

31. W. Thies: Über den Abbau der Salze organischer Säuren durch den Schimmelpilz *Aspergillus fumaricus*.

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

(Eingegangen am 8. Dezember 1930.)

In seiner Arbeit über die Abnahme des „Säuerungs-Vermögens und die Änderung der Säure bei einem Pilz“ hatte Wehmer¹⁾ festgestellt, daß der Schimmelpilz *Aspergillus fumaricus* vom Fumarsäure-Bildner zum Gluconsäure-Bildner geworden war, und auch bei meinen Untersuchungen über den „Einfluß der Bedingungen auf die Säure-Bildung“²⁾ desselben Pilzes war dies fortlaufend beobachtet worden. Es ergab sich nun die Frage, wozu der Pilz die einmal gebildete und dann in älteren Kulturen wieder verschwindende Gluconsäure weiter abbaut. Früher sah man in ihr das erste Abbauprodukt des Zuckers zur Citronensäure bei *Aspergillus niger*. Aber bereits Amelung³⁾ hielt dies für unwahrscheinlich, da er aus Gluconsäure als einziger C-Quelle nur geringe Mengen Citronensäure erhielt. Ich selbst fand in meinen Versuchen⁴⁾ mit *Aspergillus niger* bei Ca-Gluconat als einziger C-Quelle nur Ca-Oxalat als Abbauprodukt, Citronensäure war in keinem Stadium nachzuweisen. Gluconsäure ist also kein Zwischenprodukt auf dem Wege zur Citronensäure, welche Rolle sie aber beim Zucker-Abbau der Schimmelpilze spielt, ist immer noch nicht eindeutig festgestellt.

Während nun *Aspergillus niger* in den Ca-Gluconat-Kulturen Ca-Oxalate bildete, fand Wehmer⁵⁾ bei *Aspergillus fumaricus* reichliche Mengen Ca-Carbonat, wenn Ca-Gluconat als alleinige C-Quelle verwendet war. Dies war auffällig. Wenn auch Kohlensäure Endprodukt der Zucker-Vergärung ist, so war doch eine so reichliche Anhäufung von Ca-Carbonat bei Schimmelpilzen noch nicht beobachtet. Noch auffallender aber war, daß derselbe Pilz aus dem Alkalisalz der Gluconsäure keine Kohlensäure bildete, sondern dieselbe dann nur bis zur Oxalsäure abbaute.

Wehmer macht hierfür die Acidität der Kulturflüssigkeit verantwortlich. An derselben Stelle weist er bereits auf das unterschiedliche Verhalten dieses Pilzes gegenüber Ca- und Alkali-Salzen anderer organischer Säuren, die sich analog denen der Gluconsäure verhalten, hin. Diese Beobachtung war für mich von großem Interesse für meine Untersuchung des Säuerungsvermögens des *Aspergillus fumaricus*, der, wie gezeigt wurde, außer Kohlensäure und, Oxalsäure in ganz alten Kulturen, 1. Gluconsäure, 2. Citronensäure und 3. Fumarsäure, völlig unabhängig von einander, bildet. Es kam nun darauf an, festzustellen, ob dieser Pilz noch andere Säuren als Zwischenprodukte auf dem Abbauweg vom Zucker zu den 3 genannten Säuren bilden kann; diese Säuren mußten bei Verarbeitung der Kulturen neben den 3 Endprodukt-Säuren aufgefunden werden. Das ist aber nicht der Fall, nicht einmal Spuren anderer Säuren wurden von mir nachgewiesen.

Es gibt nun noch einen anderen Weg, dieses Ergebnis nachzuprüfen: Sollten die vermuteten Säuren doch Zwischenprodukte sein, so müßte der

¹⁾ C. Wehmer, *Biochem. Ztschr.* **197**, 418 [1928].

²⁾ *Zentralbl. Bakteriol.* II. Abt. **82**, 321 [1930]; Dissertat. Hannover.

³⁾ J. Amelung, *Ztschr. physiol. Chem.* **166**, 161 [1927]; Dissertat. Hannover.

⁴⁾ Diplom-Arbeit, Hannover 1927 (nicht gedruckt).

⁵⁾ C. Wehmer, *B.* **62**, 2672 [1929].

Pilz sie in zucker-freien Kulturen zu Citronen- bzw. Fumarsäure abbauen. Entsprechende Versuche wurden von mir mit folgenden Säuren: Gluconsäure, Zuckersäure, Citronensäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Fumarsäure und Milchsäure durchgeführt. Dabei wurden Citronensäure und Fumarsäure mit in die Untersuchung einbezogen, um festzustellen, ob sie ausschließlich Endprodukt oder ob sie für den Pilz noch weiter verwertbar sind. Zuckersäure bei *Aspergillus niger* ist von Challenger, Subramaniam und Walker⁶⁾ nachgewiesen. Milchsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure neben Fumarsäure wurden bei *Rhizopus nigricans* von Ehrlich⁷⁾, bei anderen *Rhizopus*-Spezies von Takahashi und Sakaguchi⁸⁾ nachgewiesen. Äpfelsäure bei *Aspergillus fumaricus* wurde auch von Wehmer¹⁾, allerdings nicht regelmäßig, festgestellt.

Beschreibung der Versuche.

Alle Versuche wurden übereinstimmend in 250-ccm-Erlenmeyer-Kolben mit voll entwickelter Pilzdecke angesetzt, da es mir nicht darauf ankam, den Nährwert der einzelnen Säuren zu ermitteln; auch sparte ich auf diese Weise den Zusatz von Nährsalzen, und ich hatte es nur mit den Säuren zu tun. Diese wurden als Ca-Salze (Präparate: Merck, Kahlbaum, z. T. auch aus der freien Säure mittels Kreide selbst dargestellt) in Mengen von 5 g oder 10 g mit 100 ccm Wasser unter die vollentwickelten Pilzdecken gebracht und unter Watte-Verschluß bei Tageslicht und Zimmer-Temperatur kultiviert. Um den Einfluß der Acidität auf den Abbau der Säuren festzustellen, wurde bei einigen Versuchen dem neutralen Salz etwas freie Säure hinzugefügt und auf diese Weise ein saures Anfangs-p_H geschaffen. Auf die Wasser-Löslichkeit der Ca-Salze wurde keine Rücksicht genommen, die schwer löslichen Salze wurden mit dem ungelösten Anteil als Bodensatz kultiviert.

Die Ca-Salz-Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt. Zur Verarbeitung der Kulturen wurden die Pilzdecken, die das gebildete Ca-Carbonat imkrustiert enthielten, von der Kulturflüssigkeit, die nur Spuren von Ca-Carbonat im Bodensatz enthielt, abgehoben. Da es mir weniger darauf ankam, das Ca-Carbonat quantitativ zu erfassen, als vielmehr die Art der gebildeten Säuren festzustellen, habe ich das Bodensatz-Carbonat in den meisten Fällen vernachlässigt. Die gewogenen Pilzdecken wurden mit heißer Essigsäure von dem inkrustierenden Carbonat befreit und hiernach wieder gewogen; die Differenz war dann das von dem Pilz gebildete Carbonat. Außerdem wurde noch das krystallisierte, rohe Ca-Acetat bestimmt. Im Rückstand der Kultur-Flüssigkeiten wurde die nicht verbrauchte Säure gewogen und auf etwaige Anwesenheit anderer Säuren geprüft.

In Tabelle II sind die Versuche mit den K-, Na- und Ammonium-Salzen derselben Säuren zusammengestellt; auch hier wieder neutrale und saure Kultur-Flüssigkeiten. Die Verarbeitung der Kulturen richtete sich nach der verschiedenen Löslichkeit der von dem Pilz in dieser Versuchsreihe gebildeten Alkali-oxalate und der Ausgangs-Salze. Entweder ließ ich die Alkali-oxalate auskrystallisieren oder fällte sie mit CaCl₂ als schwer lösliche Ca-Salze. Die Einzelheiten gehen aus der Tabelle hervor.

⁶⁾ Journ. chem. Soc. London 1927, 200.

⁷⁾ B. 51, 1663 [1918].

⁸⁾ Journ. Agric. chem. Soc. Japan 1, Nr. 5 [1925].

Tabelle I. (Gewichtszahlen in Gramm.)

	Gluconsaures Ca		Zuckersaures Ca		Citronensaures Ca		Bernsteinsaures Ca	
	10 g Ca-Gluconat, PH = 7.0	5.0 g Ca-Gluconat 10.0 g Gluconsäure (50-proz.), PH = 4.1	5.0 g zuckersaures Ca, PH = 6.9-7.0	5.0 g Ca-Citrat, PH = 6.9-7.0	2.5 g Ca-Citrat, 2.5 g Citronensaure kryst., PH = 4.1	5.0 g Ca-Lactat, 5.0 g Ca-Succinat, PH = 7.0		
Alter i. Woch.	4	8	4	4	4	4	4	4
PH	6.8	7.6	6.9	7.1	7.1	7.1	7.1	7.3
Pilzdecke +								
CaCO ₃ ...	2.235	3.264	1.791	1.502	1.750	1.820	3.796	4.129
Pilzdecke ..	1.268	1.429	1.212	1.116	1.239	1.417	2.495	2.447
CaCO ₃ als								
Differenz.	0.813	1.635	0.579	0.286	0.411	0.303	1.299	1.682
Ca-Acetat .	1.412	2.563	0.799	0.341	0.652	0.456	1.872	2.507
Rückstand .	3.91	1.76	2.01	4.26	2.64	2.60	1.25	0.73

Tabelle I. (Fortsetzung). (Gewichtszahlen in Gramm.)

	Weinsaures Ca		Äpfelsaures Ca		Fumarsaures Ca		Milchsäures Ca	
	5.0 g Ca-Tartrat, PH = 6.9	5.0 g Ca-Malat, PH = 7.6	4.0 g Ca-Malat, 1.0 g Äpfelsäure, PH = 4.5	5.0 g Ca-Fumarat, PH = 7.1	10.0 g Ca-Lactat, 5.0 g Milchsäure, PH = 4.2			
Alter i. Woch.	4	4	4	4	4	4	4	4
PH	7.4	7.7	7.0	7.1	7.0	6.9	7.1	über 8?
Pilzdecke +								
CaCO ₃ ...	1.409	3.395	2.896	3.044	3.453	1.562	1.802	2.246
Pilzdecke ..	1.172	1.910	1.704	1.619	2.612	1.468	1.673	1.792
CaCO ₃								
(Differenz)	0.237	1.485	1.192	1.425	0.841	0.094	0.129	0.454
Bodensatz								
CaCO ₃								
Ca-Acetat .	0.346	2.039	1.634	2.032	1.306	0.136	0.172	0.691
Rückstand .	4.16	1.91	2.54	1.37	1.91	6.82	4.93	2.42

(freie Säure!)

Tabelle II. (Gewichtszahlen in Gramm.)

	Gluconsaures Na		Citronensaures Na		Bernsteinsaures K. 5.0 g K-Succinat, pH = 7.3	Weinsaures NH ₄ 5.0 g NH ₄ -Tatrat, pH = 7.0
	5.0 g Na-Gluconat, pH = 7.0	2.5 g Na-Gluconat, 2.5 g Gluconsäure, pH = 4.6	5.0 g Na-Citrat (neutral), pH = 7.1	5.0 g Na-Citrat (sauer), pH = 4.3		
Alter i. Woch.	4	4	8	4	4	8
pH	6.7	5.1	7.3	4.7	7.0	6.3
Pilzdecke ..	0.421	0.572	0.739	1.112	0.639	0.492
Oxalat (ge- fällt)	0.911	1.163	1.781	1.439	0.984	Spur
Rückstand .	2.79	2.66 (Ca-Salz)	± 0.5 (Ca-Salz)	± 0.7 (Ca-Salz)	3.01 (Ca-Salz)	4.8 (Ca-Salz)

Tabelle II. (Fortsetzung). (Gewichtszahlen in Gramm.)

	Äpfelsaures K		Fumarsaures Na		Milchsäures Na	
	6.0 g K-Malat, pH = 6.4	5.0 g K-Malat, 1.0 g Äpfelsäure (K.), pH = 4.5	5.0 g Na-Fumarat, pH = 7.0	10.0 g Na-Lactat, pH = 5.6 (?)	5.0 g Na-Lactat, 5.0 g Milchsäure pH = 4.5	
Alter i. Woch.	4	4	8	4	4	8
pH	6.5	5.9	7.3	7.2	7.3	7.4
Pilzdecke ..	0.489	0.554	0.431	0.314	0.477	0.739
Oxalat (gefällt)	1.182	1.110 (Ca-Salz)	0.713 (Ca-Salz)	1.424	2.069 (Ca-Salz)	1.653
Rückstand .	1.43	1.72 (Ca-Salz)	2.298 (freie Säure)	5.35	1.47 (Ca-Salz)	4.82 (Ca-Salz)

Beim Vergleich der Versuche der beiden Reihen fallen die Deckengewichte auf. Bei den Versuchen mit den Ca-Salzen finden wir sämtliche Decken kräftig entwickelt, sie enthalten die Hauptmenge des abgetrennten kohlen-sauren Calciums und haben ein Trockengewicht von 1.5–3 g. Dagegen zeigen sämtliche Kulturen der Tabelle II (Alkalisalze) nur magere und schwach entwickelte Decken, deren Trockengewicht im allgemeinen 1 g nicht überschreitet. Diese Decken enthielten kein Carbonat inkrustiert, der Abbau der organischen Alkalisalze war in jedem Falle bei der Oxalsäure stehengeblieben.

Worin liegt nun dies unterschiedliche Verhalten begründet? Die Kulturbedingungen sind in beiden Versuchsreihen die gleichen. Ein modifizierender Einfluß der Acidität war nicht festzustellen: es war ohne Einfluß, ob das Kulturmedium sauer oder neutral war. Dagegen scheint aber das Kation von Einfluß zu sein; ist dasselbe 2-wertig, so geht die Verbrennung bis zum Endprodukt, der Kohlensäure; ist das Kation dagegen 1-wertig, so bleibt die Verbrennung bereits bei der Oxalsäure stehen.

Ob nun die Wertigkeit des Kations beim Abbau der organischen C-Quelle eine derart entscheidende Rolle spielt, muß noch durch gleichgestellte Versuche mit anderen Schimmelpilzen nachgeprüft werden. Sollten diese anderen Pilze nun durch das Kation nicht in derselben Weise beeinflußt werden, so zeigt sich *Aspergillus fumaricus* wieder einmal als ein „chemisches Rätsel“.

Aber eines geht aus den Versuchen deutlich hervor; die Annahme, daß der Zucker-Abbau zu Citronen- oder Fumarsäure über andere Säuren als Zwischenprodukte vor sich geht, findet keine Stütze. Sämtliche Säuren, einschließlich der Citronensäure und Fumarsäure, sind scheinbar Endprodukte, sie können aber alle weiter verbrannt werden. Ausschließliche Endprodukte sind nur (Oxalsäure und) Kohlensäure. Warum aber Gluconsäure, Citronensäure und Fumarsäure im Betriebs-Stoffwechsel der Pilze abgeschieden und mit Hilfe von Neutralisationsmitteln angehäuft werden können, kann bei unserer heutigen Kenntnis der Lebens-Bedingungen der Pilze noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

32. Lothar Birckenbach und Josef Goubeau: Pseudohalogene, XII.: 1) Über ihre Formulierung. 2) Trichlor- methyl-perchlorat¹⁾.

[Aus d. Chem. Institut d. Bergakademie Clausthal.]

(Eingegangen am 8. Dezember 1930.)

I. In einer Reihe von Abhandlungen wurde über die Halogen-Ähnlichkeit der cyan-haltigen Gruppen SCN, SeCN, OCN, C(CN)₃, N(CN)₂ berichtet. Es steht in dieser Linie noch aus der dem Cyanat-Rest isomere Knallsäure-Rest. Ihm wurde ein eingehendes Studium gewidmet, dessen Ergebnisse vor der Publikation stehen.

¹⁾ Zum Teil vorläufig mitgeteilt unter dem Namen Trichlor-perchlorat-methan: Naturwiss. 18, 530 [1930].