

3.5-Dinitro-2-chlor-benzoessäure-methylester.

Erwärmt man 2.4 g 3.5-Dinitro-salicylsäure-methylester mit 2 g Toluolsulfochlorid und 3.5 g Diäthylanilin während 4 Stunden auf dem Wasserbade, so scheidet sich aus der braunen Schmelze der Dinitro-chlor-benzoessäure-methylester auf Zusatz von verdünnter Salzsäure als ölige, alsbald krystallinisch erstarrende Masse aus, die durch Umlösen aus Methylalkohol gereinigt wird. Es wurden 1.8 g (69 % der Theorie) an reinem, bei 88° schmelzendem, in Nadeln krystallisierendem Ester gewonnen, der sich als völlig identisch erwies mit der von Pergotti und Contardi¹⁾ dargestellten Substanz.

0.1742 g Sbst.: 0.0949 g AgCl.

$C_8H_5O_6N_2Cl$ (260.5). Ber. Cl 13.61. Gef. Cl 13.48.

Der isomere 4-Chlor-3.5-dinitro-benzoessäure-methylester wurde aus dem Dinitro-*p*-oxy-benzoessäureester nach der gleichen Methode gewonnen. Das Rohprodukt (80 % der Theorie) schmolz bei 103° und nach dem Umlösen aus Methylalkohol bei 105°; es erwies sich als identisch mit der von Ullmann und Bielecki²⁾ beschriebenen Substanz.

0.1862 g Sbst.: 0.1029 g AgCl.

$C_8H_5O_6N_2Cl$ (260.5). Ber. Cl 13.61. Gef. Cl 13.67.

497. Felix Ehrlich: Über die Bildung von Fumarsäure durch Schimmelpilze.

[Aus dem Landwirtschaftlich-technologischen Institut der Universität Breslau.]

(Eingegangen am 13. Dezember 1911.)

Die Fumarsäure ist in den Säften vieler grüner Pflanzen und höherer Pilze häufig gefunden, als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen aber meines Wissens bisher nicht beobachtet worden.

Gelegentlich der Untersuchung der Abbauprodukte, die bei der Einwirkung von Mikroorganismen wie Hefen und Schimmelpilze auf Aminosäuren entstehen³⁾, konnte ich feststellen, daß ein weitverbreiteter Schimmelpilz, der *Rhizopus nigricans* (*Mucor stolonifer*), der besonders als ein Erreger der Fruchtfäule bekannt ist, unter geeigneten Bedingungen Fumarsäure in beträchtlichen Mengen produziert.

¹⁾ G. 32, 573 [1901] ²⁾ A. 366, 93 [1909].

³⁾ F. Ehrlich und K. A. Jacobsen, B. 44, 888 [1911].

Man gewinnt die Säure aus vier- bis achtwöchentlichen Kulturen des Pilzes auf natürlichen oder künstlich bereiteten Nährmedien, indem man die vom gebildeten Mycel abfiltrierte Lösung eindampft und nach dem Ansäuern mit Äther extrahiert. Aus dem ätherischen Auszug krystallisiert die Fumarsäure nach dem Verdunsten des Äthers direkt und läßt sich nach Umlösen aus Wasser leicht durch Schmelzpunkt, Analyse und Darstellung des charakteristischen Dimethylesters identifizieren. Die Ausbeuten an Fumarsäure schwanken indes bei den einzelnen Versuchen stark und sind, wie weitere eingehende Untersuchungen zeigten, in hohem Grade abhängig von der Zusammensetzung der Nährlösungen, auf denen man den Pilz wachsen läßt. Kultiviert man *Rhizopus nigricans* auf Pflanzenextrakten, wie z. B. Bierwürze, so erhält man gewöhnlich auch nach üppigem Wachstum nur geringe Mengen Fumarsäure. Dagegen gelingt es bei Züchtung des Schimmelpilzes auf Nährlösungen, die neben den üblichen Mineralsalzen Kohlehydrate und Stickstoffverbindungen in bestimmter Zusammensetzung enthalten, die Fumarsäure-Bildung derartig zu steigern, daß in einzelnen Versuchen (nach 6—8 Wochen) aus den betreffenden Lösungen auf 5—6 g gewachsener Trockensubstanz des Pilzes Mengen von 3—4 g Fumarsäure gewonnen wurden. Da anfangs gerade bei Darbietung gewisser Aminosäuren wie Glykokoll, Asparaginsäure, Tyrosin als einziger Stickstoffquelle besonders gute Ausbeuten zu erhalten waren, so konnte es zunächst scheinen, als ob die Fumarsäure ein Eiweiß-Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes darstellt. Der Ausfall einer großen Zahl von Versuchsreihen lehrte indes, daß das Auftreten der Säure in erster Linie von der Art der N-freien Kohlenstoffnahrung abhängt, die man dem Pilz zuweist. Grundbedingung für die Entstehung der Fumarsäure ist vor allem die Gegenwart überschüssiger Mengen von Glucose oder Fructose¹⁾, wobei es gleichgültig ist, welche Stickstoffquelle dem Pilz geboten ist, ob Aminosäuren, Pepton, Harnstoff usw., vorausgesetzt, daß der Pilz darauf gut gedeihen kann, und daß der Zusatz der Stickstoffsubstanz zur Erzielung eines guten Wachstums in genügenden Quantitäten erfolgt war. Sind neben Aminosäuren usw. nur geringe Mengen Zucker zugegen, so wird die Bildung der Fumarsäure durch den Schimmelpilz fast ganz zurückgedrängt. Es entsteht überhaupt keine Fumarsäure oder nur in Spuren, wenn man statt Zucker als Kohlenstoffquelle Glycerin²⁾ oder Äthylalkohol anwendet, oder wenn man den

¹⁾ Auf Saccharose-Lösungen vermag *Rhizopus nigricans* nicht zu wachsen, da er anscheinend keine Invertase besitzt.

²⁾ Die spurenweise Bildung von Fumarsäure auf Glycerin in einzelnen Versuchen erklärte sich daher, daß auch in solchen Lösungen stets glykogenhaltiges Pilzmycel entsteht, das Glucose in die Flüssigkeit entsendet.

Pilz auf Peptonlösungen allein ohne eine andere organische Nährsubstanz wachsen läßt. Von großem Einfluß auf die Menge der schließlich erhaltenen Fumarsäure erwies sich ferner die Zeitdauer der angestellten Kulturversuche. Bei längerem Wachstum des Pilzes wird nämlich auch die Fumarsäure angegriffen und weiter abgebaut, so daß unter Umständen auch bei Gegenwart von viel Kohlehydraten nur wenig krystallisierte Säure zu isolieren ist. Diesen Abbau scheinen einzelne Aminosäuren, wie z. B. Glutaminsäure, in besonderem Maße zu begünstigen. Durch eine Reihe von entsprechenden Vegetationsversuchen ließ sich tatsächlich auch nachweisen, daß *Rhizopus nigricans* auf Lösungen von Fumarsäure als einziger C- und Ammoniak oder Harnstoff als einziger N-Quelle gut gedeiht, und daß dabei ein erheblicher Verbrauch der Fumarsäure stattfindet, der auch eintritt, wenn der Lösung noch geringe Mengen Glucose oder Alkohol zugesetzt waren.

Als wesentliches Resultat dieser Untersuchungen scheint also hervorzugehen, daß die Fumarsäure ein Zwischenprodukt des Kohlehydrat-Abbaues darstellt, das im Stoffwechsel des Schimmelpilzes unter geeigneten Bedingungen weitergehende Veränderung und Verwertung erfährt. Chemisch bemerkenswert ist, daß hiermit zum ersten Male eine ungesättigte Verbindung als Produkt der Zuckerspaltung durch Mikroorganismen nachgewiesen ist. Die Fortsetzung der vorliegenden Untersuchungen, die auch in Hinsicht auf die Entstehung der Fumarsäure und ihrer chemisch nahestehender Verbindungen wie der Äpfel- und Bernsteinsäure in den höheren Pflanzen Interesse bieten dürften, soll namentlich in der Richtung erfolgen, über welche Substanzen der Abbau von Glucose und Fructose zu Fumarsäure verläuft und ob auch andere Schimmelpilze einer ähnlichen Reaktion fähig sind.

Im Folgenden seien nur einzelne besonders charakteristische Versuchsergebnisse mitgeteilt. Über die näheren Bedingungen der Fumarsäure-Bildung durch *Rhizopus nigricans* werde ich mit K. A. Jacobsen an anderer Stelle berichten.

1. Eine sterilisierte Lösung, enthaltend 5 g Tyrosin, 125 g Invertzucker, 0,3 g Monokaliumphosphat, 0,3 g Dikaliumphosphat, 0,2 g Magnesiumsulfat und Spuren Natriumchlorid und Eisenchlorid in 2 l Wasser wurde in einem großen, mit Wattebausch verschlossenen Glaskolben mit einer Reinkultur von *Rhizopus nigricans* beimpft und anfangs bei 25°, später bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Der Pilz begann bald üppig zu wachsen, und schon nach 2 Wochen war die Oberfläche der Flüssigkeit mit einem dichten Haarfilz bedeckt, dessen lange Hyphen die Bildung der typischen schwarzen Sporen in reichem

Maße zeigten. Ein Teil des Mycels wuchs untergetaucht. Der Kolbeninhalt wurde dann hin und wieder zur Vermischung der Lösung umgeschüttelt. Nach Verlauf von 2 Monaten schien das Wachstum des Schimmelpilzes nicht mehr wesentlich fortzuschreiten. Die gelbliche Lösung wurde nunmehr durch ein gewogenes Filter von dem entstandenen Pilzmycel abfiltriert. Ihre Gesamtacidität entsprach 82 ccm $\frac{N}{10}$ -NaOH gegen Phenolphthalein. Im 2-dm-Rohr zeigte die Flüssigkeit eine Polarisation von $-4 \cdot 2^\circ$ Sacch. Das auf dem Filter vollkommen ausgewaschene Pilzmycel wurde bei 105° getrocknet. Die trockne Pilzmasse wog 5.96 g und enthielt, nach Kjeldahl untersucht, 0.1565 g Stickstoff. Die gesammelten Filtrate wurden auf dem Wasserbad eingedampft, der erhaltene braune Sirup mit dem mehrfachen Volumen Alkohol verrührt und aus der abfiltrierten alkoholischen Lösung der Alkohol verdunstet. Eine Abscheidung von Tyrosin ließ sich dabei nicht beobachten. Der schließlich gewonnene Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, nach Zusatz von Natriumbicarbonat schwach alkalisch längere Zeit ausgeäthert und nach starkem Ansäuern der Lösung mit Schwefelsäure erschöpfend mit Äther extrahiert. Die aus der sauren Flüssigkeit erhaltenen Ätherauszüge hinterließen beim Verdampfen eine gelbliche, mit wenig Sirup durchsetzte, feste Krystallmasse (6.1 g). Sie wurde in kochendem Wasser gelöst, die Lösung mit überschüssigem Calciumcarbonat heiß neutralisiert, filtriert und eingedampft. Aus dem Rückstand ließ sich mit Alkohol das Calciumsalz einer Säure auskochen. Es hinterblieb ein in Alkohol unlösliches Calciumsalz, das, mit Schwefelsäure zerlegt, bei der Extraktion mit Äther 2.6 g schön krystallisierte, fast reine Fumarsäure lieferte. Durch Umlösen aus wenig heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle wurde die Substanz in feinen Nadeln analysenrein erhalten und bei 110° getrocknet.

0.1273 g Sbst.: 0.1938 g CO_2 , 0.0438 g H_2O . — 0.1356 g Sbst.: 0.2041 g CO_2 , 0.0460 g H_2O .

$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$. Ber. C 41.38, H 3.45.
Gef. » 41.52, 41.05, » 3.85, 3.79.

0.3248 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation gegen Phenolphthalein 55.9 ccm $\frac{N}{10}$ -NaOH. Ber. 56.0 ccm $\frac{N}{10}$ -NaOH.

Die Substanz begann oberhalb 200° zu sublimieren. Im offenen Capillarrohr schnell erhitzt, schmolz die Hauptmenge derselben gegen 294° unter Schäumen und Braunfärbung, im geschlossenen Röhrchen ¹⁾ bei 280° übereinstimmend mit einer Probe einer Kahl-

¹⁾ A. Michael (B. 28, 1631 [1895]) gibt den Schmelzpunkt der Fumarsäure im zugeschmolzenen Röhrchen von Zimmertemperatur an erhitzt zu $286-287^\circ$ an.

baumschen Fumarsäure, die mit der Substanz vermischt keine Depression des Schmelzpunktes zeigte.

Das in üblicher Weise hergestellte und bei 110° getrocknete Silbersalz der Säure verpufft leicht bei stärkerem Erhitzen und wurde daher zur Analyse in Salpetersäure gelöst.

0 3002 g Sbst.: 0.2604 g AgCl.

$C_4H_2O_4Ag_2$. Ber. Ag 65.45. Gef. Ag 65.30.

Zur Darstellung des Dimethylesters wurde 1 g des trocknen Silbersalzes mit 8 ccm Jodmethyl verrieben. Nach längerer Zeit wurde von dem entstandenen Jodsilber nach Zusatz von absolutem Alkohol abfiltriert. Beim Verdampfen des Filtrats hinterblieb ein Öl, das krystallinisch erstarrte. Die Krystallmasse ergab beim Umkrystallisieren aus Alkohol die typischen Prismen des Fumarsäure-dimethylesters, die bei 101–102° schmolzen, während Anschütz¹⁾ den Schmelzpunkt dieser Substanz zu 102° angibt.

Aus dem wie oben beschrieben gewonnenen, in Alkohol löslichen Calciumsalz ließ sich nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und Ausäthern noch ca. 0.6 g *d-p*-Oxyphenyl-milchsäure isolieren, die bereits früher als Abbauprodukt des Tyrosins durch viele Schimmelpilze²⁾ beschrieben wurde. Aus wenig Wasser umkrystallisiert und im Vakuum getrocknet, schmolz sie bei 169°, gab die Millonsche Reaktion und zeigte außer der Rechtsdrehung alle früher beobachteten Eigenschaften.

0.1192 g Sbst.: 0.2491 g CO₂, 0.0630 g H₂O.

$C_9H_{10}O_4 + \frac{1}{2} H_2O$. Ber. C 56.54, H 5.76.
Gef. » 56.99, » 5.91.

2. Parallel mit Versuch 1 wurde eine sterilisierte Lösung mit *Rhizopus nigricans* beimpft angesetzt, die außer genau derselben Menge Mineralsalzen und 5 g Tyrosin nur 25 g Invertzucker enthielt. Die Wachstumsdauer wurde ebenfalls auf 2 Monate ausgedehnt. Eine Bestimmung der Pilzmenge und des assimilierten Stickstoffs ließ sich bei diesem Versuch leider nicht ausführen, da das Mycel mit ausgeschiedenen Tyrosin-Krystallen stark durchsetzt war. Das Filtrat zeigte im 2-dm-Rohr keine Polarisation und war zuckerfrei. Die Gesamtacidität entsprach 12 ccm $\frac{1}{1}$ -NaOH gegen Phenolphthalein. Beim Eindampfen der Lösung wurden ca. 1.5 g Tyrosin zurückgewonnen. Aus der angesäuerten Flüssigkeit ließen sich mit Äther 1.1 g eines langsam krystallisierenden Sirups extrahieren. Die Krystalle gaben die Millonsche Reaktion und bestanden aus reiner *d-p*-Oxyphenyl-milch-

¹⁾ B. 12, 2282 [1879].

²⁾ F. Ehrlich und K. A. Jacobsen, B. 44, 891 [1911]. — *Rhizopus nigricans* gehört zu denjenigen Schimmelpilzen, die bei längerem Wachstum auf Aminosäuren die zuerst entstandene Oxysäure weiter zu niedrigmolekularen Verbindungen abbauen, unter den aber, wie Kontrollversuche zeigten, Fumarsäure nicht nachzuweisen ist.

säure (0.3 g). Fumarsäure war auch nicht spurenweise nachweisbar.

3. Eine sterilisierte Lösung enthaltend 1 g Tyrosin, 0.15 g Monokaliumphosphat, 0.15 g Dikaliumphosphat, 0.2 g Magnesiumsulfat, sowie Spuren Kochsalz und Ferrichlorid in 1 l Wasser, zu der 10 ccm Alkohol gesetzt waren, wurde wie vorher mit dem Schimmelpilz geimpft. Die Wachstumsdauer betrug 5 Wochen. Der abfiltrierte, gewaschene und getrocknete Pilz wog 1.17 g und enthielt 0.0675 g Stickstoff. Die Gesamtacidität der Lösung entsprach 4 ccm $\frac{1}{1}$ -NaOH gegen Phenolphthalein. Der saure Ätherauszug der verdampften Flüssigkeit lieferte ca. 0.2 g krystallinischen Rückstand, in dem geringe Mengen *d-p*-Oxyphenylmilchsäure, aber keine Fumarsäure nachzuweisen waren.

4. Zur Kultur angesetzt eine sterile Lösung von 5 g Glykokoll und 100 g Invertzucker in 1250 ccm Wasser, das dieselbe Menge Mineralsalze wie in Versuch 1 und 2 enthielt. Vegetationsdauer des Schimmelpilzes 2 Monate. Die schließlich erhaltene Flüssigkeit polarisierte im 2-dm-Rohr -6.4° Sacch. und zeigte eine Gesamtacidität entsprechend 92.5 ccm $\frac{1}{1}$ -NaOH gegen Phenolphthalein. Gewicht des geernteten trocknen Pilzmycels 5.8 g mit einem Gehalt von 0.1715 g Stickstoff. Aus der eingedampften Lösung wurden nach dem Ansäuern 4.8 g gelblicher Krystallmasse mit Äther extrahiert. Ausbeute an reiner Fumarsäure 3.1 g bei 110° getrocknet.

0.1512 g Subst.: 0.2302 g CO_2 , 0.0514 g H_2O .

$\text{C}_4\text{O}_4\text{H}_4$. Ber. C 41.38, H 3.45.

Gef. » 41.52, » 3.80.

5. Eine gleich zusammengesetzte Lösung in 1250 ccm Wasser wie in Versuch 4 außer mit 5 g Glykokoll mit nur 20 g Invertzucker parallel angestellt. Wachstumsdauer 6 Wochen. Beim Abbrechen des Versuches zeigt die Flüssigkeit im 2-dm-Rohr -0.4° Sacch. und eine Gesamtacidität entsprechend 5.0 ccm $\frac{1}{1}$ -NaOH. Getrocknete Pilzernte 2.18 g mit 0.0899 g Stickstoff. Der saure Ätherextrakt liefert 0.3 g krystallinischen Sirup, in dem Fumarsäure nicht nachweisbar ist.

6. Eine genau mit Ammoniak neutralisierte Lösung von 2 g Fumarsäure in 200 ccm Wasser, die außerdem die üblichen mineralischen Nährsalze enthielt, wurde sterilisiert und mit *Rhizopus nigricans* geimpft. Der Pilz entwickelte sich anfangs ziemlich kräftig auf der Lösung, nach 6 Wochen ließ das Wachstum merklich nach. Es wurde 0.15 g trockenes Mycel mit 0.013 g Stickstoff geerntet. Die abfiltrierte Lösung reagierte deutlich alkalisch und enthielt noch Ammoniak. Aus der angesäuerten Flüssigkeit wurde durch erschöpfende Ätherextraktion nur 0.7 g Fumarsäure zurückgewonnen.