

469. C. Wehmer:

Bildung von Citronensäure aus Glykonsäure durch Pilze.

[Aus d. Bakteriolog.-chem. Laboratorium der Techn. Hochschule Hannover.]
(Eingegangen am 13. Oktober 1925.)

Wenn der oxydative Abbau des Zuckers durch Fadenpilze tatsächlich über die Stufen der Citronensäure und Oxalsäure verläuft¹⁾, bleibt die Stellung der in den Kulturen von Falck und Kapur²⁾ reichlich nachgewiesenen *d*-Glykonsäure zunächst noch offen; es ist aber wohl kaum zweifelhaft, auch von denselben schon ausgesprochen, daß wir in dieser Säure das erste Oxydationsprodukt des umgesetzten Zuckers zu sehen haben; sie wäre in der Reihe also zwischen Glykose und Citronensäure zu stellen:

Glykose — Glykonsäure — Citronensäure — Oxalsäure — Kohlen-
säure.

Das in kreide-haltigen Zucker-Kulturen zunächst auftretende gelöste Ca-Salz einer organischen Säure¹⁾, aus dem der Pilz *Aspergillus niger* dann Ca-Citrat und Ca-Oxalat abscheidet, scheint also nicht saures Ca-Citrat, sonder Ca-Glykonat zu sein.

Wir müssen dann erwarten, daß der Pilz auch die ihm in zucker-freien Lösungen gebotene Glykonsäure in Citronensäure umsetzt, — bei der nahen Beziehung jener Säure zur Glykose im voraus eigentlich kaum zweifelhaft. Trotzdem sind die bisherigen bezüglichen Versuche negativ verlaufen, weder Butkewisch³⁾ noch Bernhauer⁴⁾ konnten Citronensäure erhalten, es ergab sich nur Oxalsäure.

Im Anschluß an andere Fragen wurden solche Versuche im hiesigen Laboratorium auch von den HHrn. Amelung und Schreyer mit verschiedenen Pilzen ausgeführt⁵⁾, und zwar mit positivem Erfolg; ich selbst habe dann mit der früher (l. c.) als Pilz 8 bezeichneten Rasse des *Aspergillus niger* das gleiche Ergebnis erhalten; es sei darüber kurz berichtet.

Verwendet wurden 8-proz. Lösungen von reinem Ca-Glykonat (Kahlbaum) unter Zusatz der auch sonst benutzten mineralischen Nährsalze, der Pilz kommt da im Thermostaten (35°) aus Sporenaussaat zu schneller üppiger Entwicklung, der Nährwert dieser Säure stand hinter dem von Zucker nicht zurück. Sie wird offenbar leicht verarbeitet, schon nach wenigen Tagen waren ansehnliche schwarzbraune Decken mit reichlicher Sporenbildung vorhanden, genau wie auf Zucker-Lösungen. Nach 13 Tagen wurde unterbrochen, es fanden sich — wie die Verarbeitung ergab — noch Reste unzersetzten Glykonats. Bereits in der ersten Woche kam es in den Kulturen zu reichlicher Abscheidung krystallinischer Calciumsalze in der bekannten Krustenform, sie zeigten alle Merkmale des Ca-Citrats (mikroskopisch feine Nadelchen, Reaktion von Denigès⁶⁾), fällbar aus der neutralisierten

¹⁾ C. Wehmer, B. 57, 1659 [1924] (S. 1660 dieser Mitteilung muß es Zeile 19 natürlich Calciumsalze statt Caliumsalze heißen).

²⁾ B. 57, 920 [1924]. ³⁾ Bio. Z. 142, 195 [1923], 154, 177 [1924].

⁴⁾ Bio. Z. 153, 517 [1924].

⁵⁾ Ausführliche Veröffentlichung folgt später. Bei den hier mitgeteilten Versuchen wurde ich durch die HHrn. Dipl.-Ing. W. Hasemann und Dipl.-Ing. H. Knapp unterstützt.

⁶⁾ A. ch. [7] 18, 415.

salzsauren Lösung durch Aufkochen); kleinere Anteile scheiden sich auch unterhalb der Pilzdecken ab. Bei der Verarbeitung ergaben 10 g angewandtes Ca-Glykonat bis gegen 1 g gefälltes Ca-Citrat, wobei noch bis zu 2.5 g des Glykonats als solches wiedererhalten wurden. Es ist hiernach kein Zweifel, daß Glykonsäure in Citronensäure umgesetzt wird.

Offenbar wurde sie aber auch hier schon teilweise zersetzt, in den Pilzdecken fanden sich nebenbei kleinere Mengen von Ca-Oxalat (ca. 0.5 g aus salzsaurer Lösung gefällt). Da diese Pilzrasse aus Zucker in der Regel nur, oder doch ganz überwiegend Citronensäure bildet, ist das auffällig, anscheinend spielen da die besonderen Bedingungen, unter anderem vielleicht auch die Wachstumstemperatur mit⁷⁾.

Zum Vergleich wurde nebenbei mit einer anderen Pilzrasse (*Aspergillus niger cinnamomeus*, Pilz 2 meiner früheren Versuche, l. c.) unter ganz denselben Bedingungen gearbeitet. Als ausgesprochener „Oxalsäure-Bildner“ setzte er, wie zu erwarten, das gesamte Ca-Glykonat in derselben Zeit so gut wie ausschließlich zu Ca-Oxalat um; zwei Versuche mit je 10 g des Salzes lieferten nur Ca-Oxalat (bis ca. 1.5 g), das ganz überwiegend die Pilzdecken inkrustierte, die Kulturflüssigkeiten selbst zeigten hier nur geringfügige Abscheidungen. In einem einzigen von vier Versuchen wurde in dem spärlichen Bodensatz des Kolbens etwas Ca-Citrat nachgewiesen (mikroskopisch und Reaktion von Denigès), es waren wenige Milligramm.

Glykonsäure liefert bei der Verarbeitung durch Pilze somit die gleichen Produkte wie Glykose, ihrer Annahme als Zwischenprodukt in Zuckerkulturen steht von dieser Seite her nichts im Wege.

Quantitativ liegen die Verhältnisse bei Vergleich mit Zucker vielleicht etwas anders; vergleicht man da die erhaltenen Zahlen für Citrat und Oxalat, so stehen sie hinter den bei Verarbeitung gleicher Zucker-Mengen erhaltenen Werten zurück; dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß hier durch reichlichen Kreide-Zusatz ein entsprechender Kalk-Überschuß vorhanden ist; die obigen Kulturflüssigkeiten waren bei Versuchsabschluß fast durchweg „sauer“ (Rötung von Lackmus, p_H ca. 4.5). Andererseits waren aber die Pilz-Ernten wenigstens ebenso hoch wie bei Zucker-Nahrung; zur Klärung dieser Fragen bedarf es einer größeren Zahl von Versuchen mit dem — leider etwas kostspieligen — Material.

Wie die Citronensäure nun aus der Glykonsäure entsteht, bleibt nach wie vor dunkel; auch der Nachweis dieser Muttersubstanz führt uns in der Erklärung kaum einen Schritt weiter, solange die Zwischenreaktionen unbekannt sind; im Gegensatz zur Oxalsäure kann sie nicht einfaches Oxydationsprodukt sein. Die Zahl der mehr oder minder wahrscheinlichen Hypothesen zu vermehren, hat bescheidenen Wert; mir scheint von diesen diejenige, welche die Säure-Entstehung mit Umwandlung oder Bildung von Amino-säuren⁸⁾ bzw. Eiweiß in Verbindung bringt, freilich noch am wenigsten gestützt. Der Weg zu den Amino-säuren geht bei den Pilzen

⁷⁾ Die gebildete Oxalsäure wenigstens wird von dem Pilz nach meinen früheren Feststellungen bei 35° (nicht bei 20°) wieder lebhaft zersetzt (Ber. D. Botan. Ges. 9, Heft 6, [1891]), auch stärkere Acidität wirkt in diesem Sinne.

⁸⁾ Kostytschew, Pflanzenatmung, Berlin 1924, S. 135, glaubt auch neuerdings, eine solche Beziehung der Pflanzensäuren zu den Amino-säuren annehmen zu dürfen, wogegen mir aber schon die quantitativen Verhältnisse zu sprechen scheinen; cf. W. Benecke in Benecke-Jost, Pflanzenphysiologie, Bd. I, 1924, S. 336.

wohl über die Pflanzensäuren (Citronensäure als einzige Kohlenstoff-Nahrung!), aber nicht umgekehrt, Umsatz von Amino-säuren (Ernährung durch Pepton u. a.) liefert keine Citronensäure.

Mag man auch die Möglichkeit eines zuvor stattfindenden Abbaues der Glykonsäure zu Verbindungen der 3-C-Reihe, die dann wieder irgendwie zu dem Molekül der Citronensäure verknüpft würden, zugeben — bei ihrer tatsächlichen Bildung aus Glycerin durch Pilze muß sie ja schließlich das Produkt einer derartigen Synthese sein —, so liegen doch hierfür bislang noch nicht die geringsten Andeutungen vor, und ebensogut ist ein direkterer Weg denkbar.

Beschreibung der Versuche.

1. Ansatz: Glykonsaurer Kalk (Kahlbaum) in 8-proz. Lösung (Vers. 1—4, je 10 g, Vers. 5—6, je 1 g), von Nährsalzen als N-Nahrung NH_4Cl oder KNO_3 (0.05 g und 0.5 g), neben KH_2PO_4 (0.25 g) und MgSO_4 , kryst. (0.12 g), watteverschlossene Kolben, nach Aufkochen die Ca-Phosphat-Trübung durch einige Tropfen HCl gelöst; Sporenaussaat, Lichtabschluß, Wachstumstemperatur 35° (Thermostat).

2. Verarbeitung nach 13 (Vers. 1—4) bzw. 7 Tagen (5—6), getrennt in Pilzdecke, Flüssigkeit und Bodensatz (Calciumsalz-Abscheidungen).

a) Pilzdecken nach kurzem Abspülen unterseits, getrocknet bei 100° (Reihe 4 unten), in Versuch 1—4 je 0.300 g zur Aschen-Bestimmung (Reihe 5), übriges zerrieben, wiederholt mit 10-fachem Volum heißer Salzsäure digeriert. Filtrat mit b vereinigt. Deckenreste hatten trotzdem noch bis über 3% Asche.

b) Calciumsalz-Abscheidungen nach Abfiltrieren usw. (Reihe 2), in Salzsäure gelöst, mit Filtrat von a vereinigt.

c) Kultur-Flüssigkeit mit Waschwässern auf Wasserbad zur Trockne, bei den NH_4Cl -Kulturen stark hygroskopisch, 2 Wochen über H_2SO_4 im Exsiccator, es blieb harter bräunlicher Lack (Vers. 3—6) oder hellbraune kristallinische Masse (1—2), aus letzterer nach Auflösen in kochendem Wasser noch Rückstand kleiner Ca-Citrat-Mengen (0.206 g und 0.122 g), wieder eingeengt, mit dem mehrfachen Volum Alkohol versetzt, reichliche Abscheidung von unzersetztem Ca-Glykonat (Versuch 1), nach Stehen feine mikroskopische Nadeln, sehr ähnlich dem Ca-Citrat. In den lackartigen Rückständen von 3—6 weder Citrat noch Glykonat nachweisbar, im wesentlichen die Reste der Nährsalze mit etwas Phosphat und anderes. Rückstände der Kulturflüssigkeit = Reihe 3.

d) Fällung der Ca-Salze: Salzsäure Lösung von a und b vorsichtig mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, mit Essigsäure wieder angesäuert, wobei das mitgefallene Ca-Phosphat in Lösung geht, Oxalat-Niederschlag getrocknet (100°) = Reihe 1b. Filtrat gekocht, das ausgefallene Ca-Citrat = Reihe 1a. Aus dem Filtrat noch kleine Mengen Citrat nach Einengen und Wiederaufnehmen mit kochendem Wasser (Rückstand). Mikroskopisch zeigt das mehliges, kreideweisse Oxalat fast ausschließlich sehr kleine, amorphe Körnchen (selten sogenannte „Oktaeder“), das sandige Citrat stets feine, spitze Nadelchen, zu derberen Aggregaten, auch Sphäriten, vereinigt, bereits in sehr kleinen Mengen die Reaktion von Denigès gebend.

Aus 10 g Ca-Glykonat ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}\text{Ca} + 1\text{H}_2\text{O}$), enthaltend 8.75 g Glykonsäure, würden hiernach ungefähr 2—3 g Pilzsubstanz (Deckengewicht minus

Zahlen in g:

Nr.	1		2 von 1 als kryst. Ab- scheidung in der Kultur- flüssigkeit	3 Rückstand der Kultur- flüssigkeit	4		5 Asche von 4	6 Angew. Ca-Gly- konat	Pilz und Stickstoff- Quelle
	Citrat	Oxalat			frisch	trocken			
1	0.985	0.634	0.622 (Citrat)	3.852 ¹⁰⁾ (abz. 0.206 Citrat)	12.11	2.812 (23.43 %)	0.5316 (18.7 %)	10	Pilz 8 KNO ₃ - Stickstoff
2	0.743	0.611	0.201 (Citrat)	1.428 (abz. 0.122 Citrat)	15.5	4.322 (27.88 %)	0.8496 (19.9 %)	10	Pilz 8 NH ₄ Cl- Stickstoff
3	0	1.457	0.100 (Oxalat)	0.757 (kein Citrat!)	25.3	4.451 (17.59 %)	1.087 (24.48 %)	10	Pilz 2 KNO ₃ - Stickstoff
4	0	1.670	0.008 (Oxalat)	0.942 (kein Citrat!)	20	3.680 (19.43 %)	0.900 (24.46 %)	10	Pilz 2 NH ₄ Cl- Stickstoff
5	0	— ⁹⁾	0.035 (Oxalat)	0.065 (kein Citrat!)	—	0.421	0.093 (22.11 %)	1	Pilz 2 NH ₄ Cl- Stickstoff
6	Spur	— ⁹⁾	0.022 (Citrat + Oxalat)	0.070 (kein Citrat!)	—	0.490	0.120 (24.39 %)	1	Pilz 2 KNO ₃ - Stickstoff

Ca-Oxalat) gebildet sein. Nur bei Versuch 1 gab der Kulturflüssigkeits-Rückstand noch unzersetztes Ca-Glykonat (2.585 g), nach Wiederaufnahme mit siedendem Wasser und Abfiltrieren des Ca-Citrats, gefällt durch Alkohol; bei Versuch 2 dagegen allein etwas Ca-Citrat und bei Versuchen 3–6 keins von beiden. Die geringen Mengen dieser, gleichzeitig die Reste der Nährsalze enthaltenden Rückstände waren für genauere Untersuchung unzureichend, anscheinend enthalten sie unter anderem noch das Salz einer unbestimmten organischen Säure (in Versuch 2 nachgewiesen), darauf deutet auch der mit der Menge des aus ihnen extrahierten Ca-Oxalats nicht recht in Einklang stehende hohe Aschengehalt der Pilzdecken ($\text{CaO}:\text{CaC}_2\text{H}_3 + \text{H}_2\text{O} = 56:128$). Unter besonderer Berücksichtigung dieser Punkte sollen die Versuche mit größeren Substanzmengen wiederholt werden. Übrigens deuten die Zahlen schon an, daß auch die besondere Form der Stickstoffverbindung die Reaktionen beeinflußt.

⁹⁾ Das Oxalat aus den kleinen Decken wurde hier nicht bestimmt.

¹⁰⁾ davon 2.595 g unverändertes Ca-Glykonat (Alkohol-Fällung aus der mit Wasser wieder aufgenommenen Masse).

¹¹⁾ Die Zahlen für Frischgewicht sind genau kaum zu bestimmen.