0 g/l) bewirkte in Gegenwart von Alanin, sek. Ammoniumphosphat, Glutaminsäure, Glycin und Asparagin einen extrem hohen ($>72\%$), in Gegenwart von Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Serin nur einen geringen ($<14\%$) Zuwachs an Ferrichrysin; in Gegenwart von Calciumnitrat bewegte sich der Zuwachs zwischen den beiden Extremen. Ferrichrysinbildung und Ornithinverwertung stehen somit in enger Beziehung zueinander.

7. Die möglichen Aufbauwege für δ -N-Hydroxyornithin, den entscheidenden Ferrichrysinbaustein aus α -Ketoglutarsäure, der in hoher Konzentration angetroffenen Säurekomponente, werden diskutiert.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Gäumann (†), und seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. H. Kern, Leiter des Institutes für Spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, danke ich für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zähler (Institut für Mikrobiologie der Universität in Tübingen) für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine wertvollen Anregungen.

Literatur

- Bergmeyer H.U. 1962. Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse.
- Bickel H., R.Bosshardt, E.Gäumann, P.Reusser, E.Vischer, W.Voser, A.Wettstein und H.Zähner. 1960a. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 26. Mitt. Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrioxamine A-F, neuer Wachstumsstoffe der Sideramin-Gruppe. *Helv. Chim. Acta* **43**, 2118.
- E.Gäumann, W.Keller-Schierlein, V.Prelog, E.Vischer, A.Wettstein und H.Zähner. 1960b. Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotica Sideromycine. *Experientia* **16**, 129.
- — G.Nussberger, P.Reusser, E.Vischer, W.Voser, A.Wettstein und H.Zähner. 1960c. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 25. Mitt. Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A₁ und A₂, neuer Antibiotica der Sideromycin-Gruppe. *Helv. Chim. Acta* **43**, 2105.
- Borel E. 1953. Über die quantitative Zuckerbestimmung mit Hilfe von 3,4-Dinitrobenzoesäure. Dissertation. ETH Zürich.
- Burnham B.F. und J.B.Neilands. 1961. Studies on the Metabolic Function of the Ferrichrome Compounds. *J. Biol. Chem.* **236**, 554.
- Burton M.O., F.J.Sowden und A.G.Lochhead. 1954. Studies on the Isolation of the Terregens Factor. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **32**, 400.
- Cavallini D., N.Frontali und G.Toschi. 1949. Determination of Keto-Acids by Partition Chromatography on Filter-Paper. *Nature* **163**, 568.
- Cook F.D. und A.G.Lochhead. 1959. Growth Factor Relationships of Soil Microorganisms as Affected by Proximity to the Plant Root. *Canad. J. Microbiol.* **5**, 323.
- Emery T. und J.B.Neilands. 1959. The Iron-Binding Centre of Ferrichrome Compounds. *Nature* **184**, 1632.
- — 1960. Contribution to the Structure of the Ferrichrome Compounds: Characterization of the Acyl Moieties of the Hydroxamate Functions. *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 3658.
- — 1961. Structure of the Ferrichrome Compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 1626.
- Francis J., H.M.Macturk, S.Madinaveitia und G.A.Snow. 1953. Mycobactin, a Growth Factor for *Mycobacterium johnei*, I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* **55**, 596.
- Garibaldi J.A. und J.B.Neilands. 1955. Isolation and Properties of Ferrichrome A. *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 2429.
- Gause G.F. 1955. Recent Studies on Albomycin, A New Antibiotic. *Brit. Med. J.* **1177**.
- und M.G.Brazhnikova. 1951. Die Wirkung von Albomycin gegen Bakterien. *Nov. Med. (Moskau)* **23**, 3.
- Godin P. 1953. Etude du métabolisme ternaire de *Penicillium brevi-compactum*. *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 114.
- Halliwell G. 1952. Chromatographic Detection of Acids in Cultures of *Aspergillus niger* on Various Substrates. *Nature* **169**, 1063.
- Haskell T.H., R.H.Bunge, J.C.French und Q.R.Bartz. 1963. Succinimycin, A New Iron-Containing Antibiotic. *J. Antibiotics (Japan) Ser. A*, **16**, 67.
- Hendlin D. und A.L.Demain. 1959. An Absolute Requirement for "Iron Transport Factors" by *Microbacterium lacticum* 8181. *Nature* **184**, 1894.

- Hesseltine C.W., C.Pidacks, A.R.Whitehill, N.Bohonos, B.L.Hutchings und J.H.Williams. 1952. Coprogen, a New Growth Factor for Coprophilic Fungi. J.Amer. Chem. Soc. **74**, 1362.
- A.R.Whitehill, C.Pidacks, M.T.Hagen, N.Bohonos, B.L.Hutchings und J.H.Williams. 1953. Coprogen, a New Growth Factor Present in Dung, Required by *Pilobolus* Species. Mycologia **45**, 7.
- Keller-Schierlein W. und V.Prelog. 1962. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 34. Mitt. Ferrioxamin G. Helv. Chim. Acta **45**, 590.
- — und H.Zähner. 1964. Siderochrome. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe (Zechmeister) **22**, 279.
- Knüsel F. und J.Nüesch. 1965. Mechanism of Action of Sideromycins. Nature **206**, 674.
- Kuehl F.A., M.N.Bishop, L.Chaiet und K.Folkers. 1951. Isolation and Some Chemical Properties of Grisein. J. Amer. Chem. Soc. **73**, 1770.
- Lochhead A.G. 1957. Qualitative Studies of Soil Microorganisms. XV. Capability of the Predominant Bacterial Flora for Synthesis of Various Growth Factors. Soil Sci. **84**, 395.
- 1958. Two New Species of *Arthrobacter* Requiring Respectively Vitamin B₁₂ and the Terregens Factor. Arch. Mikrobiol. **31**, 163.
- und M.O.Burton. 1953a. An Essential Bacterial Growth Factor Produced by Microbial Synthesis. Canad. J. Bot. **31**, 7.
- — 1953b. A Bacterial Growth Factor Produced by a Soil Organism. Atti VI° Congr. Internaz. Microbiol., Roma, Vol. I, Sez. I, 298.
- — und R.H.Thexton. 1952. A Bacterial Growth Factor Synthesized by a Soil Bacterium. Nature **170**, 282.
- und F.D.Cook. 1961. Microbial Growth Factors in Relation to Resistance of Flax Varieties to *Fusarium* Wilt. Canad. J. Bot. **39**, 7.
- Lugg J.W.H. und B.T.Overell. 1947. Partition Chromatography of Organic Acids on a Paper Sheet Support. Nature **160**, 87.
- Lyr H. 1953. Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*. Arch. Mikrobiol. **19**, 402.
- Mikes O. und J.Turková. 1964. Hydroxamáty a jejich zelezité komplexy – nový typ přírodních látek (Hydroxamate und ihre Eisenkomplexe, ein neuer Typus von Naturstoffen). Chem. Listy **58**, 65.
- Neilands J.B. 1952. A Crystalline Organo-Iron Pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4846.
- Padmanaban G. und P.S.Sarma. 1964. A New Iron-Binding Compound from Cobalt-Toxic Cultures of *Neurospora crassa*. Arch. Biochem. Biophys. **108**, 362.
- — 1965. Studies on Iron Metabolism in *Neurospora crassa*. Arch. Biochem. Biophys. **111**, 147.
- Page R.M. 1952. The Effect of Nutrition on Growth and Sporulation of *Pilobolus*. Amer. J. Bot. **39**, 731.
- Pidacks C., A.R.Whitehill, L.M.Pruess, C.W.Hesseltine, B.L.Hutchings, N.Bohonos und J.H.Williams. 1953. Coprogen, the Isolation of a New Growth Factor Required by *Pilobolus* Species. J. Amer. Chem. Soc. **75**, 6064.
- Prelog V. 1963a. Iron-Containing Compounds in Micro-organisms. In: Sympos. Iron Metabolism, Aix-en-Provence. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 1963b. Iron-Containing Antibiotics and Microbic Growth Factors. Pure Appl. Chem. **6**, 327.

- Reynolds D.M., A.Schatz und S.A.Waksman. 1947. Grisein, a New Antibiotic Produced by a Strain of *Streptomyces griseus*. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **64**, 50.
- Sensi P. und M.T.Timbal. 1958. Isolation of Two Antibiotics of the Grisein and Albomycin Group. Antibiot. and Chemother. **9**, 160.
- Snow G.A. 1954a. Mycobactin. A Growth Factor for *Mycobacterium johnei*. Part II. Degradation and Identification of Fragments. J. Chem. Soc. (London), 2588.
- 1954b. Mycobactin. A Growth Factor for *Mycobacterium johnei*. Part III. Degradation and Tentative Structure. J. Chem. Soc. (London), 4080.
- Stapley E.O. und R.E.Ormond. 1957. Similarity of Albomycin and Grisein. Science **125**, 587.
- Walker T.K., A.N.Hall and J.W.Hopton. 1951. Chromatographic Detection of Pyruvic, Dimethylpyruvic and α -Ketoglutaric Acids in Cultures of *Aspergillus niger* on Various Substrates. Nature **168**, 1042.
- Waksman S.A. 1957. Penalty of Isolationism. Science **125**, 585.
- Zähner H. 1965. Biologie der Antibiotica. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- E.Bachmann, R.Hütter und J.Nüesch. 1962. Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. Path. Microbiol. **25**, 708.
- R.Hütter und E.Bachmann. 1960. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. **36**, 325.
- W.Keller-Schierlein, R.Hütter, K.Hess-Leisinger und A.Deér. 1963. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 40. Mitt. Sideramine aus Aspergillaceen. Arch. Mikrobiol. **45**, 119.