

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

Stoffwechsel bisher nur vereinzelt bei Bakterien nachgewiesen wurde<sup>1)</sup>. Bei der Säurebildung der Fadenpilze ist von uns bisher vergeblich nach Gluconensäure gesucht worden. Dagegen haben wir die auch im Stoffwechsel des pflanzlichen Organismus gelegentlich vorkommende Gluconensäure bei allen bisher geprüften Citronensäure bildenden Fadenpilzen nachgewiesen.

Die Isolierung der Gluconensäure gelang dadurch, daß sie ein wasserlösliches Ca-Salz bildet. In Kulturen, die bei 22° 6–8 Tage gewachsen sind, ist bereits Auflösung des Kalks zu beobachten, aber noch keine Bildung der Krystalle des citronensauren Calciums. In diesem Stadium werden die Kulturen mit kaltem Wasser extrahiert und in dem Extrakt das Ca-Salz durch vorsichtige Fällung mit Alkohol zur Krystallisation gebracht. Das Ca-Salz der neuen Säure krystallisiert in kugeligen Aggregaten von mikroskopischen Nadeln. Es ist durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol zu reinigen.

Die Ca-Bestimmung wies darauf hin, daß es sich um eine einbasische Säure mit 6C-Atomen handelte. Aus den Eigenschaften des nach der Vorschrift von E. Fischer<sup>1a)</sup> dargestellten Phenyl-hydrazids sowie anderer im experimentellen Teil beschriebenen Derivate konnte eindeutig festgestellt werden, daß es sich bei der neuen Säure um Gluconensäure handelte<sup>2)</sup>.

Die Bildung der Gluconensäure ist von uns zunächst bei 4 Abarten von *Aspergillus niger*, außerdem bei *Aspergillus cinnamomens* und *Aspergillus fuscus* festgestellt worden.

In den Agar-Kulturen läßt sich an der Lösung des zugesetzten Calciumcarbonats die Zeit und die Menge der Säurebildung bei äußerer Betrachtung leicht verfolgen. Hiernach ist die Annahme berechtigt, daß derjenige Teil des Zuckers, welcher der Säurebildung unterliegt, zuerst in Gluconensäure überführt wird. Erst in etwas späteren Stadien tritt Citronensäure auf, deren Bildung sich an der Ausscheidung der charakteristischen Calciumcitrat-Krystalle äußerlich verfolgen läßt. Mit dem Fortschreiten der Citronensäure-Bildung geht der Gluconensäure-Gehalt zurück. Dafür geben wir die folgenden Ausweise: Nach 4 Tagen bei 22° wurde aus 65 g Glucose 30 g rohes gluconsaures Calcium und 6.5 g rohes Calciumcitrat in Substanz gewonnen. Nach 8 Tagen aus gleichen Kulturen derselben Art und Menge: 13 g rohes gluconsaures Calcium und 15 g rohes Calciumcitrat.

Die besten Ausbeuten an Gluconensäure erhält man, wenn man bei niedriger Temperatur den Zeitpunkt beobachtet, an dem der Kalk geschwunden ist, bevor die Bildung der Calciumcitrat-Krystalle einsetzt. Außerdem kommen als allgemeine Bedingungen zur Gewinnung guter Ausbeute an Säure eine bestimmte Zuckerkonzentration und ein verhältnismäßig niedriger Gehalt an Stickstoff in Betracht. Ein besonders geeignetes Salz ist Ammoniumnitrat in Gaben von 1.6 g auf 1 l Substrat, entsprechend 0.056 % Stickstoff. Bei Einhaltung dieser Bedingungen kann für die genannten Arten auf eine Ausbeute bis 50 % der Kohlenhydrate gerechnet werden.

<sup>1)</sup> Literatur in Beilstein, Handbuch der Organ. Chemie, 4. Aufl., III. Bd., 1921, S. 543, und W. Henneberg, Weitere Untersuchungen über Essigbakterien, C. 1898, I 747.

<sup>1a)</sup> E. Fischer und Paßmore, B. 22, 2730 [1889].

<sup>2)</sup> Im »Chem. Zentralblatt«, C.1922, II 276, ist eine Arbeit von Molliard referiert. In dem Referat ist angegeben, daß in *Aspergillus*-Kulturen eine »Glucosid-säure« auftritt. Die Originalarbeit bringt eine kurze Mitteilung über den Nachweis der Gluconensäure (acide glucosique) ohne nähere Angaben. In jüngster Zeit sind weitere Arbeiten Molliards erschienen.

### Beschreibung der Versuche.

#### Isolierung und Identifizierung der Gluconsäure.

Zur Gewinnung des Ca-Salzes wurde der fein zerriebene Agar mit kaltem Wasser extrahiert und der gereinigte Auszug nach dem Eindampfen bis zur Sirupkonsistenz mit bestimmten Mengen Alkohol versetzt, wobei das Calciumsalz der Gluconsäure nach einiger Zeit in kugeligen Aggregaten von mikroskopischen Nadelchen zur Ausscheidung gelangt. Diese wurden wiederholt in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt, bis ein völlig farbloses Salz gewonnen wurde.

Ca-Bestimmung. 0.1781, 0.1310 g Ca-Salz: 0.0543, 0.0400 g  $\text{CaSO}_4$ .

Gluconsaures Calcium  $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Ca} + \text{H}_2\text{O}$ . Ber. Ca 8.93. Gef. Ca 8.97, 8.99.

Das Salz ist in heißem Wasser leicht löslich, scheidet sich beim Abkühlen nur sehr langsam ab. Bei 18° beträgt die Wasserlöslichkeit 3.5%. Dieselbe Löslichkeit hat Kiliani<sup>3)</sup> ermittelt.

Die Drehung der mit Salzsäure angesäuerten Calciumsalz-Lösung beträgt 9.7 (nach 24 Stdn.). Nef<sup>4)</sup> hat für das Ca-Salz der Gluconsäure +10.5 angegeben.

0.1938 g Sbst.: 0.2312 g  $\text{CO}_2$ , 0.0951 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Ca} + \text{H}_2\text{O}$ . Ber. C 32.14, H 5.36. Gef. C 32.53, H 5.36.

Das Bariumsalz wurde durch Erhitzen mit Bariumcarbonat der durch Oxalsäure freigemachten Säure kristallisiert erhalten und durch Umkristallisieren gereinigt.

0.1532, 0.1904 g Sbst.: 0.0650, 0.0814 g  $\text{BaSO}_4$ .

$(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Ba} + \text{H}_2\text{O}$ . Ber. Ba 25.18. Gef. Ba 25.12, 25.15.

Der Schmelzpunkt des lufttrocknen Bariumsalzes<sup>5)</sup> liegt bei 117°, des bei 105° getrockneten bei 153° unter Zersetzung.

Das Calciumsalz bräunt sich bereits bei 120°; daher war es nicht möglich, den Schmelzpunkt zu ermitteln.

Das Phenyl-hydrasid der Gluconsäure wurde nach der Methode von E. Fischer<sup>6)</sup> wiederholt dargestellt. Farblose, glänzende Prismen. Schmp. 197°, schwer löslich in kaltem Wasser, Alkohol und Äther, durch Barytwasser leicht spaltbar.

0.1847 g Phenyl-hydrasid: 15.2 ccm N (13°, 755 mm) (nach Dumas).

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2$ . Ber. N 9.79. Gef. N 9.78.

Das Brucinsalz wurde nach Kiliani hergestellt, aus Methylalkohol umkristallisiert, Schmp. 155°.

Wurde die Lösung der freien Säure im Vakuum eingedampft, so war sie in Alkohol völlig unlöslich.

Über die Bedingungen, die der Bildung und Anhäufung der Gluconsäure günstig sind, hat der eine von uns mit Hrn. Dr. S. Michael weitere Beobachtungen gemacht: Bei verschiedenen *Aspergillus*-Arten sowie bei *Citromyces lactis* hat sich ergeben, daß eine verhältnismäßig hohe Zuckerkonzentration von etwa 15%, die besten Ausbeuten gibt, bei 10 und 5% Glucose nahmen die Ausbeuten prozentual etwas ab. Daher wurde zur präparativen Darstellung weiterhin eine Nährlösung mit 15% Glucose verwendet.

Über den Einfluß der Temperatur gibt folgende Tabelle ein Bild:

Glucose %	ccm	Temperatur	Wachstumsdauer in Tagen	Ausbeute an glucons. Ca %
15	400	30	7	10.2
>	>	26	5	23.3
>	>	22	5	26.0
>	>	18	7	23.0
>	>	14	9	23.0
>	>	10	11	17.8

<sup>3)</sup> A. 205, 183 [1888].

<sup>4)</sup> A. 357, 270 [1909].

<sup>5)</sup> l. c.

<sup>6)</sup> l. c.

Bei 22° ist also das Wachstum am besten und gleichzeitig die Ausbeute an Gluconsäure am höchsten. Bei den höheren Temperaturen geht der Abbauprozess zu schnell zur Citronensäure weiter, so daß zu einer Zeit, wo das Maximum von Gluconsäure vorliegen würde, schon ein zu großer Teil in Citronensäure umgewandelt ist. Bei den niedrigen Temperaturen ist die Ausbeute an Gluconsäure nur deshalb geringer, weil die Versuche hier etwas zu früh unterbrochen worden sind.

Wir können nach diesen weiteren Versuchen aussagen, daß die Gluconsäure nicht bloß bei der Gattung *Aspergillus*, sondern auch bei starken Säurebildnern der Gattung *Citromyces* das erste Oxydationsprodukt darstellt.

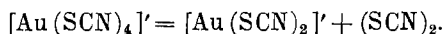
Über die weiteren Umsetzungen des Glucose-Moleküls behalten wir uns weitere Mitteilungen vor.

### 186. H. P. Kaufmann und J. Liepe: Chloride des Rhodans.

[Aus d. Pharmazeut. Institut d. Universität Jena.]

(Eingegangen am 11. April 1924.)

N. Bjerrum und A. Kirschner<sup>1)</sup> gebührt das Verdienst, in jüngster Zeit unsere Aufmerksamkeit auf das freie Rhodan gelenkt zu haben. Bei der Untersuchung der Zusammensetzung und Komplexität des Aurirhodanid-Komplexes führten sie Messungen von Platinelektroden-Potentialen in Aurirhodanid-Lösungen aus, die den Ablauf folgender Reaktion erkennen ließen:



Die Dissoziationsprodukte des Tetrarhodano-auriat-Ions sind also das Dirhodano-auriat-Ion und das bis dahin unbekannte freie Rhodan. Letzteres veranlaßte sekundäre Reaktionen. Für seine Zersetzung wesentlich war die Bestimmung des Normal-Potentials Rhodan-Rhodan-ion zu 0.769, nach dem Rhodan in der Reihe der freien Halogene zwischen Brom und Jod (entsprechende Zahlen: Jod 0.54, Brom 1.09) zu stehen kommt. Es mußte also aus Lösungen seiner Salze durch Brom in Freiheit gesetzt werden und selber Jod aus wäßrigen Jod-ionen-Lösungen frei machen.

Nachdem es nahezu gleichzeitig E. Söderbäck<sup>2)</sup> gelungen war, Rhodan in Lösungen und fester Form rein darzustellen, bestätigten mannigfaltige Umsetzungen seine auffallende Ähnlichkeit mit den Halogenen. Diesbezügliche Versuche sind außer den genannten Autoren von H. Lecher<sup>3)</sup> und seinen Mitarbeitern, F. Challenger<sup>4)</sup> und uns<sup>5)</sup> ausgeführt worden. Unterschiede der Reaktionsfähigkeit des Rhodans und der Halogene kann man einmal an der mehr oder weniger weitgehenden Halogenierung bzw. Rhodanierung des gleichen Stoffes erkennen, wie wir es am Beispiel des Dihydrokollidin-dicarbonensäure-äthylesters zeigten, zum anderen — bei Bildung völlig struktur-analoger Verbindungen — an der Geschwindigkeit der sich abspielenden Prozesse. Interessant aber mußte vor allem die Klärung der Frage sein, ob sich Rhodan mit den Halogenen in Verbindung bringen läßt.

1) Die Rhodanide des Goldes und das freie Rhodan. Host & Sohn, Kopenhagen 1918.

2) A. 419, 217 [1919].

3) B. 54, 632 [1921], 55, 1474, 1481, 1483 [1922], 56, 1104 [1923].

4) Soc. 123, 1046 [1923].

5) Ber. Dtsch. Pharmazeut. Ges. 33, 139 [1923]; B. 56, 2514 [1923].