

Zur Verfahrenstechnik der Antibiotika-Fermentation

Von R. Kreutzfeldt^[*]

Die industrielle Fermentation hat insbesondere durch die Antibiotika-Produktion erheblich an Bedeutung gewonnen. In den letzten 25 Jahren wurden etwa 1000 Antibiotika gefunden, etwa 50 — darunter vor allem die Penicilline, Tetracycline und Streptomycine — haben wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Die USA stellten 1964 etwa 3000 t Antibiotika (ca. 50 % der Weltproduktion) im Wert von ca. 400 Millionen \$ her. Die Weltproduktion an Penicillinen kann auf etwa 1500 t/Jahr geschätzt werden.

Das Penicillin-Verfahren gehört trotz langjähriger Erfahrung zu den schwierigsten und empfindlichsten. *Flemming* erreichte bei seinen ersten Fermentationen Ausbeuten von 2–10 E/ml; heute sind 10000 E/ml als normal zu betrachten. Die Fermentationen aller Antibiotika verlaufen in technisch ähnlicher Weise. Die Technik der Penicillin-Fermentation sei hier näher betrachtet.

Der Penicillin-Bildner wird als Dauerkultur in wasserfreiem Zustand bei etwa -5°C aufbewahrt, um jeden Stoffwechsel auszuschalten. Aus der Dauerkultur werden im Laboratoriumsmaßstab Vermehrungskulturen angelegt, die in Vorkräutern weitergezüchtet werden. Die Impfmenge für den Hauptfermenter wird zwischen 2 und 20 % der zu erntenden Menge gewählt; größere Impfmengen verkürzen die Fermentationszeit.

Die Fermenter sind mit einem Belüftungssystem, einem Rührwerk sowie einem Kühlsystem, das die Temperatur auf $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ konstant zu halten gestattet, ausgerüstet. Zwischen Sauerstoffversorgung und Penicillinbildung besteht ein enger Zusammenhang. Heute können Fermenter von 400 m^3 betriebssicher eingesetzt werden. Die Antibiotika-Fermentation muß unter Ausschluß von Fremdinfectionen durchgeführt werden. Für Großproduktionen kommt dazu nur die Sterilisation durch Dampf in Betracht (mindestens 120°C über mindestens 20 min).

Fermentationsbedingungen: 7 Tage bei $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; $0,3 \text{ m}^3$ Luft pro 1 m^3 Nährösung und pro min. Für die Erzeugung von 100 kg (Ausb. 4,3 %) Penicillin-Na werden benötigt:

[*] Dr. R. Kreutzfeldt
Farbwerke Hoechst A.G.
Pharma-Fabrik/Antibiotika-Betriebe
6230 Frankfurt/(M)-Höchst, Postfach 70

1200 kg Kohlenhydrate, 60 kg tierische und pflanzliche Fette, 770 kg Cornsteep^[**], 220 kg anorganische Substanzen (als Puffer, Schwefel- und Phosphorquelle) und 100 kg Phenyllessigsäure zur Bildung von Penicillin G.

Die Stoffbilanz der Penicillin-Fermentation für diesen Rohstoffeinsatz von 2350 kg lautet: 100 kg Penicillin-Na (4 Gew.-%), 825 kg Pilzmycel (35 %), 660 kg Restsubstanzen in der Kulturlösung (28 %), 765 kg CO_2 (33 %).

Energiestoffwechsel der Penicillin-Fermentation (Verbrennungswärmen der Rohstoffe und der Stoffwechselendprodukte werden einander gegenübergestellt; mechanische Energie, die z.B. durch Rühren der Kulturlösung als Wärme zugeführt wird, bleibt unberücksichtigt):

Energiemenge gespeichert in:	kcal	%
Penicillin-Na	586000	7
Pilzmycel	2805000	33
Restsubstanzen in Kulturlösung	1923000	23
abgegebener Verbrennungswärme	3147000	37
insgesamt umgesetzte Energiemenge d. Rohstoffe	8461000	100

Weiterhin sind pro 100 kg Penicillin aufzuwenden: 3000 kWh elektrischer Energie (hauptsächlich zum Rührwerk antrieb), 4 t Dampf (Sterilisation und Siegelung), 50000 Nm^3 Bruttluft, 900 m^3 Kühlwasser (Kühlung der sterilisierten Lösung, Abführung der durch Rührung und biochemische Verbrennung erzeugten Wärme). Die Betriebskosten der Penicillin-Fermentation (ohne Amortisation) gliedern sich folgendermaßen: für Rohstoffe 50 %, für Energien 20 %, für Reparaturen 10 %, Personalkosten 15 %, sonstige Kosten 5 %.

Diese komplizierten biologischen Verfahren sind sehr störungsfähig und bedürfen eingehender Überwachung und genauer analytischer Kontrolle. Auch bei gut eingefahrenen Fermentationsprozessen muß mit Ausbeuteschwankungen von $\pm 15\%$ gerechnet werden. Im allgemeinen wirken sich folgende Faktoren aus: Veränderung des *Penicillium*-Stammes oder der Rohstoffqualität, Infektionen durch Fremdkeime, Bedienungsfehler und technische Störungen. Die Qualität der Rohstoffe ist für die Fermentationsausbeuten ausschlaggebend. Die größtenteils eingesetzten Naturprodukte werden daher analytisch und biologisch getestet.

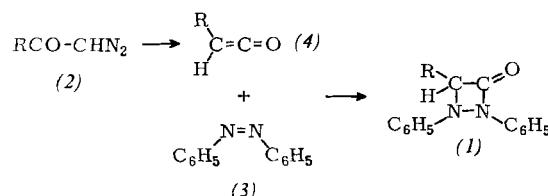
[129. Dechema-Kolloquium, am 21. Oktober 1966
in Frankfurt/M.]

[VB 57]

[**] Unter Cornsteep versteht man ein Nebenprodukt der Maisstärkeherstellung mit einem hohen Gehalt an Aminosäuren und Nährsalzen.

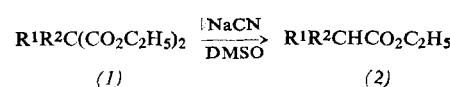
RUND SCHAU

1,2-Diazetidinone (1) synthetisierten *W. Fischer* und *E. Fahr* durch Bestrahlung von Diazoketonen (2) in CH_2Cl_2 in Gegenwart von Azobenzol (3) mit einem Hg-Hochdruckbrenner. Die primär gebildeten Aldoketene (4) addieren sich hierbei an Azobenzol. (1) sind schwach gelbe oder farblose Substanzen, die aus Äthanol umkristallisiert werden können.



Beispiele: $\text{R} = m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$, $\text{Fp} = 125^{\circ}\text{C}$, Ausbeute 43 %; $p\text{-ClC}_6\text{H}_4$, $\text{Fp} = 131^{\circ}\text{C}$, 42 %; $\alpha\text{-Naphthyl}$, $\text{Fp} = 147^{\circ}\text{C}$, 30 %; $m\text{-CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4$, $\text{Fp} = 142^{\circ}\text{C}$, 57 %. / Tetrahedron Letters 1966, 5245 / -Ma. [Rd 613]

Eine neue Methode zur Umwandlung geminaler Bis(äthoxy-carbonyl)-Verbindungen (1) in Äthylester (2) geben *A. P. Krapcho*, *G. A. Glynn* und *B. J. Grenon* an. Bei ca. vierstündigem Erhitzen von (1) mit mindestens einem Äquivalent NaCN in Dimethylsulfoxid auf ca. 160°C werden die Ester (2) mit guter Ausbeute erhalten. Diese einfache Methode ist dem klassischen Verfahren der Decarboxylierung überlegen.

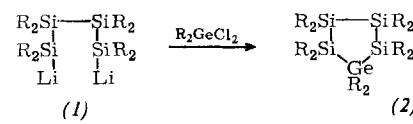


Beispiele: 1,1-Cyclobutandicarbonsäure-diäthylester \rightarrow Cyclobutancarbonsäure-äthylester (75 % Ausbeute); 1,1-Cyclopentandicarbonsäure-diäthylester \rightarrow Cyclopentancarbonsäure-äthylester (75 %); $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5)_2 \rightarrow \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (80 %). / Tetrahedron Letters 1967, 215 / -Ma. [Rd 638]

Über den Einsatz gaschromatographischer Kapillarkolonnen hoher Trennleistung in direkter Kombination mit einem Massenspektrometer berichten J. A. Völlmin, I. Omura, J. Seibl, K. Grob und W. Simon. Die Anlage ermöglicht es, sowohl Kapillarkolonnen als auch gepackte Kolonnen mit einem einfach fokussierenden Massenspektrometer kombiniert im Routinebetrieb zu verwenden. Am wichtigsten ist die Anordnung des Separators, der gläsernen Verbindungsleitungen und eines Hahns auf einem mit der Ionenquelle verschraubten Träger, wodurch erreicht wird, daß die Ionenquelle zusammen mit diesen Teilen vom restlichen Massenspektrometer ohne Trennung von Glasverbindungen entfernt werden kann. Dies System läßt sich auf maximal 250 °C aufheizen. Der Wechsel von Kapillarkolonnen zu gepackten Trennsäulen ist ohne Modifikation der Anlage möglich. — Auswertung und Interpretation z.B. des Massenspektrums der Substanzen im Zigarettenrauch gelingen um wenigstens eine Größenordnung schneller als die konventionelle gas-chromatographische Charakterisierung. / *Helv. chim. Acta* 49, 1768 (1966) / —WG. [Rd 636]

Die Bildung von Dicyan-N-oxid, NC—C≡N→O (1), aus Cyanformhydroximsäurechlorid NC—C(Cl)=NOH mit tert. Aminen oder wäßrigen anorganischen Basen konnten Ch. Grundmann und H.-D. Frommelt durch typische 1,3-dipolare Additionsreaktionen nachweisen. Bei der Herstellung des Oxids in Gegenwart aktiver Dienophile wie Styrol, Acrylnitril, 1,3-Butadien, Phenylacetylen und Acetylendicarbonsäure-dimethylester wurden substituierte 3-Cyan-4,5-dihydro-1,2-oxazole oder 3-Cyan-1,2-oxazole erhalten. (1) bildet ein festes explosives Polymeres. Im Unterschied zu Di-cyan-bis-N-oxid, ONC—CNO, einem infolge der zahlreichen möglichen mesomeren Strukturen ungewöhnlich beständigen aliphatischen Nitriloxid, ist (1) wegen geringer Resonanzstabilisierung ein typisches, sehr unbeständiges aliphatisches Nitriloxid. / 152. Meeting ACS 1966, S 49 / —Ma. [Rd 612]

Tetrasilacyclopentane mit einem zusätzlichen Heteroatom im Ring stellten E. Hengge und U. Brychey dar. Vertreter dieser bisher weitgehend unerforschten Substanzklasse werden wie folgt aufgebaut: Durch Spaltung von Octaphenylcyclotetrasilan mit Halogenen oder mit Lithium entstehen bifunktionelle Tetrasilane, z.B. (1), die mit anderen bifunktionellen



R = C₆H₅

Molekülen unter Ringschluß zu den gewünschten Heterocyclen, z.B. (2), reagieren. In (2) liegt ein Heteroatom ohne freies Elektronenpaar vor. Die Verbindung ist für spektroskopische Vergleichszwecke interessant. / *Mh. Chem.* 97, 1309 (1966) / —WG. [Rd 637]

Die Aromatisierung von Cyclohexan-carbonsäure zu Benzoesäure wird von einem Enzym katalysiert, das B. M. Babior und K. Bloch aus Leber und Lebermitochondrien angereichert haben. Substrat ist Cyclohexan-carboxyl-CoA, Zwischenprodukt Cyclohexen-1-carboxyl-CoA. Die Reaktion verläuft nicht über eine Hydroxylierung und Wasserabspaltung, sondern ist eine Oxidation wie die Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenasen beim Fettssäureabbau. Als Coenzym wirkt FAD, das bei niedrigen pH-Werten entfernt werden kann. Das Enzym läßt sich dann durch FAD-Zugabe reaktivieren. Die Aromatisierung benötigt Sauerstoff, der durch 5-Methyl-phenazinium-methylsulfat und Hexacyanoferrat(III) ersetztbar ist. Die Michaeliskonstante für Cyclohexan-carboxyl-CoA ist 9,1 × 10⁻⁵, für Cyclohexen-1-carboxyl-CoA 3,4 × 10⁻⁵ mol/l. Das natürliche Substrat des Enzyms ist unbekannt. / *J. biol. Chemistry* 241, 3643 (1966) / —Hö. [Rd 634]

LITERATUR

The Molecular Orbital Theory of Conjugated Systems. Von L. Salem. W. A. Benjamin, Inc., New York-Amsterdam 1966. 1. Aufl., XVI, 576 S., zahlr. Abb., Ganzleinen \$ 22.50.

Die MO-Theorie der konjugierten Systeme ist wahrscheinlich das am weitesten ausgebauten und eines der erfolgreichsten Teilgebiete der Quantenchemie. Salem unternimmt so etwas wie den — anerkennenswerten — Versuch einer methodisch vollständigen Darstellung der Theorie auf ihrem heutigen Stand.

Ohne Vorkenntnisse der elementaren Theorie der chemischen Bindung sollte man sich nicht an die Lektüre wagen. Das erste Kapitel ist eher eine Rekapitulation der Hückelschen MO-Methode als eine Einführung in diese. Eine ernstzunehmende Begründung für die Unterscheidung zwischen σ- und π-Elektronen sowie für die grundlegend wichtige σ-π-Trennung wird leider nicht gegeben. Das ist vor allem deshalb zu bedauern, weil Teilespekte der σ-π-Trennung gegenwärtig als sehr fraglich angesehen werden und weil gemeinsame Behandlungen von σ- und π-Elektronen — wenn auch im Rahmen der σ-π-Trennung — immer mehr an Bedeutung gewinnen. Zu den grundlegenden Dingen, für die man eine stichhaltige Begründung vergeblich sucht, gehört auch die Vernachlässigung der Überlappung sowie der differentiellen Überlappung. Der kurze Abschnitt über die Elektronenkorrelation wird nur Teilespekte dieses wichtigen Begriffes gerecht.

Im 2. Kapitel ist die Zusammenstellung über die verfeinerten Methoden eher willkürlich als systematisch.

Die Stärke des Buches liegt nicht in der Diskussion grundlegender Fragen, sondern in der eingehenden Beschreibung der Anwendungen und Anwendungsmöglichkeiten der MO-Theorie. Der Verfasser geht ein auf den Zusammenhang zwischen theoretischen Delokalisierungenergien und Resonanz-

energien, die Hückelsche Regel, die semiempirische Berechnung von Dipolmomenten, Bindungslängen, Kraftkonstanten und Ionisierungsenergien. Die magnetischen Eigenschaften der π-Elektronensysteme, vor allem die „Ringströme“, die Theorie der „chemischen Verschiebungen“ sowie die „Spindichten“ und ihr Zusammenhang mit den ESR-Spektren finden besondere Beachtung. Weitere Kapitel behandeln die Theorie der chemischen Reaktivität und die der UV-Spektren ungesättigter Moleküle. Ausgiebig und mit Vorteil verwendet der Verfasser die von der „englischen Schule“ abgeleiteten einfachen, für die Hückel-MOs alternierender Kohlenwasserstoffe gültigen Regeln, z.B. das Verfahren, ohne Rechnung die Koeffizienten eines nichtbindenden MOs zu erhalten.

Das abschließende Kapitel ist außer dem Jahn-Teller-Effekt einem Phänomen gewidmet, über das der Verfasser selbst erfolgreich gearbeitet hat, nämlich der Bindungsalternierung in Polyenen und anderen konjugierten Systemen.

Obwohl das Werk recht umfangreich ist und auch auf etwas ausgefallenere Probleme, z.B. konjugierte Ringe mit d-Elektronen, eingeht, mußte die Theorie einiger interessanter ungesättigter Systeme unberücksichtigt bleiben, z.B. die der nicht-klassischen Carbonium-Ionen, ferner die Konjugation in nicht-planaren Systemen. Das Schwergewicht liegt auf der Behandlung alternierender Kohlenwasserstoffe. Von der speziellen Problematik der Theorie der Heteroaromataten spürt der Leser wenig.

Die neuere Literatur ist ausgiebig, teilweise aber in etwas willkürlicher Auswahl zitiert.

Der hohe Preis wird es dem einzelnen kaum ermöglichen, sich dieses Buch zuzulegen; chemische Institute sollten auf die in ihm enthaltenen Informationen nicht verzichten.

W. Kutzelnigg [NB 560]