

Es scheidet sich reichlich ein dunkel gefärbtes Öl ab, das nach Behandlung mit 50-proz. Kalilauge, in durch Schmp. und Misch-Schmp. identifiziertes Triphenyl-isoxazol übergeht.

Stilben aus *aci*-Phenyl-nitro-methan-natrium.

2.8 g Phenyl-nitro-methan wurden in 30 ccm 20-proz. Kalilauge oder in 40 ccm 10-proz. Natronlauge warm gelöst und mit 2.6 g Jod versetzt. Nach etwa 10 Min. langem, heftigem Kochen hatten sich 1.5 g Stilben vom Schmp. 124⁰ abgeschieden. Dieselbe Menge Stilben wird erhalten, wenn man die Jodmenge auf 0.6 g herabsetzt, doch muß dann länger gekocht werden. Gibt man noch weniger Jod zu, so sinken die Stilben-Ausbeuten, doch scheint keine Proportionalität zu bestehen. Im Moment der Jod-Zugabe wurde stets das Auftreten kleiner Mengen Benzaldehyd beobachtet, welche überdestilliert und als Azin identifiziert wurden.

421. C. Wehmer: Zur Zersetzung der Gluconsäure durch Pilze.

[Aus d. Bakteriolog.-chem. Laboratorium d. Techn.-chem. Instituts d. Techn. Hochschule Hannover.]

(Eingegangen am 12. September 1929.)

Als Zwischenprodukt des Zucker-Abbaues durch aerobe Pilze scheint die hier zuerst von Molliard nachgewiesene Gluconsäure allgemeiner verbreitet zu sein, über ihr weiteres Schicksal ist indes bislang wenig genaueres bekannt. Sicher steht, daß die bisweilen in großer Menge angesammelte Säure (bis gegen 50% des Zuckers als Calciumsalz) allmählich aus den Kulturflüssigkeiten wieder verschwindet; man hat sie wohl als Übergangsstufe zur Citronensäure oder Fumarsäure angesehen, ein Beweis ist dafür nicht erbracht, und das Gegenteil ist heute wahrscheinlicher¹⁾. Nachgewiesen ist aber, daß ihr Ca-Salz gewöhnlich in Oxalat übergeht, was dazwischen liegt, bleibt unsicher.

Mit dem Wiederverschwinden des Calcium-gluconats in Zucker-Kulturen des Pilzes *Aspergillus mutatus* häuft sich nach meiner früheren Feststellung²⁾ nicht Ca-Oxalat, sondern reichlich Ca-Carbonat in der Pilzmasse an, seine Auffassung als Verbrennungsprodukt des Gluconats lag nur nahe. Inzwischen habe ich den Vorgang an zucker-freien Kulturen mit reinem Calcium-gluconat etwas näher nach der quantitativen Seite verfolgt.

Der nicht für Stoffbildung vom Pilze verbrauchte Anteil der Säure lieferte an nachweisbaren Produkten nur CO₂ in Form fest abgeschiedenen Calcium-carbonats; über etwaige Zwischenprodukte gaben die Versuche keinen Aufschluß, doch waren weder Oxalsäure noch Citronen- oder Weinsäure nachweisbar, Fumar- und Äpfelsäure blieben zweifelhaft, bestenfalls kann es sich um verschwindende Mengen handeln.

¹⁾ Über die Literatur s. Note 2.

²⁾ Biochem. Ztschr. **197**, 427 [1928]. — Den Pilz, dessen Eigenschaften bis heute die gleichen geblieben sind, darf man wohl als besondere Art betrachten; für sie scheint mir der Name *Aspergillus mutatus* bezeichnend.

An CaCO_3 wurde aus 5 g Ca-Gluconat bis nahezu 1 g (neben im Mittel 1 g Pilz-Trockengewicht) erhalten, berechnet 1.116 g; zum kleineren Teil findet es sich als pulveriger Satz am Boden der Kolben in Gestalt kleiner Körnchen, Kryställchen und Sphärite (bis 35μ im Durchmesser), hauptsächlich inkrustiert es die Pilzdecken, denen es durch heiße Essigsäure unter CO_2 -Entwicklung entzogen und als Acetat gewogen wird; direkt ergibt sich das Carbonat mit annähernder Genauigkeit aus der Differenz der Deckengewichte vor und nach der Extraktion. Erhalten an Acetat bis 1.4 g ca. (berechnet 1.741); außer Acht gelassen ist dabei der Kalkgehalt des Rückstandes der Kulturflüssigkeit. Bei dem langsamen Umsatz des auch nach vielen Wochen noch nicht restlos zersetzten Gluconats bedarf es langer Versuchsdauer; es mag dabei die allmählich eintretende, schwach alkalische Reaktion der Flüssigkeit mitsprechen (p_{H} anfangs = 4.8, am Schluß = 8.9).

Auftreten von Calciumcarbonat im Stoffwechsel eines Pilzes ist sicher eine besondere Erscheinung; sie erinnert an die Fälle, wo auch bei Phanerogamen dieses Salz in fester Form in der Zelle abgeschieden wird (Cystolithen von Ficus, Familien der Ulmaceen und Moraceen); in der Regel tritt bekanntlich auch hier der Kalk als Oxalat auf.

Man sollte nun eigentlich erwarten, daß der Pilz andere Salze der Gluconsäure gleichfalls in Carbonate umwandelt, das ist aber keineswegs der Fall. Alkali-gluconat z. B. müßte dann infolge sogleich eintretender Alkalität kein Entwicklungsboden sein, tatsächlich ist aber Natriumgluconat im allgemeinen ein ganz guter und ziemlich flott verarbeiteter Nährstoff. Wie Versuche zeigten, tritt hier Oxalsäure als Verbrennungsprodukt auf, es sammelt sich jetzt Natriumoxalat in ähnlicher Menge an, wie oben Calciumcarbonat — sehr „zweckmäßig“, doch sicher auffällig. Das Salz bleibt als Rest beim Einengen der Kulturflüssigkeit zurück und wird durch Fällung mit Chlorcalcium identifiziert. Aus 5 g Na-Gluconat wurden bis über 2 g Ca-Oxalat erhalten. Auf das Ergebnis ist aber die Acidität der Flüssigkeit von Einfluß, in neutraler Lösung kann hier das entstandene Oxalat teilweise zu Carbonat weiteroxydiert werden (p_{H} bis 8.2).

Gleiches unterschiedliches Verhalten zeigt der Pilz gegenüber Calcium- und Alkalisalzen anderer organischer Säuren, worüber besonders berichtet wird; soweit ihre Ca-Salze wasser-löslich sind, ergeben sie Carbonat (Milchsäure, Äpfelsäure), Na-, K- oder NH_4 -Salze dagegen Oxalate, reichlich jedoch nur die primären, im Gegensatz zu den schwerer angreifbaren neutralen, bei denen das End- p_{H} der Kulturflüssigkeit bis gegen 9 steigen kann. Daß auch bei Zersetzung von Ca-Salzen zunächst Oxalsäure erscheint, wird man kaum annehmen, es sei denn, daß sie sofort weiterzerfällt.

Beschreibung der Versuche.

Alle Versuche übereinstimmend in Erlenmeyer-Kolben mit meist 5 g der Salze in 100 ccm Wasser, als Nährsalze $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.150$ g und MgSO_4 , kryst. = 0.080 g, N als Harnstoff = 0.3 g; Salze usw. von Kahlbaum und Riedel-De-Haën. Im Dampftopf sterilisiert, Watte-Verschuß. Aussaat: Mycel aus Reinkultur in Röhren, je rund 100 mg; bei Zimmer-Temperatur am Licht langsam zu hellen Decken heranwachsend. Bei Abschluß Decken und Flüssigkeit gesondert verarbeitet. — Ca-Gluconat $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Ca}$, $\text{H}_2\text{O} = 448$; Ca-Acetat $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\text{Ca}$, $1 \text{H}_2\text{O} = 176$; $\text{CaCO}_3 = 100$.

1. Calciumgluconat.

Alle Zahlen in g, Versuchsdauer 12 und 13 Wochen.

Vers. Nr.	Angew.	Ca-Acetat roh, kryst.	Pilzdecke + CaCO ₃ (100 ⁰)	Pilzgew. (100 ⁰)	CaCO ₃ als Diff.	Rückstand der Flüssigk.	Acidität
1 (1)	5	1.433	1.402	0.451*	0.951	0.783	neutral; Schluß alkal. Mit 1 % Glucons. anges. PH = 4.8 (anfangs), 8.9 am Schluß.
2 (2)	5	1.423	1.743	0.757	0.986	0.744	
3 (7)	5	1.223	2.097	1.123	0.974	0.576	
4 (8)	5	1.041	1.969	1.200	0.769	0.484	
5 (39)	15	3.875	3.741	1.000*	2.741	0.782	
6 (40)	15	3.691	4.430	1.874	2.556	0.790	

Das Ca-Acetat bei gegen 100⁰ getrocknet (Wasserbad), beim Umkrystallisieren hinterbleibt überall kleiner pulveriger Rückstand (9—120 mg), anscheinend Gemenge anorganischer und organischer Ca-Salze, unlöslich in Wasser. Der Rückstand der Flüssigkeit bildet bräunliche, lack-artige Masse mit Resten der Nährstoffe als Ca-Salze, gibt mit HCl Gasbläschen, doch keine scharfen Reaktionen. — Das in Nr. 5 und 6 sich zunächst wieder abscheidende Gluconat geht langsam wieder völlig in Lösung.

2. Natriumgluconat.

Zahlen wie vorher in g, Versuchsdauer 9 Wochen (Nr. 1 und 2) u. 13 Wochen (Nr. 3).

Vers. Nr.	An-gewandt	Ca-Oxalat gefällt	Rückstand d. Flüssigk.	Pilz-gew.	PH am Schluß
1 (14)	5 neutral ³⁾	1.537	2.650	0.288	8.2
2 (15)	5 ebenso	1.287	2.300	0.306	8.1
3 (41)	5 sauer (+ 1 ccm Glucons.*)	2.264	2.830 ⁴⁾	0.371	5 (anfangs 4.9)

Rückstand der Flüssigkeit gibt Reaktion auf Gluconsäure (β -Naphthol = blau), mit HCl kleine Gasbläschen (Nr. 1 u. 2), sonst nur mit CaCl₂ Oxalat-Fällung; im eingengtten Filtrat der Oxalat-Fällung Spur wasser-unlöslichen pulverigen Salzes unbestimmter Art.

³⁾ Aus 5 g Gluconsäure (10 g von 50 %) und 3.7 g Na₂CO₃, 10 H₂O.

⁴⁾ Färbt blaues Lackmus hellrot. Die pH-Bestimmungen mit dem Doppelkeil-Colorimeter von Bjerrum-Arrhenius (von F. u. M. Lautenschläger-München) durch Hrn. Dipl.-Ing. W. Thies. — Die mit * bezeichneten 2 Versuche erwiesen sich bei Abschluß als bakterien-haltig.