

**184. R. Falck und van Beyma thoe Kingma:
Methodisches und Prinzipielles zur Darstellung organischer Säuren
auf biologischem Wege mit Hilfe von Fadenpilzen.**

[Aus d. Mykolog. Institut d. Forstl. Hochschule Hann.-Münden.]

(Eingegangen am 29. März 1924.)

Die Bildung organischer Säuren ist ein fast allen Fadenpilzen gemeinsamer Prozeß, und der biologische Abbau der Kohlenhydrate erfolgt in der Natur ebenso häufig auf dem Wege über die Säurebildung, wie wir den organischen Säuren als Vorstufen gewisser Zuckerarten bei ihrem biologischen Aufbau in grünen Früchten usw. begegnen. Gleichwohl ist die Säurebildung bisher viel weniger studiert worden als andere biologische Abbauprozesse, die in der Natur nur Ausnahme-Erscheinungen darstellen und wie z. B. die alkoholische Gärung auf die Vertreter weniger Artengruppen beschränkt sind.

Wehmer hat zuerst festgestellt, daß bestimmte Arten einer Schimmelpilz-Gattung, die er *Citromyces* nannte, mit zuckerhaltigen Nährlösungen Citronensäure bilden. Bei anderen Arten, besonders bei dem viel untersuchten *Aspergillus niger*, ist die Bildung von Oxalsäure festgestellt worden. Ferner wurde gefunden, daß in denselben *Citromyces*-Kulturen auch Oxalsäure und bei *Aspergillus niger* und anderen Oxalsäure-Bildnern auch Citronensäure auftritt, und daß die Oxalsäure-Bildung der Citronensäure-Bildung zu folgen pflegt. Wehmer hat auch zuerst nach Methoden gesucht, die physiologische Leistung der Citronensäure-Bildung in quantitativer Hinsicht zu steigern und sie der technischen Auswertung näher zu bringen.

Wir haben nun zunächst festgestellt, daß bei den Arten, mit denen Wehmer und die späteren Autoren gearbeitet haben, bei Anwendung derselben Grundmethoden die Citronensäure- und Oxalsäure-Bildung zwar überwiegen kann, daß aber immer auch noch andere Säuren, sei es gleichzeitig oder nacheinander zur Bildung gelangen. Unter den Bedingungen ihres natürlichen Wachstums besonders auf stärkehaltigen und von Lufträumen durchsetzten konsistenten Substraten, z. B. auf Brot, werden meistens Gemische verschiedener Säuren, z. B. von Oxalsäure, Citronensäure, Äpfelsäure und Weinsäure, gebildet, so daß die Bedingungen für die bevorzugte Ausbildung einer bestimmten Säure erst noch ermittelt werden müssen. Nur das eine kann bereits ausgesagt werden, daß als letztes Oxydationsprodukt auf dem Wege der biologischen Säurebildung die Oxalsäure entsteht.

Wir haben sodann alle häufiger vorkommenden und aus vorhandenen Sammlungen erhältlichen Arten der Gattung *Aspergillus*, *Citromyces* und *Penicillium* durchgeprüft und können auf Grund dieser vergleichenden Prüfungen aussagen, daß fast alle diejenigen Arten, die überhaupt als Säurebildner in Frage kommen, im Laufe des Stoffwechsels auch Citronensäure bilden oder bilden können. Dieser Prozeß der Citronensäure-Bildung ist also bei den verbreitetsten Schimmelpilzen ein sehr allgemeiner.

Zum näheren Studium dieser Prozesse handelte es sich weiter darum, für die Kultur der säurebildenden Fadenpilze eine exakte und einheitliche Methode auszuarbeiten, die bei Wiederholung der Versuche immer wieder dieselben Resultate erwarten lassen. Die bisher verwendeten Nährböden sind vorzugsweise den Methoden entnommen worden, die für die Kultur der Hefen ausgebildet wurden.

Die Arbeitsmethode.

Die Fadenpilze sind ausgesprochene Oberflächen-Bewohner; sie breiten ihre Fadensysteme an der Oberfläche des Substrats aus und bringen es nur an der Grenzfläche, wo Substrat und umgebendes gasförmiges Medium sich berühren, zu einem normalen Wachstum. Sie unterscheiden sich darin also grundsätzlich von den Bakterien, Hefen und Wasserpilzen, die entschiedene Flüssigkeits-Bewohner sind. Daraus folgt, daß die Zucht der Fadenpilze unter anderen Bedingungen zu erfolgen hat als z.B. die der Hefen. Infolge ihrer Eigenschaft, ihre zarten Fäden auf der Oberfläche zu orientieren, brauchen sie dafür unbewegte Stützpunkte und eine möglichst große Oberfläche im Verhältnis zur Masse des Nährbodens. Ideale Substrate dieser Art sind in der Natur vielfach gegeben, z. B. in der Holzsubstanz, die unter Wasser lagernd (also mit gefüllten Hohlräumen), nicht angreifbar ist, während dasselbe Holz, wenn es von den natürlichen Hohlräumen vollständig durchzogen ist, bei genügendem Feuchtigkeitsgehalt der Zellensubstanz bzw. in mit Feuchtigkeit gesättigter Luft, in verhältnismäßig kurzer Zeit auch innerlich zersetzt ist.

Demgemäß ist es die erste Aufgabe, das Nährsubstrat in einen festen Zustand mit großer Oberfläche zu bringen: Für die Festmachung künstlicher Nährlösungen liegen ja bereits gute Methoden vor. Wir bevorzugen den Agar, weil er die größte Wassermenge zur haltbaren Gallerte bindet, obwohl die Methode uns nicht gestattet, mit Hohlräumen durchsetzte Substrate zu schaffen. Bei dieser Kultur auf einer erstarrten Agarschicht beobachtet man, daß die Pilz-Hyphen nur wenige Millimeter tief ungehemmt in das Substrat eindringen, und daß die Grenze, bis zu welcher die Hyphen von der Oberfläche her senkrecht in das Substrat sich einsenken, 1 cm nicht wesentlich überschreitet. Dagegen gestattet uns diese Methode, für das Verhältnis von Oberfläche zu Substrat-Volumen ganz bestimmte Werte konstant zur Anwendung zu bringen, wenn wir uns auf Gefäße von konstanter Form und Größe einigen.

Wenn es nun darauf ankommt, die Oberfläche so zu wählen, daß die zur Säurebildung führenden Oxydationen in bestimmter Weise verlangsamt werden und dadurch die Zwischenprodukte der Säurebildung (in den tieferen Substratschichten) in größeren Mengen zu fassen, wird der gewöhnliche Agar-Nährboden den idealen Substraten unter Umständen vorzuziehen sein. Denn in Substraten, die mit Hohlräumen hinreichend durchsetzt sind, konnte Gluconsäure gar nicht, Citronensäure nicht in erheblichem Umfang gewonnen und fixiert werden, indem die Oxydation anscheinend schneller und vollständiger bis zur Oxalsäure weiterschreitet. Durch vergleichende Versuche wurde festgestellt, daß ein etwa 1-proz. Agar die günstigsten Verhältnisse darbietet.

Über die Rolle, welche das Verhältnis von Oberfläche zu Substrat-Volumen spielt, kann die S. 917 folgende Tabelle über 3 Versuche als Beispiel für viele derartige Versuche gelten.

Bei diesen Versuchen kamen jedesmal 100 ccm einer Nährlösung zur Verwendung, die folgende Zusammensetzung hatte: 15% Glucose, 0,03% Kaliumbiphosphat, 0,32% Ammoniumnitrat, 1% Agar. Die Kulturen wurden mit *Citromyces F* geimpft und 9 Tage bei 15° gehalten.

Die Tabelle zeigt, daß unter Anwendung gleicher Substrate die Säurebildung, der Verbrauch an Glucose und das Erntegewicht etwa proportional der Oberflächen-Vergrößerung ansteigen. Die Versuche zeigen ferner, daß die Substrate nur bis zu verhältnismäßig geringer Tiefe, also nur geringe Schichthöhen von den Mycelien normal ausgenutzt werden. Dasselbe gilt

für Flüssigkeiten. Dabei kommt aber in Betracht, daß die Flüssigkeitskulturen leicht durch Bewegung sowie durch Bakterien und Hefen geschädigt werden. Wir können nach diesem sowie vielen andern Versuchen über den Einfluß der Oberflächengröße bei Agar-Kulturen Folgendes aussagen: Die Säurebildung vergrößert sich in der Zeiteinheit bei konstanter Nährlösung innerhalb gewisser Grenzen proportional der Oberflächenvergrößerung. Wir nennen das Verhältnis von Oberfläche zum Substrat-Volumen den »Oberflächenfaktor«.

Oberflächen-Durchmesser cm	Oberflächen-Größe qcm	Säure		Ernte		Zuckerverbrauch	
		gef. ¹⁾	ber. ²⁾	gef.	ber. ²⁾	gef.	ber. ²⁾
4	12.5	5		0.27		0.6	
7	38.5	18	15	0.54	0.47	1.4	1.8
10	78.5	40	37	0.65	0.67	2.6	2.8
14	154	80	80	0.91	0.94	4.4	5.2
18	254.5	127	128	1.17	1.21	6.6	7.8

Die Zusammensetzung der Nährlösung.

1. Die Kohlenstoff-Quelle: Als organische Stoffe für die Ernährung der Pilze und die Säurebildung kommen hauptsächlich Kohlenhydrate in Frage. Sie sind zugleich in quantitativer Hinsicht die bei weitem wichtigsten Anteile des Nährsubstrats. Sie kommen nicht bloß als die Urstoffe für die Säurebildung in Betracht, sondern auch als die eigentlichen Bau- und Atmungsstoffe des Organismus. Eine Nährlösung, die z. B. 10% Glucose enthält, braucht von allen andern Nährsalzen zusammen nur etwa 0.2%. Unter den Kohlenhydraten spielen, wie dies schon durch frühere Untersuchungen hinreichend geklärt ist, unsere wichtigsten, in der Natur häufigsten Zuckerarten die wesentlichste Rolle. Wir sind daher bei unseren Versuchen von der Glucose ausgegangen, da sie die besten Resultate liefert und in chemischer Hinsicht den klarsten Einblick in alle Umsetzungen gestattet.

2. Die Konzentration und das optimale Mischungsverhältnis: Die optimale Konzentration ist für die einzelnen Gruppen sehr verschieden. Unter optimaler Konzentration ist dasjenige optimale Verhältnis der Nährstoffe zum Wasser zu verstehen, welches bei konstantem Oberflächenfaktor und konstanter Temperatur in der Zeiteinheit die größte Pilzernte hervorbringt, also dem durch die Plasmahaut unmittelbar aufnehmbaren Mischungsverhältnis der Nährstoffe einschließlich des Wassers am nächsten kommt³⁾. Sie ist sehr verschieden für die verschiedenen Arten der Pilzgruppen und kann selbst bei ein und demselben Organismus verschiedene Grenzwerte besitzen⁴⁾.

3. Die Stickstoff-Quelle: Die nächst wichtige Rolle spielt der Stickstoff. Unter den Stickstoff-Verbindungen sind für die Stickstoff-Ernährung die günstigsten die hochmolekularen Eiweißstoffe, besonders die Peptone. Die bis zu niedrig-molekularen Körpern abgebauten Eiweißstoffe

¹⁾ gefunden ausgedrückt in ccm $\frac{n}{4}$ -KOH.

²⁾ berechnet aus der Oberflächengröße nach der jeweils vorangegangenen Zahl.

³⁾ Cohns Beiträge zur Biol. der Pflanzen, Bd. VIII, S. 274, Abs. 1.

⁴⁾ ebenda, S. 293, Abs. 4 u. 5.

sind für die Ernährung der höheren Fadenpilze im allgemeinen nicht mehr verwertbar.

Nur verhältnismäßig wenige Gruppen, unter anderen die hier verwendeten Schimmelpilze aus der Gattung *Aspergillus*, *Penicillium* und *Citromyces*, sind instande, auch anorganische Stickstoff-Quellen auszunutzen. Aus diesem Grunde sind sie für das Studium des Abbaus der Kohlenhydrate besonders geeignet. Innerhalb der anorganischen Stickstoff-Quellen ist ein wesentlicher Unterschied zwischen Ammoniumsalzen und Nitraten nicht vorhanden. Es wurde daher in der Regel Ammoniumnitrat verwendet. Es ist aber für die Säurebildung wesentlich, den Stickstoff nicht in dem für die Ernährung optimalen Verhältnis zu verwenden, weil dadurch die Säurebildung im Verhältnis zur Substanzbildung ungünstig beeinflusst wird. Als günstigstes Verhältnis hat sich ein Zusatz von 0.16—0.32 % Ammoniumnitrat entsprechend einer Stickstoffgabe von 0.056—0.112 % ergeben. Alle übrigen Nährsalze sind in so geringer Menge erforderlich, daß sie bei Verwendung von technischem Traubenzucker vollständig vernachlässigt werden können. Ob es Fadenpilze gibt, die den atmosphärischen Stickstoff verwenden, ist sehr zweifelhaft.

Kapazität und Intensität.

Die Fähigkeit zur Säurebildung ist bei den verschiedenen Pilzarten eine sehr verschiedene. Zwei Gesichtspunkte sind hierfür maßgebend: 1. die Menge an Säure, die von einem Pilz bei einem bestimmten Substrat unter konstanten Verhältnissen überhaupt gebildet wird, 2. die Geschwindigkeit, mit der die Säurebildung geschieht. Beide Faktoren haben für das Studium der Säurebildung Bedeutung. Wir haben deshalb diese Verhältnisse etwas genauer untersucht.

Wir haben zum Zwecke einheitlicher Bezeichnung die maximale Säuremenge, die ein bestimmter Pilz aus einer bestimmten Zuckermenge bilden kann (ausgedrückt in % der theoretisch möglichen Menge) seine »Kapazität der Säurebildung« genannt. Da die experimentelle Bestimmung der gebildeten Säure stets zu einem Zeitpunkt geschah, an dem von der zugesetzten Kreide (Kalk) nichts mehr aufgelöst wurde, mithin keine Produktion von Säure mehr stattfand, so sind die gefundenen Werte ohne weiteres als maximal anzusehen, daher als Kapazität zu bezeichnen.

Die Kapazitätswerte, die man erhält, wenn man dem Substrat keinen Kalk zusetzt, sind grundsätzlich abweichend, da die verschiedenen Arten gegen die verschiedene Säurekonzentration verschiedene Empfindlichkeit besitzen. Auf Grund quantitativer Versuche haben wir 3 Arten von Säurebildnern unterschieden: 1. gute Säurebildner mit einer Kapazität über 25 %; 2. mäßige Säurebildner mit einer Kapazität zwischen 10 und 20 %; 3. schlechte Säurebildner mit einer Kapazität unter 10 %. Wir haben z. B. festgestellt, daß bei den *Aspergillus*-Arten die besten Säurebildner diejenigen Arten sind, die schwarz, braun oder hellbraun gefärbt sind. Zu den mittleren Säurebildnern gehören die meisten gelben und gelbgrünen Arten. Die schwach gefärbten oder weißen Arten sind schlechte Säurebildner.

Um über die Geschwindigkeit der Säurebildung etwas aussagen zu können, haben wir den Begriff der »Intensität der Säurebildung« eingeführt. Darunter verstehen wir den Quotienten aus der Kapazität durch die Zahl der Tage, d. h. also die Säuremenge, die in der Zeiteinheit ge-

bildet wird. Es wurde beobachtet, daß die Intensität der Säurebildung mit längerer Kultivierung eines Pilzes auf kalk-haltigem Nährboden zunimmt.

Der beste Säurebildner ist danach ein solcher Pilz, der mit hoher Kapazität auch hohe Intensität verbindet. Die Arten und Unterarten der bisher studierten Gattungen lassen sich nach diesen Wertzahlen in eine Reihe ordnen, deren oberste Vertreter für die technische Säurebildung in Betracht kommen, während sich zu unterst auch Arten finden, die keine wesentlichen Säuremengen bilden, obwohl der Zuckerverbrauch bei gleichen Erntemengen und gleicher Atmungsgröße ein ähnlicher ist. Es finden hier anders gerichtete Umsetzungen des Zuckermoleküls statt, die noch völlig unbekannt geblieben sind.

Zur Physiologie und Biologie der Säurebildung.

Diese vergleichenden Studien zeigen, daß der Zucker nach drei verschiedenen Richtungen verbraucht wird: 1. für den Aufbau der Zellsubstanzen, die wir als Erntegewicht bestimmen; 2. für die Atmung; 3. für die Säurebildung oder den noch unbekanntem Umbildungsprozeß. Atmungsgröße und Erntegewicht stehen in gewissen konstanten Beziehungen, eine solche Konstanz der Säurebildung besteht aber nicht. Sie wechselt bei derselben Art je nach den Ernährungsverhältnissen; z. B. kann durch steigende N-Gaben bei Verwendung hinreichender Zuckermengen Ernährungs- und Atmungsgröße entsprechend zunehmen, während die Säurebildung abnimmt, und umgekehrt. Die Säurebildung ist also von einem gewissen, das Verhältnis des aufnehmbaren Nährstoffgemisches übersteigenden Zuckergehalt abhängig. Es handelt sich dementsprechend auch nicht um ein normales Stoffwechselprodukt beim Abbau der Kohlenhydrate, und es kann nicht angenommen werden, daß der zum Aufbau der Zellsubstanz und zur Atmung verwendete Zucker auch erst der für die betreffende Art spezifischen Säurebildung unterliegt. Was insbesondere den Weg zur Kohlen-säure-Bildung über die verschiedenen Säuren hinweg betrifft, ist zu berücksichtigen, daß als Endprodukt der Säurebildungsprozeß in allen Fällen Oxalsäure auftritt, die sich als C-Quelle nicht mehr verwenden läßt. Schon das erste Abbauprodukt, als welche wir in der auf S. 920 folgenden Abhandlung die Gluconsäure kennzeichnen werden, ist als Ausgangsprodukt für die Pilznahrung der Glucose unterlegen. Dabei muß als feststehend betrachtet werden, daß solange der Abbau nicht bis zur Oxalsäure weitergegangen ist, diese Säuren wieder in den normalen Stoffwechsel eintreten können. An eine Auswertung der bei der Säurebildung außerhalb der Zelle durch Oxydation gewonnenen Energie kann kaum gedacht werden, überschüssige Kohlenhydrate scheinen hier durch den eignen Stoffwechsel in einer Form erhalten zu werden, die den Wert des Substrats für andere schnellwüchsige Gruppen (Bakterien, Hefen) herabsetzt.

Die quantitative Bestimmung der Säurebildung.

Das wesentlichste Moment für die Untersuchung des Säurebildungsprozesses in den verschiedenen Stadien und zugleich die Anhäufung an Säuren ist der Zusatz von ungiftigen Carbonaten, die die gebildete Säure in möglichst unlöslicher Form fixieren. In dieser Beziehung spielt auch bei unseren Versuchen das Calciumcarbonat die wichtigste Rolle, obgleich wir festgestellt haben, daß sich Barium- und Strontiumcarbonat gut verwenden lassen und sogar gewisse Vorteile bieten.

Die Bestimmung der gebildeten Säure hatte verschieden zu geschehen, je nachdem zu den Kulturen Kalk zugesetzt war oder nicht. Wenn der Kalkzusatz fehlte, wurden die Kölbchen, in denen je 50 ccm des Nährsubstrats enthalten waren,

erhitzt, bis der Agar geschmolzen war und dann mit Phenol-phthalein als Indicator mit 0.25-n. Kalilauge titriert. Bei Kalkzusatz war in jedes Kölbchen eine bestimmte Menge Kalk eingewogen. Zur Bestimmung der Säure wurde der nicht verbrauchte Kalk mit normaler Säure entfernt und der Überschuß an Säure mit Kalilauge zurücktitriert. Aus der Differenz von eingewogenem und verbrauchtem Kalk ergab sich die Menge der organischen Säuren. Da sich durch qualitative Nachweise ergeben hatte, daß in einem gewissen Stadium in allen Kulturen säurebildender Pilze in der Hauptsache Citronensäure vorhanden war, so wurden alle Werte auf Citronensäure berechnet. Dadurch wurde gleichmäßige Beurteilung und ein Vergleich der Ergebnisse möglich.

Die Bestimmung des nicht verbrauchten Zuckers geschah nach der Methode von Schoorl. Dabei wird aus Fehlingscher Lösung Kupferoxydul ausgeschieden, zur Bestimmung des nicht reduzierten Kupfers mit Jodkalium und Schwefelsäure im Überschuß versetzt und das Jod mit $\frac{7}{10}$ -Thiosulfat-Lösung titriert.

Zur Bestimmung der Pilzernte wurden die Pilzdecken ausgewaschen, auf Filtrierpapier getrocknet und gewogen.

Endlich wurden auch Versuche angestellt mit folgenden Substanzen als Nährsubstraten: a) anderen Zuckerarten und Glycerin; b) Stärke; c) Holz und Cellulose. Es hat sich dabei herausgestellt, daß alle diese organischen Verbindungen in derselben Art unter Säurebildung abgebaut wurden wie die hauptsächlich untersuchte Glucose.

Darüber wollen wir uns spezielle Mitteilungen vorbehalten. Die ausführliche Arbeit über die Bildung organischer Säuren in Schimmelpilz-Kulturen, über die wir hier vorläufig diese kurzen Mitteilungen bringen, sollen demnächst in den »Mykologischen Untersuchungen und Berichten« erscheinen.

185. R. Falck und S. N. Kapur: Über Gluconsäure-Bildung durch Fadenpilze.

[Aus d. Mykolog. Institut d. Forstl. Hochschule Hann.-Münden.]

(Eingegangen am 29. März 1924.)

Theoretischer Teil.

Es ist bekannt, daß beim Abbau der Kohlenhydrate durch bestimmte Arten der Gattung *Aspergillus* und *Citromyces* Citronensäure und Oxalsäure gebildet werden. Es ist ferner nachgewiesen, daß in derselben Kultur zunächst Citronensäure entsteht und hinterher zu Oxalsäure weiter abgebaut wird. Beide Säuren konnten in diesem Prozeß durch Zugabe von Calciumcarbonat zu den Kulturen in Form des Ca-Salzes in größeren Mengen gewonnen werden, so daß die fabrikmäßige Herstellung der Citronensäure auf diesem Wege bereits mehrfach versucht ist.

Wir haben nun gefunden, daß die Citronensäure nicht das erste faßbare Bildungsprodukt bei der Säurebildung darstellt; sondern, daß bei allen Arten, die Citronensäure bilden, soweit sie bisher untersucht werden konnten, zunächst das lösliche Ca-Salz der Gluconsäure entsteht. Es ist von Interesse, daß dieses normalerweise als erste Oxydationsstufe theoretisch in Betracht kommende Produkt tatsächlich durchlaufen wird, und daß die Oxydation normalerweise in Stufen erfolgt oder erfolgen kann.

Als erste Oxydationsstufen, auf die wir fahndeten, kamen Glucuronsäure und Gluconsäure in Frage. Die Glucuronsäure ist ein im tierischen Organismus häufig vorkommender Körper, während die Gluconsäure im