

Zur Kenntnis der Hemmstoffbildung und des Hemmstoffes von *Aspergillus clavatus* und *Penicillium expansum**.

Von

G. Gorbach, M. Vicari und G. Dedic.

Aus dem Institut für biochemische Technologie und Lebensmittelchemie
der Technischen Hochschule Graz.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 9. Jan. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 17. Jan. 1952.)

Durch die Entdeckung *A. Flemings*¹ im Jahre 1929 über die antibiotische Kraft eines pilzlichen Naturstoffes, des späteren Penicillins, wurde schlagartig das Interesse der Wissenschaft für Entstehung und Wirkungsweise, vornehmlich der mikrobiellen Antibiosen, geweckt. Wenn auch aus der Fülle der nun in den letzten drei Dezennien isolierten antibiotischen Naturstoffe nur wenige für die praktischen Zwecke der Medizin und Landwirtschaft Bedeutung erlangt haben, so tragen doch alle solche Untersuchungen dazu bei, das Stoffwechselgeschehen im Haushalt dieser niederen Pflanzen aufzuklären.

In den Jahren 1940 bis 1943 wurden von einigen Forschern, unter anderem von *Chain*², von *Waksman*³, von *Bergel* und Mitarbeitern⁴, aktive Kulturfiltrate aus Kulturen des *P. claviforme*, *P. expansum*, *P. patulum* oder *A. clavatus* isoliert und daraus zum Teil kristallisierte aktive Produkte gewonnen, die unter den Namen Claviformin, Expansin, Patulin, Clavatin in die Literatur eingegangen sind und von denen man annahm, daß sie alle identisch wären.

* Herrn Prof. Dr. *A. Zinke* zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ *A. Fleming*, Brit. J. exp. Pathol. **10**, 226 (1929).

² *E. Chain*, *F. W. Florey* und *M. A. Jennings*, Brit. J. exp. Pathol. **23**, 202 (1942).

³ *S. A. Waksman*, *E. S. Hornig* und *E. L. Spencer*, J. Bacteriol. **45**, 233 (1943).

⁴ *F. E. Bergel* und Mitarbeiter, Nature (London) **152**, 750 (1943).

1. Isolierung der Versuchsstämme und deren Eigenschaften.

Wir haben einen als Luftinfektion auf verdorbener Schokolade aufgefundenen Stamm von *A. clavatus* und einen als Luftinfektion auf einer Gummilösung festgestellten Stamm von *P. expansum*, der besonders durch seine Coremienbildung auffiel, isoliert und über eine Reihe von Passagen rein gezüchtet. Mit Hilfe der üblichen Spezialnährböden und der einschlägigen Fachliteratur⁵ konnten sie als die zwei eben genannten Pilzarten identifiziert werden. Ihre Fähigkeit, antibakteriellen Hemmstoff zu produzieren, wurde im Plattenwachstumstest auf Bierwürze-

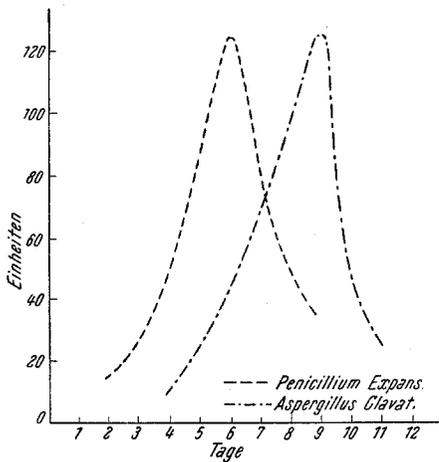


Abb. 1. Abhängigkeit der Hemmstoffbildung des *A. clavatus* und *P. expansum* von der Kulturdauer.

Bouillon-Agarplatten gegen verschiedene Staphylokokkenstämme erkannt. Zur Feststellung der Stärke ihrer Hemmkraft wurde die quantitative Verdünnungsmethode nach Weindling⁶ verwendet, welche die Berechnung einer Einheitenzahl für ein von der Pilzdecke befreites Kulturfiltrat gestattet.

2. Einfluß des pH-Wertes und der Kulturdauer auf die Hemmstoffbildung.

Mit Hilfe dieses Verdünnungsverfahrens stellten wir zunächst mit viergrädiger Bierwürze als Nährmedium das Wachstum und die maximale Hemmstoffproduktion in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der Nährbodenreaktion für beide Pilze fest.

Aus den graphischen Darstellungen (Abb. 1 und 2) ist ersichtlich, daß unter solchen Bedingungen *P. expansum* bereits am 6. Tag bei einer Reaktion von pH 3,7 die maximale Hemmstoffkonzentration von 125 Einheiten im Filtrat erreicht, während *A. clavatus* erst am 9. Tag bei pH 4,2 dieselbe maximale Einheitenzahl aufweist.

Die Überprüfung der Hemmstoffe auf ihre bakteriziden Eigenschaften wurde am 6. bzw. 9. Tag mit den Kulturfiltraten in einer mit *Staphylococcus aureus* beimpften Verdünnungsreihe in Nährbouillon durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Einheiten bis 66 als bakterizid, die Einheiten über 66 als bakteriostatisch.

⁵ Ch. Thom und K. B. Raper, Manual of the Penicilli, Manual of the Aspergilli.

⁶ R. Weindling und O. H. Emerson, Phytopathology 26, 1068 (1936).

3. Einfluß von Belüftung und UV-Bestrahlung auf die Hemmstoffbildung des *A. clavatus*.

Es wurden den mit Pilzmaterial beimpften flüssigen Würzekulturen einerseits sterile Luft, andererseits reiner Sauerstoff in variierender Menge zugeführt. Eine nennenswerte Wirkung auf die Hemmstoffproduktion konnte nicht festgestellt werden.

Der Versuch, durch ultraviolette Strahlen, auf Grund der in der Fachliteratur unter anderem von *Nadson* und *Phillippow*⁷ beschriebenen stimulierenden Wirkung von UV-Strahlen auf das Wachstum von Mikroorganismen, eine Aktivitätssteigerung zu erreichen, schlug fehl. Es wurden hierbei im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 m μ Flüssigkeitskulturen im Alter von 2, 4 und 6 Tagen durch 12 Sek. unter Kühlung, und Plattenkulturen im Alter von 2 und 4 Tagen durch 10 und 20 Sek. bestrahlt. Die Bestrahlung der Plattenkulturen erfolgte sowohl bei geschlossenem Schalendeckel durch das Glas, als auch bei offenem Deckel direkt auf die Pilzdecke. In allen Fällen fand keine nennenswerte Veränderung des Pilzwachstums, wohl aber ein Absinken der Aktivität des Hemmstoffes, beispielsweise bei Kulturfiltraten von ursprünglich 125 auf nur 25 Einheiten statt.

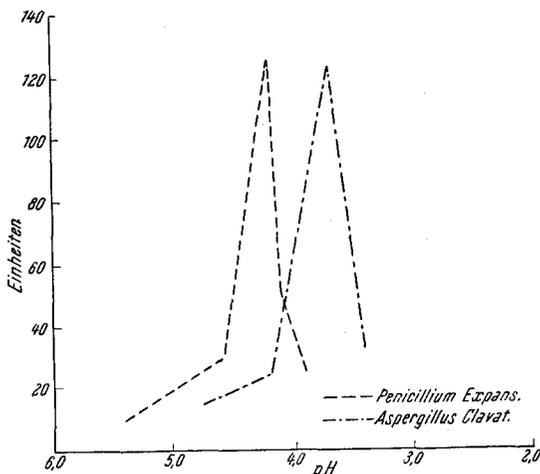


Abb. 2. Abhängigkeit der Hemmstoffbildung des *A. clavatus* und *P. expansum* von der Nährbodenreaktion.

4. Einfluß der Ernährungsbedingungen für Wachstum und Hemmstoffbildung des *A. clavatus*.

Zur Isolierung der Hemmstoffe war es zuvor erforderlich, die zur Gewinnung aktiver Kulturfiltrate notwendigen Ernährungsbedingungen des Pilzes zu studieren.

a) Vitamine.

Zunächst untersuchten wir den Einfluß von Vitaminen der B-Gruppe. Dabei wurden Aneurin, Riboflavin, Nikotinsäure und Vitamin B₆ in

⁷ G. A. Nadson und G. Phillippow, Röntgenol. Radiol. 5, 6 (1927).

einer Konzentration von 0,12 bis 0,37 $\frac{0}{100}$ geprüft und bei günstigem Wachstum eine geringe, aber nachweisbare Abnahme des Hemmstoffes gegenüber den vitaminfreien Kontrollen festgestellt.

b) Spurenelemente.

Es interessierte uns noch, ob Spurenelemente in der Bierwürze die Hemmstoffbildung beeinflussen, wozu das Anreicherungsverfahren nach *Pohl*⁸, welches noch Konzentrationen von 10⁻⁶ festzustellen gestattet,

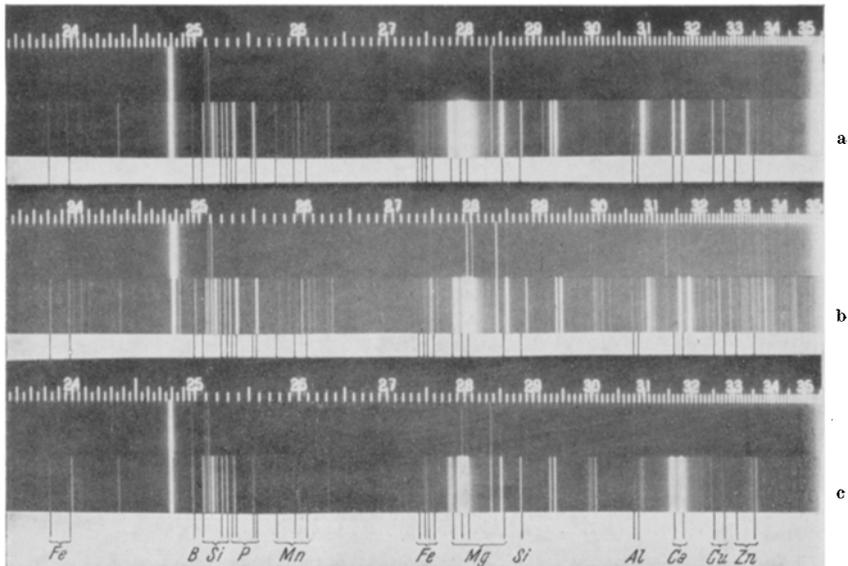


Abb. 3. Spektrogramm a) der als Nährlösung verwendeten Bierwürze, b) der Pilzdecke und c) des Kulturfiltrates von Bierwürze-Kulturen des *A. clavatus*.

diente. Hierbei konnten in allen untersuchten Proben nachstehende Elemente nachgewiesen werden: Calcium, Kalium, Magnesium, Phosphor, Silizium und die Spurenelemente Aluminium, Bor, Kupfer, Eisen, Zink und Mangan. Ihre Linien sind in den folgenden Spektrogrammen (Abb. 3) gekennzeichnet.

Es zeigte sich, daß sämtliche aus 100 ml Bierwürze angereicherten Spurenelemente mit nur wenig verminderter Konzentration auch in 100 ml Kulturfiltrat zu finden waren. Das Spektrogramm der Pilzdecke läßt erkennen, daß alle diese Elemente auch in die Körpersubstanz aufgenommen werden. Ein Einfluß auf die Hemmstoffbildung ist nicht ersichtlich. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen noch im Gange.

⁸ *F. Pohl*, Dissertation Techn. Hochschule Graz (1950).

c) *Synthetische Nährlösungen.*

Beobachtungen, daß die Bierwürze unter gleichen Zuchtbedingungen verschieden wirksame Kulturfiltrate liefert, führten dazu, an ihrer Stelle synthetische Nährlösungen zu verwenden. Auf Grund eigener Untersuchungen und verschiedenster jüngster Hinweise in der Literatur scheint die überaus günstige Wirkung natürlicher pflanzlicher Substrate als Schimmelpilznahrung ihrer Stickstoffkomponente, und davon vorwiegend deren organischem, niedermolekularem Anteil, den Aminosäuren und Dipeptiden, zuzukommen. Die Arbeiten von *White*⁹, *Halpern*¹⁰, *Wolf*¹¹ und von *Fromageot*, *Justisz* und *Tessier*¹² beleuchten beispielsweise die Förderung der Penicillinbildung durch gewisse Aminosäuren beim Wachstum in einem synthetischen Nährboden.

Wir prüften nun zunächst die in der Literatur bekannten und bei *Baman-Myrbäck*¹³ zur Schimmelpilzzüchtung angegebenen Nährlösungen nach *Raulin*, *Czapek-Dox*, *Wehmer* und *Henneberg*. *A. clavatus* entwickelte sich gut darin, die gewonnenen Kulturfiltrate waren aber sämtlich inaktiv. Auch Hefeextrakt als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle ergab Kulturfiltrate von nur geringer Hemmwirkung. Das gleiche beobachteten *Lochhead* und *Chase*¹⁴ bei einer nicht näher identifizierten *Aspergillenart*.

Erst bei Verwendung des von *Gorbach*¹⁵ nach *Meyer* modifizierten mineralischen Nährbodens war es möglich, in jedem Fall höher aktive Nährlösungen zu erhalten. Unter den Stickstoffquellen überprüften wir zunächst die Verwertbarkeit von Pepton und von Kasein, wobei wir feststellten, daß bereits eine Menge von 0,25% für das Wachstum und eine Hemmstoffbildung von 66 bis 83 Einheiten ausreichen. Wird diese optimale Konzentration über- oder unterschritten, so wird, wie nach dem Maximum- und Minimumgesetz verständlich ist, die Hemmstoffbildung herabgesetzt. Diese Versuche zeigen jedenfalls deutlich die Wichtigkeit einer geeigneten Stickstoffquelle auf. Dies führte dazu, daß wir auch die im Kasein nach Hydrolyse erhältlichen Aminosäuren einzeln auf ihre Fähigkeit, die Hemmstoffbildung von *A. clavatus* zu beeinflussen, untersuchten. Die Zusammensetzung des Kaseins ist nach

⁹ *A. G. White*, *L. O. Krampitz* und *G. H. Werksman*, Arch. Biochem. **8**, 303 (1945).

¹⁰ *P. E. Halpern* und Mitarbeiter, Science (New York) **102**, 230 (1945).

¹¹ *F. T. Wolf*, Arch. Biochem. **16**, 143 (1948).

¹² *Cl. Fromageot*, *M. Justisz* und *P. Tessier*, Bull. Soc. Chim. biol. **31**, 689 (1949).

¹³ *E. Baman-Myrbäck*, Methoden der Fermentforschung, Bd. II, S. 1306. 1941.

¹⁴ *A. G. Lochhead*, *F. E. Chase* und *J. B. Landerkus*, Canad. J. Res., Sect. E **24**, 1 (1946).

¹⁵ *G. Gorbach* in *M. Vicari*, Dissertation Univ. Graz (1951).

der Literatur heute bereits weitgehend bekannt. Nach *Karrer*¹⁶ ist in der Hauptmenge Glutaminsäure mit etwa 13,5% vorhanden, und in absteigender Linie folgen Leucin, Valin, Prolin, Histidin, Phenylalanin, Alanin, Isoleucin, Asparaginsäure, Tryptophan und Cystin.

Wir haben nun an Oberflächenkulturen die Wirkung dieser Aminosäuren im obgenannten Nährmedium nach *Gorbach-Meyer* in 1%iger Konzentration geprüft. Die Ergebnisse hinsichtlich Wachstum und Hemmstoffkonzentration sind in der Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Wachstum und Hemmstoffbildung des *A. clavatus* in synthetischer Nährlösung mit den Aminosäuren des Kasein als Stickstoffquelle.

Zusammensetzung des Kasein nach <i>Karrer</i>		<i>Aspergillus clavatus</i>		
Aminosäuren	%	Makroskop. Beurteilung des Wachstums	Maximale Hemmstoffkonz. in Einheiten	pH des Filtrates
Glutaminsäure	13,5	gut	66	4,2
Prolin	6,7	sehr gut	50	5,0
Alanin	1,5	gut	50	4,6
Valin	7,2	gut	15	4,8
Phenylalanin	3,2	mittelmäßig	15	4,4
Asparaginsäure	1,39	sehr gut	15	4,8
Leucin	7,92	mittelmäßig	0	4,6
Tryptophan	0,7	schwach	0	4,8
Cystin	0,23	sehr gut	0	4,6
Histidin	5,9	0	0	5,4
Isoleucin	1,43	0	0	5,2

Eindeutig kann festgestellt werden, daß in einem sonst optimalen Nährmedium einzelne Aminosäuren als Stickstoffquelle für das Wachstum, nicht aber für die optimale Hemmstoffbildung genügen. Die günstige Wirkung des Kaseins ist nach diesen Ergebnissen offenbar auf die Glutaminsäure zurückzuführen, die bei einem guten Wachstum auch maximale Hemmstoffmengen ergab.

Interessant ist die Ausbildung der Pilzdecken, die wir bei diesen Oberflächenkulturen erhielten. Sie zeigen rein äußerlich schon die große Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die Festigkeit und das Aussehen des Pilzmycels, wie auch für die Fruktifikation. Die Glutaminsäure, welche die beste Hemmstoffbildung bewirkt, ergibt eine Pilzdecke, die sehr zäh und stark gefurcht ist. Die Decke zieht sich buchstäblich zusammen. Die Fruktifikation war sehr gut. Es bilden sich unter diesen Bedingungen kräftig entwickelte, hochaufragende, tiefdunkle Köpfchen.

Hinsichtlich der Hemmstoffbildung sind weiter Prolin und Alanin

¹⁶ *P. Karrer*, Lehrbuch der organischen Chemie.

günstig, die beide ein sehr gutes bzw. gutes Wachstum zeigen. Die Deckenbildung mit Prolin ist derjenigen auf Bierwürze ähnlich, während wir an der Pilzdecke bei Alanin als Stickstoffquelle eine gefurchte, nicht völlig geschlossene, jedoch zartere Decke mit reicher Fruktifikation beobachten. Die kurzen, gedrungen gebauten Konidienträger tragen an den Sterigmen zahlreiche, kräftig grün gefärbte Konidien.

Demgegenüber weisen Valin, Phenylalanin und Asparaginsäure bei befriedigendem bis sehr gutem Wachstum nur mehr 15 Einheiten im Filtrat auf. Bei Anwesenheit der Asparaginsäure wachsen auf einer gefurchten, aber geschlossenen starken Pilzdecke dichte Massen an gedrungen gebauten, deutlich blaugrünen *Clavatus*-Köpfchen.

Leucin, Tryptophan und Cystin gestatten eine mäßige bis sogar sehr gute Entwicklung des Pilzes, ohne dabei die Bildung von Hemmstoff zu ermöglichen. Besonders auffällig ist das von den bisher genannten abweichende Kulturbild auf Cystin. Auf einer eher zarten, völlig glatten und geschlossenen Myceldecke richten sich in großer Zahl sehr regelmäßig gestaltete, tiefgrün bis schwarzgrün gefärbte Köpfchen auf. Das mikroskopische Bild dieser Kultur vermittelt ein an Zellinhaltsstoffen und Vakuolen äußerst reiches Mycel.

Die Aminosäuren Histidin und Isoleucin schließlich unterbinden jegliches Wachstum und natürlich auch die Hemmstoffbildung. In solchen Nährlösungen konnten wir beobachten, daß die verimpften Konidien ohne Keimung eine Volumsvergrößerung auf das rund Fünffache erfahren und dann absterben.

Tabelle 2. Vergleich von Wachstum und Hemmstoffbildung des *A. clavatus* in synthetischer Nährlösung mit Kasein als Stickstoffquelle und in Bierwürze.

Gesamtgehalt an Aminosäuren		<i>Aspergillus clavatus</i>		
in der synthetischen Kasein-Nährlösung, berechnet nach Karrer	in der Bierwürze-Kultur, berechnet nach Lüers	Makroskop. Beurteilung des Wachstums	Maximale Hemmstoffkonz. des Filtrates in Einheiten	pH des Filtrates
0,64 ⁰ / ₁₀₀	—	gut	66	4,4
—	0,14 ⁰ / ₁₀₀	sehr gut	83 ± 125	4,9

Trotz der Schwankungen, welche die Pilzfiltrate aufweisen, kann man feststellen (Tabelle 2), daß im Durchschnitt die maximal erreichbaren Einheiten bei Bierwürze wesentlich höher liegen als bei einer synthetischen Nährlösung mit Kasein. Dabei enthält die verwendete Bierwürze beträchtlich weniger Aminosäuren. Es zeigt sich also, daß eine Reihe von Einflüssen, die in dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt sind, in diesen natürlichen Nährmedien fördernd auf die Hemmstoff-

bildung wirken. Auch das Kulturbild auf Bierwürze ist ein üppigeres als bei Kasein. Während im synthetischen Medium mit Kasein als Stickstoffquelle eine mehr zarte, geschlossene Decke, mäßig mit zarten, aber gut ausgebildeten blaugrünen Köpfchen besiedelt, gebildet wird, ist die Myceldecke auf Bierwürze reichlichst mit gleichmäßig und gut ausgebildeten deutlich blaugrünen Kolben besetzt. Trotzdem erscheint für die Versuche zur Gewinnung der Hemmstoffe die synthetische Nährlösung vorteilhaft, da die bereits erwähnten erheblichen Chargenunterschiede auf Bierwürze damit ausgeschaltet werden können. Die folgenden Isolierungsversuche wurden noch mit Bierwürze durchgeführt.

5. Isolierung der Hemmstoffe aus Kulturfiltraten des *P. expansum* und *A. clavatus*.

Unter den anfangs für Bierwürze ermittelten Kulturbedingungen schritten wir nun an die Isolierung des kristallisierten Hemmstoffes aus 1000 ml aktiven Filtrates von je 125 Einheiten. Jedes Material wurde im *Claisen*-Kolben bei vermindertem Druck und der Temperatur von 60 bis 70° C auf 50 ml eingeeengt, wobei der *Bondi*-Test¹⁷ zur Überprüfung der fortschreitenden Konzentrierung des Hemmstoffes diente. Während das nicht eingeeengte, ursprüngliche Filtrat bei dieser Testmethode einen Hemmungshof von nur 2 mm ergab, erhielten wir beim Konzentrat zuletzt einen solchen von 10 mm. Der Hemmstoff wurde nun aus dem Konzentrat mit der 5fachen Menge wasserfreien Äthers ausgeschüttelt und die ätherische, hemmstoffhaltige Lösung mit entwässertem Natriumsulfat durch 12 Stdn. getrocknet. Nach weiterer Einengung der ätherischen Lösung auf 10 ml erhielten wir eine hellgelbe, zähflüssige Lösung. Zur völligen Befreiung von noch vorhandenen Wasserresten wurde die Behandlung mit wasserfreiem Äther und Natriumsulfat wiederholt. Der danach ätherfrei gemachte Rückstand trocknete im Exsikkator über Silicagel. Nach mehreren Tagen kristallisierten an der Oberfläche dieses sirupösen Rückstandes plättchenförmige Kristalle aus. Nach abermaliger Aufnahme des gesamten Rückstandes in wasserfreiem Äther wurden die unlöslich gebliebenen braunen Substanzteile abfiltriert. Es kristallisierte dann aus den Filtraten neuerlich der Hemmstoff rein aus.

In Tabelle 3 sind nun das Verhalten im polarisierten Licht sowie die chemischen Eigenschaften des Hemmstoffes aus beiden Kulturen niedergelegt. Es zeigt sich, daß die Kristallform, der Schmelzpunkt und die Löslichkeit in beiden Fällen gleich sind, so daß der Schluß viel Berechtigung besitzt, daß es sich in beiden Fällen um den gleichen Hemmstoff handelt. Auch die pH-Abhängigkeit der Thermolabilität ist, wie aus hier nicht näher angeführten Kurven hervorgeht, nahezu die gleiche.

¹⁷ N. Bondi, *Antibiotics*, Bd. I. Oxford: Univ. Press. 1949.

Die größte Thermolabilität besitzt der Hemmstoff in beiden Fällen bei pH 4,8 bis 5,0.

Tabelle 3. Chemische und optische Eigenschaften der Hemmstoffkristalle des *A. clavatus* und des *Pen. expansum*.

Eigenschaften der Kristalle	<i>A. clavatus</i>	<i>P. expansum</i>
Fp.:		
Hitzeempfindlichkeit .	zirka 110° C	110—112° C
Maximum bei	pH 5,0	pH 4,8
Kristallform	prismatische Platten, optisch-aktiv	prismatische Platten, optisch-aktiv
Löslichkeit:		
sehr gut in	Wasser	Wasser
gut in	Äther, Chloroform, Tri- chloräthylen, Benzol, Butyl-Amylalkohol	Äther, Chloroform, Tri- chloräthylen, Benzol, Butyl-Amylalkohol

Tabelle 4. Hemmwirkung der kristallisierten Hemmstoffe des *A. clavatus* und des *Pen. expansum*.

Eigenschaften	Kristallisierter Hemmstoff des	
	<i>A. clavatus</i>	<i>P. expansum</i>
Hemmwirkung: aktiv . .	verschiedene Stämme von <i>Staphyl. pyogen.</i> <i>aureus</i>	verschiedene Stämme von <i>Staphyl. pyogen.</i> <i>aureus</i>
inaktiv.	<i>B. pyocyaneus</i> <i>B. subtilis</i>	<i>B. pyocyaneus</i> <i>B. subtilis</i>

Auch hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens sind die Hemmstoffe, wie die diesbezügliche Tabelle 4 veranschaulicht, gleichartig. Jedenfalls wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, daß die in der Literatur getrennt geführten Hemmstoffe Clavatin und Expansin offenbar identisch sind.

Zusammenfassung.

Die Gewinnung aktiver Kulturfiltrate aus Kulturen des *A. clavatus* und *P. expansum* wird beschrieben. Der Einfluß verschiedener äußerer und Ernährungsbedingungen, besonders die Anwesenheit des Kasein und seiner Aminosäuren für das Wachstum und die Hemmstoffbildung von *A. clavatus* wurden studiert und dabei die günstige Wirkung von Glutaminsäure festgestellt. Aus aktiven Kulturfiltraten der zwei Pilze erfolgt die Isolierung der kristallisierten Hemmstoffe. Die gleichartigen chemischen und biologischen Eigenschaften der Hemmstoffkristalle wurden beschrieben und daraus gefolgert, daß es sich in beiden Fällen offenbar um denselben Hemmstoff handelt.