Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 62 (1952)

Artikel: Über die Bedingungen der Bildung von Fumarsäure als Endprodukt des Stoffwechsels bei Rhizopus-Arten

Autor: Meder, Hugo

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-43610

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Über die Bedingungen der Bildung von Fumarsäure als Endprodukt des Stoffwechsels bei Rhizopus-Arten

Von *Hugo Meder*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 23. November 1951

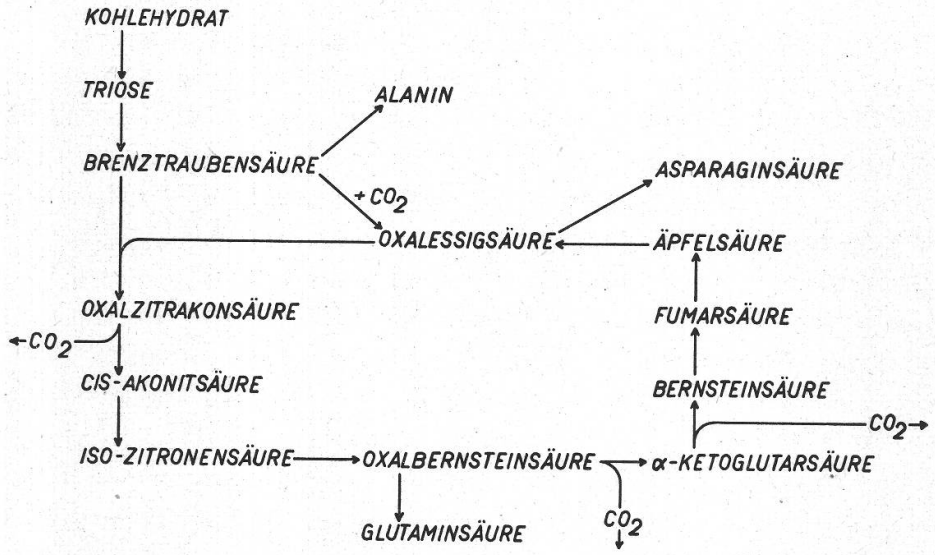
Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	164
Durchführung der Stoffwechselversuche	167
Fortzüchtung der Reinkulturen und Sporengewinnung	170
Impfung der Stoffwechselversuche	171
Wachstum und Aspekt des Myzels	172
Aufarbeitung der Versuche	173
Polarographische Fumarsäurebestimmung	173
Trockenmasse und Verdunstungsverlust	176
Bestimmung des Äthylalkohols	176
Bestimmung der zurückgebliebenen Glukose	176
Zeitlicher Verlauf des Glukoseverbrauches, der Änderung der Trockenmasse und der Fumarsäurebildung	177
Die Fumarsäurebildung durch verschiedene Stämme der Gattung *Rhizopus* Ehrenberg	178
Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	180
Die Wirkung anorganischer Nährstoffe	182
Einfluß der Stickstoffkonzentration	182
Einfluß der Phosphatkonzentration	183
Wirkung des Sauerstoffentzuges	184
Diskussion dieser Versuche	185
Die Kohlenstoffversorgung	187
Einfluß der Glukosekonzentration	187
Die Eignung verschiedener Kohlenstoffquellen	191
Ausnützung verschiedener Kohlenstoffquellen	192
Kohlenstoffbilanz und Weg der Fumarsäurebildung	193
Zusammenfassung	200
Literaturverzeichnis	202

Einleitung

Wie die Forschungsergebnisse der letzten zehn bis fünfzehn Jahre zeigen, kommt verschiedenen organischen Säuren, darunter auch den Dikarbonsäuren mit vier Kohlenstoffatomen (Oxalessigsäure, Apfel-, Fumar- und Bernsteinsäure), im Stoffwechsel wohl aller Organismen größte Bedeutung zu: Es sind katalytisch wirkende «Vehikelsubstanzen»

des Kohlehydratabbaues, die in einem Kreislauf ineinander übergehen, dabei die aus der Spaltung der Kohlehydrate hervorgehende Brenztraubensäure aufnehmen und in drei Moleküle Kohlendioxyd zerlegen, wie das Schema nach Krebs (1943) zeigt; die Darstellung ist in Details etwas vereinfacht, die Oxalzitrakonsäure nach Wood et al. (1942) eingefügt (Figur 1; vgl. auch Martin und Lynen, 1950). An drei Stellen des Schemas treten dabei α-Ketosäuren auf, die in Aminosäuren übergehen können und dann Eiweißbausteine liefern. Daß die erwähnten Säuren auch bei der Photosynthese der Kohlehydrate von großer Bedeutung sind, sei hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da sich die vorliegende Arbeit nicht mit photosynthetisch arbeitenden Organismen befaßt.



Figur 1
Trikarbonsäurezyklus nach Krebs, in vereinfachter Darstellung

Besonders bemerkenswert ist die Vereinigung eines Moleküls Brenztraubensäure mit einem Molekül Kohlendioxyd zu Oxalessigsäure, die sogenannte *Wood-Werkman-Kondensation* (Wood und Werkman, 1936, 1938, 1940 *a, b*). Sie bietet dem Organismus nicht nur die Möglichkeit, die Atmung durch Neubildung von «Vehikelsubstanz» zu steigern, sondern auch die durch Bildung von Aminosäuren entstehenden Verluste wettzumachen. Ein gleicher Verlust ist natürlich die Abgabe von Säuren nach außen; es liegt deshalb nahe, die Bildung der als Endprodukt des Stoffwechsels auftretenden Fumarsäure über die Wood-Werkman-Kondensation anzunehmen. Tatsächlich haben auch bald nach der Entdeckung dieser biologischen Kohlensäurebindung durch Wood und Werkman Foster et al. (1941, 1948) die Fumarsäurebildung durch *Rhizopus* sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen daraufhin untersucht und unter anderem auch durch die

Verwendung markierten Kohlenstoffs die Bildung von Fumarsäure über die Wood-Werkman-Reaktion nachgewiesen [1].

Vor der Entdeckung der Wood-Werkman-Kondensation an Propionsäurebakterien schien die Bildung der C_4-Dikarbonsäuren durch die *Thunberg-Wieland-Kondensation* (Thunberg, 1920; Wieland, 1922) am wahrscheinlichsten: nach ihr liefern zwei Moleküle Essigsäure durch Vereinigung die Bernsteinsäure als ersten Körper mit vier Kohlenstoffatomen. Butkewitsch (1927) und Butkewitsch und Fedoroff (1929 *a, b,* 1930 *a, b*) deuteten in ihren Untersuchungen über die Säurebildung durch *Rhizopus* die Fumarsäure als Ergebnis der Thunberg-Wieland-Kondensation, was um so näher lag, als die Mucoraceen ja allgemein Äthylalkohol und Essigsäure zu bilden vermögen und die beiden russischen Forscher diese zwei Stoffe durch *Rhizopus* aufnehmen zu lassen und aus diesen Kulturen Fumarsäure zu gewinnen vermochten. Obwohl diese Auffassung also gut gestützt war, kam sie mit dem Nachweis der Fumarsäurebildung über die Wood-Werkman-Kondensation ins Wanken: es mußte als nicht sehr wahrscheinlich gelten, daß die Fumarsäure, die außer in der Gattung *Rhizopus* nur noch bei wenigen andern Mucoraceen als Endprodukt des Stoffwechsels auftritt, innerhalb eines Organismus gleich auf zwei verschiedene Weisen gebildet wird. Es gelang jedoch Slade und Werkman (1943) mit *Aerobacter Indologenes* und Foster, Carson et al. (1949, 1950) in *Rhizopus*-Myzel den Übergang von zwei Molekülen Essigsäure in Bernsteinsäure und umgekehrt mit radioaktivem Kohlenstoff aufs neue nachzuweisen. Damit ist erwiesen, daß die *Rhizopus*-Arten tatsächlich die Brenztraubensäure entweder dekarboxylieren und über Alkohol und Essigsäure in Fumarsäure überführen oder durch Anlagerung von Kohlendioxyd auf kürzerem Weg dasselbe Endprodukt erreichen können — wobei allerdings auf dem ersten Weg aus einem Hexosemolekül nur ein, auf dem zweiten aber zwei Moleküle Fumarsäure entstehen.

Die Hypothese der Zuckerspaltung in je einen Körper mit vier und einen mit zwei Kohlenstoffatomen wurde von Virtanen (1923, 1925; Virtanen und Karström, 1931) für die Bernsteinsäurebildung von Propionsäurebakterien aufgestellt und von Barinowa (1941) auf die Fumarsäuregärung von *Rhizopus* angewandt. Sie besitzt seit der Entdeckung der Wood-Werkman-Kondensation nicht mehr viel Wahrscheinlichkeit; schon Wood und Werkman (1936 *a, b,* 1938) machten darauf aufmerksam, daß C_2- und C_4-Körper auch dadurch in

[1] Mit einem aus Taubenleber gewonnenen Enzympräparat fanden Ochoa (1946) und Ochoa et al. (1947) den Übergang von Brenztraubensäure und Kohlendioxyd in Apfelsäure ohne Oxalessigsäure als Zwischenprodukt. Diese Variante ist im folgenden nirgends mehr erwähnt, da sich aus ihr für die vorliegende Arbeit keine Konsequenzen ergeben, selbst wenn die Apfelsäure im *Rhizopus*-Myzel auf diese direktere Art gebildet werden sollte.

äquimolaren Mengen entstehen können, daß nach der Bildung zweier Moleküle Brenztraubensäure von dem einen ein Molekül Kohlendioxyd abgespalten und sofort dem andern angelagert werden kann.

Während also die *Biochemie* der Fumarsäuregärung durch *Rhizopus*-Arten schon vielfach bearbeitet und auch in einigen Teilen geklärt ist, ist das für die *Physiologie* nicht der Fall. Arbeiten, die nicht das Schicksal des Kohlehydrats verfolgen, sondern die Fumarsäurebildung als eine von innern und äußern Faktoren beeinflußte *Lebensäußerung des Pilzes* betrachten, sind gering an Zahl: Waksman und Foster (1938) und Foster und Waksman (1939 *a, b, c*) behandeln vor allem den Einfluß von Spurenelementen auf Myzelbildung und Fumarsäureertrag und das Verhalten unter anaeroben Bedingungen sowie Verschiedenheiten im Verhalten verschiedener Stämme, insbesondere auch geschlechtlich verschiedener. Diese Untersuchungen wurden mit Deckenkulturen vorgenommen; die Publikationen über Versuche mit Schüttelkulturen sind meist ausgesprochen biochemisch orientiert. Natürlich enthalten auch sie, wenn auch nur am Rande, physiologische Beobachtungen, die in der vorliegenden Untersuchung an den entsprechenden Stellen erwähnt werden. Für die allgemeine Orientierung sei hier nur auf Bernhauer und Knobloch (1941), Foster (1949) und Wikén (1950) mit ihren Literaturverzeichnissen verwiesen.

Durchführung der Stoffwechselversuche

Von den Widersprüchen in der Literatur sind ein Teil sicher auf verschiedene Reaktionsweisen der verwendeten *Rhizopus*-Stämme zurückzuführen, andere aber auch auf übersehene Änderungen in den Lebensbedingungen des Pilzes. So wurden von Bernhauer und Thole (1936) sehr schwankende Fumarsäureerträge festgestellt, «ohne daß ein ausreichender Grund ersichtlich wäre». Diese Erfahrungen, die ich zu Beginn der Versuche ebenfalls machen mußte, rechtfertigen, ja verlangen sogar eine etwas breitere Darstellung der Methode, um so mehr, als der Pilz dann doch zu einem sehr schön reproduzierbaren Verhalten gelangte.

Bei den später im einzelnen behandelten Stoffwechselversuchen handelt es sich, wenn nichts anderes bemerkt ist, stets um *Schüttelkulturen,* die in 500 cm^3 fassenden Erlenmeyerkolben englischen Fabrikats aus Pyrexglas angesetzt wurden (über Schüttelkulturen vgl. Kluyver und Perquin, 1933). Die Kolben wurden vor der ersten Benützung und auch später immer wieder mit verdünnter Salzsäure (3 %) gefüllt und im Dampftopf zirka 1/2 Stunde auf 98° C gehalten (vgl. Bernhauer, 1939, S. 30). Jeder Kolben war jeweilen mit 200 cm^3 Nährlösung beschickt. Zur Probenahme diente ein Glasrohr,

das unten nur wenig, oben zirka 8 cm aus dem Wattezapfen herausragte und seinerseits mit einem übergestülpten kleinen Reagenzrohr verschlossen war [1]. Diese Einrichtung verringert die Infektionsgefahr beim Entnehmen der Proben, da der Querschnitt des Glasrohrs nicht einmal ein Zwanzigstel jenes des Kolbenhalses beträgt, und ist außerdem sehr bequem zu manipulieren. Das abgenommene Reagenzrohr wird während der Probenahme auf eine abgeflammte Briefnadel gesteckt.

Ein flacher, in ein Wasserbad hängender Metallkorb nahm die Kolben auf und wurde von einem mit konstanter Tourenzahl laufenden Motor 87mal in der Minute hin und her bewegt. Die Amplitude betrug 5 cm. Vorversuche hatten gezeigt, daß eine Schüttelfrequenz dieser Größenordnung günstig ist; bei hundert und mehr Vollschwingungen pro Minute vermag der Pilz nicht mehr zu wachsen. Das Wasserbad wurde durch eine elektrische Heizung, die von einem Kontaktthermometer über ein Relais gesteuert war, auf 30° C gehalten [2].

Versuch 19 zeigt, daß die *Placierung der Kolben* im Schüttelkorb die Versuche signifikant beeinflußt; neun Parallelkolben blieben den ganzen Versuch hindurch auf den gleichen Plätzen in folgender Anordnung:

a b a
b b b
a b a

Die Fumarsäurekonzentrationen und Myzeltrockengewichte ergaben

a:	0,98	0,97	0,96	1,01		% Fumarsäure
	780	733	764	742		mg Trockenmasse
b:	1,11	1,07	1,06	1,08	1,12	% Fumarsäure
	822	780	762	725	775	mg Trockenmasse

Die statistische Auswertung ergibt für die Fumarsäure

a: $M \pm m = 0{,}98 \pm 0{,}0108$ % $\sigma = \pm 0{,}0216$

b: $M \pm m = 1{,}09 \pm 0{,}0105$ % $\sigma = \pm 0{,}0235$

und für die Trockenmasse

a: $M \pm m = 755 \pm 10{,}6$ mg $\sigma = \pm 21{,}2$

b: $M \pm m = 763 \pm 16{,}5$ mg $\sigma = \pm 37{,}0$

M = arithmetisches Mittel
d = Abweichung jedes Einzelwertes vom arithmetischen Mittel

[1] Vgl. Fig. 2 b, Seite 173. Die Kolben in Fig. 2 a wurden nur in Vorversuchen verwendet; die Bruchgefahr ist bei ihnen auf Grund ihrer Form und Glassorte (Jenaer) ziemlich hoch.

[2] Hawker (1950) gibt nach Edson und Shapolov die Kardinalpunkte der Temperatur in bezug auf das Wachstum für elf *Rhizopus*-Arten an, unter denen sich *Rh. japonicus* leider nicht befindet. Für eine erste Gruppe liegen die Temperaturoptima des Wachstums zwischen 25° C und 27,5° C, für eine zweite zwischen 32° C und 35° C und für *Rh. chinensis* bei 40° C.

n = Anzahl der Einzelwerte

$$m = \text{mittlerer Fehler} = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}}$$

$$\sigma = \text{Streuung} = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$

Es zeigt sich, daß die Unterschiede in den Fumarsäurewerten signifikant sind, die der Trockengewichte aber nicht. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden in allen spätern Versuchen die Kolben turnusmäßig gegeneinander ausgetauscht, in den zweiten zwölf Stunden des Versuchs (d. h. während des intensiven Myzelwachstums) alle zwei bis drei Stunden, später mindestens bei jeder Probenahme, wodurch der Placierungseffekt ausgeschaltet werden konnte. Worauf er zurückzuführen ist, konnte nicht festgestellt werden. Messungen ergaben Temperaturgleichheit in allen Kolben, und ein Unterschied in der Schüttelwirkung ist auch nicht wahrscheinlich, da jeweilen die drei quer zur Schüttelrichtung nebeneinander stehenden Kolben vom gleichen Gummiriemen festgehalten wurden; von der Art der Befestigung herrührende Ungleichheiten sollten somit ganze Längs- oder Querreihen beeinflussen, nicht aber die Eckplätze gegenüber den andern.

Zum Ansetzen der *Nährlösungen* wurde in den frühen Versuchen destilliertes Wasser verwendet, später solches, das nach dem Ionenaustauschverfahren gereinigt worden war. Die Verwendung des Leitungswassers konnte schon deshalb nicht in Frage kommen, weil dieses je nach dem örtlich und zeitlich schwankenden Verbrauch in der Stadt aus verschiedenen Werken dem Institut zufließt und damit in seiner Qualität (Härte) unberechenbaren Veränderungen unterliegt. Die Nährlösungen enthielten stets 0,09 % KH_2PO_4 und 0,08 % ($MgSO_4 + 7\,H_2O$). *Stickstoff* wurde in allen Fällen als Ammonsulfat geboten, da die *Rhizopus*-Arten nach den übereinstimmenden Angaben der Literatur Nitrat nicht zu verwerten vermögen und organische Stickstoffverbindungen die für Stoffwechselversuche unangenehme Eigenschaft haben, gleichzeitig noch Kohlenstoffquellen zu sein. Die Konzentrationen wurden nach Bedarf gewählt und sind bei den einzelnen Versuchen angegeben. Das gleiche gilt für die *Kohlenstoffquelle;* wo nichts anderes angegeben ist, handelt es sich um Glukose. Obwohl als Nährsalze nur die gewöhnlichen Purum-Qualitäten verwendet wurden, zeigte sich in den Vorversuchen (Schüttelkulturen mit 12 % Glukose und 0,3 % Ammonsulfat) doch ein etwas schnelleres Wachstum des Pilzes, wenn eine Lösung nachgewiesener und vermuteter *Spurenelemente* zugesetzt wurde. Diese Spurenlösung wurde im Verhältnis 1 : 1000 beigefügt und war der Hoaglandschen A-Z-Lösung nachgebildet; von dieser unterschied sie sich durch das Fehlen von Zinn (dessen Anwesenheit im destillierten Wasser in genügender Menge erwartet werden konnte)

und Titan sowie durch die Zugabe von Eisen (in Form von 0,15 % $FeCl_3$), das in Hoaglands Lösung fehlt, da es bereits unter den klassischen zehn Elementen von Sachs enthalten ist. Beim Übergang vom destillierten zu dem im Ionenaustausch entsalzten Wasser wurde die Lösung durch Zinn ergänzt.

Außer in speziellen Fällen (Prüfung der Abhängigkeit der Fumarsäurebildung von der Azidität der Lösung) wurde jeder Kolben zum *Abstumpfen der entstehenden Säure mit Marmor* in knapp erbsengroßen Stücken beschickt; die Menge wechselte mit den andern Versuchsbedingungen und war immer so groß, daß bei Versuchsabbruch noch ein beträchtlicher Überschuß ungelösten Marmors vorhanden war. *Sterilisiert* wurde während 30 Minuten mit 1 Atm. Überdruck. Um das Caramelisieren der Glukose zu verhindern, setzte ich die Nährlösung in zwei Teilen an: der erste umfaßte die mineralischen Bestandteile und wurde mit dem Marmor vor dem Sterilisieren in die Kulturkolben abgefüllt, die Glukoselösung dagegen mit Salzsäure (37 %) im Verhältnis 500 : 1 versetzt, en bloc sterilisiert, die Sporensuspension beigefügt und unter Einhaltung steriler Bedingungen in die einzelnen Kolben verteilt. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen und wenn keine für das Verhalten der Glukose maßgebenden Faktoren verschieden waren, ging ich oft auch so vor, daß ich die fertige Nährlösung sterilisierte und den in abgewogenen Portionen sterilisierten Marmor nachträglich zufügte. Die Lösungen erreichten in kürzester Zeit *p*H~4; dann sank die Azidität nur noch langsam weiter. *Das Gleichgewicht zwischen Fumarsäureproduktion und Auflösung des Marmors* liegt um *p*H 4,3, also gerade beim Optimum für die Fumarsäurebildung (vgl. Abschnitt «Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration»). Bei konstanter Fumarsäurekonzentration sank die Wasserstoffionenkonzentration wieder langsam (d. h. im Verlauf mehrerer Tage); die *p*H-Werte stiegen gegen 5. In der Regel erfolgte der Abbruch der Versuche, sobald eine konstante Fumarsäurekonzentration erreicht war.

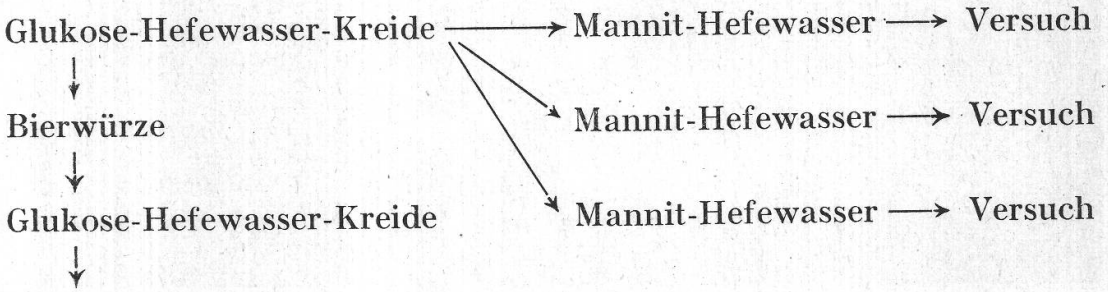
Fortzüchtung der Reinkulturen und Sporengewinnung

Die mir Ende 1948 übergebene Reinkultur von *Rhizopus japonicus* war auf Bierwürzeagar geimpft, ebenso wie die später erhaltenen Stämme verschiedener *Rhizopus*-Arten. Da sich bald zeigte, das *Rhizopus japonicus* auf diesem Substrat nur langsam wächst und wenig Sporen bildet, ging ich dazu über, die Stammkulturen abwechselnd auf *Bierwürze* und auf *Glukose-Hefewasser-Kreide* weiterzuziehen. Dieser Nährboden enthält in einem Kochextrakt aus 20 % Hefe in Leitungswasser 5 % Glukose, 1 % Kreide und 2 % Agar. Der Pilz wächst darauf rasch und üppig unter reichlicher Sporenbildung. Das Abwechseln mit Bierwürze (süße Würze, auf ein Drittel verdünnt und mit 1,5 % Agar

versetzt) erfolgt, um den Organismus nicht zu verwöhnen und degenerieren zu lassen. *Rhizopus japonicus* wächst auf Bierwürze nicht etwa nur darum schlecht, weil dort die gebildete Säure nicht durch Kreide abgestumpft wird; Kreidezusatz verbessert das Substrat nicht. Auf dem unten erwähnten, ebenfalls kreidelosen Mannit-Hefewasser-Agar wächst der Pilz ausgezeichnet, obwohl aus Mannit sehr viel Säure gebildet wird (vgl. den Abschnitt über die verschiedenen Kohlenstoffquellen).

Zur *Sporengewinnung* für die Stoffwechselversuche wurden, ausgehend von Glukose-Hefewasser-Kreide, auf *Mannit-Hefewasser-Agar* Kulturen angelegt. Dieses Substrat ist ein Kochextrakt aus 10 % Hefe in Leitungswasser, mit 5 % Mannit und 2,5 % Agar versetzt. *Rh. japonicus* zeigt auf diesem Nährboden ein sehr rasches Wachstum — bei 30° C sind nach drei Tagen bereits reife Sporen vorhanden — und bildet in lockerem Myzel relativ viel Sporen, wenn er auch in dieser Hinsicht stets weit von einer reichlich sporenbildenden Kultur von *Aspergillus niger* entfernt bleibt. Alle festen Nährböden wurden im Autoklaven mit 1 Atm. Überdruck während einer halben Stunde sterilisiert.

Die Impfungen erfolgten also nach folgendem Schema:

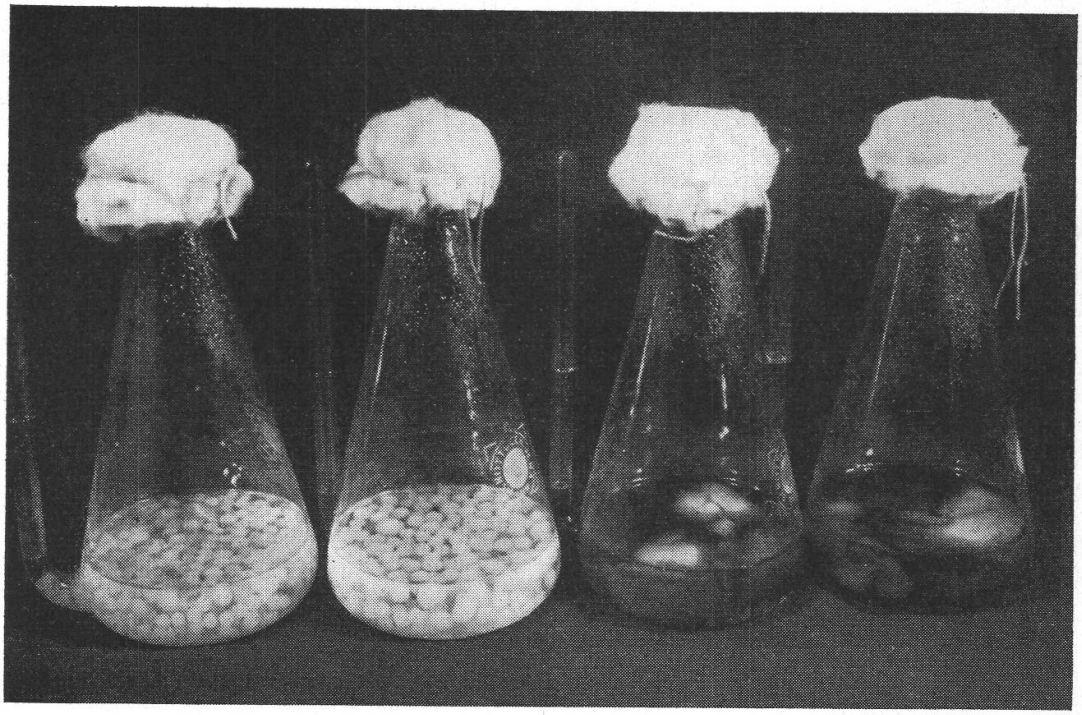


Impfung der Stoffwechselversuche

Es ist nicht möglich, *Rhizopus* mit der Öse in reichlichem Maße zu impfen, da die Sporangien viel zu weit auseinander und im Myzel eingebettet liegen; es kamen deshalb immer *Suspensionen* zur Verwendung, die mit Leitungswasser oder restlicher Nährlösung angesetzt wurden. War bereits sterilisierte Nährlösung in die Kulturkolben abzufüllen, so wurde sie vorher mit dem aufgeschwemmten Sporeninhalt zweier Kulturröhrchen versetzt; in den andern Fällen erhielt jeder Kolben 0,5 bis 1 cm^3 der aus zwei Röhrchen vereinigten Suspension. Dem entsprach eine *Impfung mit 5—10 Millionen Sporen.* Wurden weniger als 2 Millionen Sporen geimpft, dann war die Fumarsäurebildung verlangsamt; bei weniger als einer Million Sporen blieb auch der Ertrag zurück. Das Alter der Kulturen lag bei der Impfung zwischen zehn und dreißig Tagen; doch war auch bei Verwendung noch älterer Kulturen (vierzig Tage) keine Beeinflussung der Versuche zu erkennen.

Wachstum und Aspekt des Myzels

Zwölf Stunden nach Beginn der Versuchs wurde das Myzel bereits als Trübung der vorher klaren Lösung bemerkbar, und nach vierzehn Stunden hatte es meist schon eine ringförmige Wolke gebildet. Während der zweiten zwölf Stunden des Versuchs war es nötig, das sich immer wieder in der Spritzzone an der Glaswand des Kolbens ansetzende Myzel durch kreisendes Schütteln herunterzuwaschen, da sich

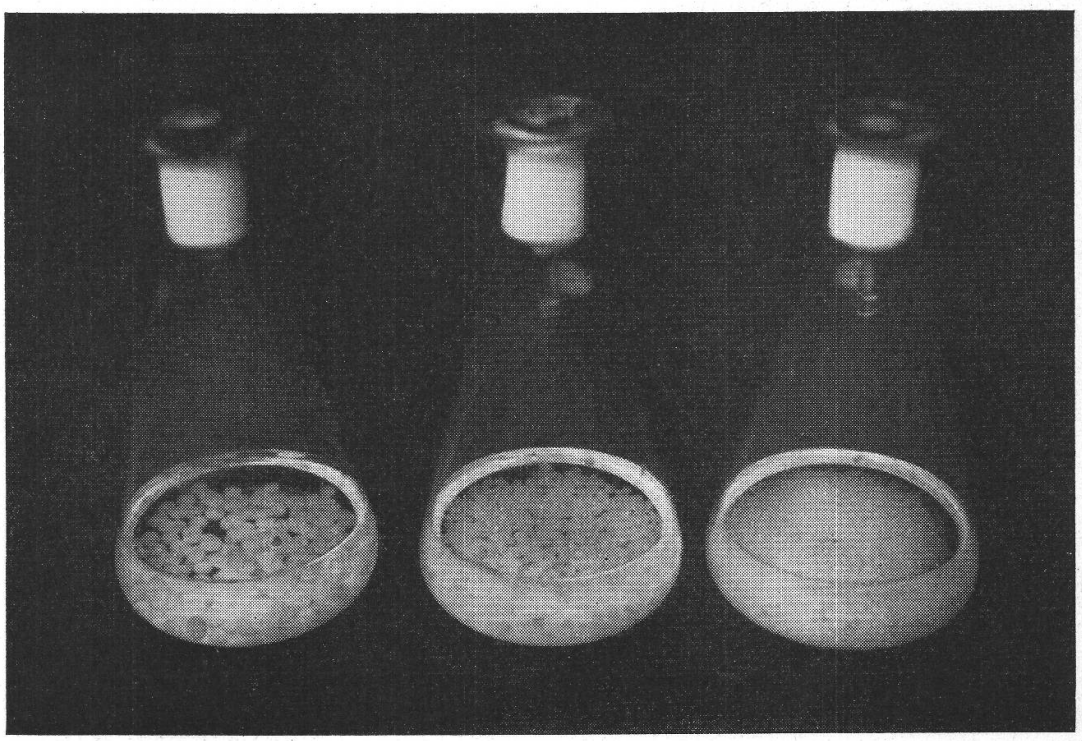


Figur 2 a

Verschiedene Aspekte der Myzelien. Versuch 15. Die Kolben waren zum Sterilisieren mit dem Marmor und dem mineralischen Teil der Nährlösung beschickt. Die mit Salzsäure auf *p*H 2 gesetzte Glukoselösung wurde für die Kolben links separat sterilisiert und erst vor dem Impfen zugegeben; in den Kolben rechts wurde die Glukose schon vor dem Sterilisieren beigefügt. Nach dem Sterilisieren zeigte die Lösung *p*H 7,5 und war dunkel kirschrot geworden
12 % Glukose, 0,3 % Ammonsulfat, 30° C

sonst ein fester Ring bildete. Nach vierundzwanzig Stunden änderte sich der Aspekt des Myzels kaum mehr (wenn nicht verhältnismäßig viel Ammonsulfat geboten wurde); es präsentierte sich dann als eine faserig zerrissene Wolke. In den Vorversuchen, als der Pilz noch nicht durch eine längere Reihe geregelter Überimpfungen zu gleichmäßig reproduzierbarem Verhalten gelangt war, zerfloß manchmal das Myzel zu einem Faserbrei oder ballte sich umgekehrt zu glatten Massen zusammen (vgl. Fig. 2 *a*). Ausnahmsweise trat auch Kornmyzel auf; dies war später eine regelmäßige Folge, wenn der Pilz statt mit Marmor

in einer 0,2molaren Pufferlösung gezogen wurde. Die Korngröße schwankt dabei beträchtlich (1—7 mm Korndurchmesser, Fig. 2 *b*) und war bei optimaler Azidität am geringsten — bei dieser zeigten sich sogar Übergänge zum Bild der faserigen Wolke. Doch hatten auch der Kalziumgehalt und die Placierung der Kolben einen, wenn auch geringeren, Einfluß auf die Korngröße — ein weiterer Grund zum häufigen Platzwechsel (vgl. Durchführung der Stoffwechselversuche).



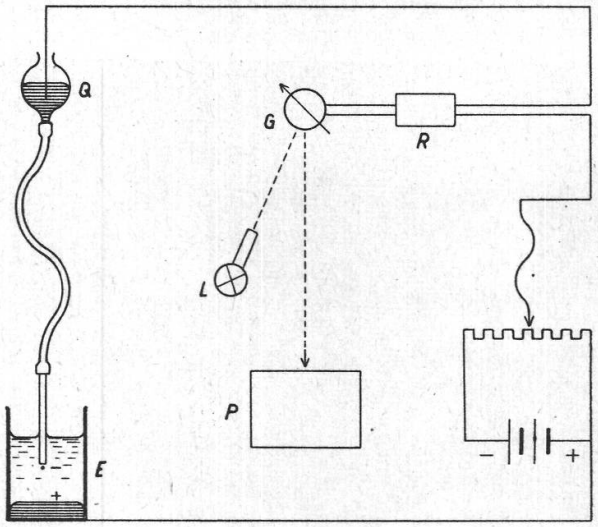
Figur 2 b
Verschiedene Aspekte der Myzelien. Versuch 56. Die Nährlösung enthielt 1/5molaren Natriumzitratpuffer. *p*H 5,8—5,3—4,7

Aufarbeitung der Versuche

Polarographische Fumarsäurebestimmung

Die Fumarsäurebestimmung erfolgte laufend während jedes Versuchs, was durch die Anwendung der *polarographischen Methode* möglich war. Verwendet wurde ein Modell des Heyrovski-Shikata-Polarographen der Fa. Československá Zbrojovka, Brno, dessen Prinzipschema Fig. 3 zeigt: ein Akkumulator speist ein Potentiometer, von dem aus eine veränderliche Spannung an eine elektrolytische Zelle (Fig. 4) gelegt ist. Die Kathode besteht aus einer tropfenden Quecksilberkapillare, die Anode aus einem Quecksilberspiegel, dessen Fläche im Verhältnis zu der des kathodischen Tropfens groß sein muß. Die Stromstärke wird mit einem Spiegelgalvanometer gemessen und durch einen Lichtstrahl die Stromspannungskurve photographisch aufgezeichnet. Ihr Verlauf

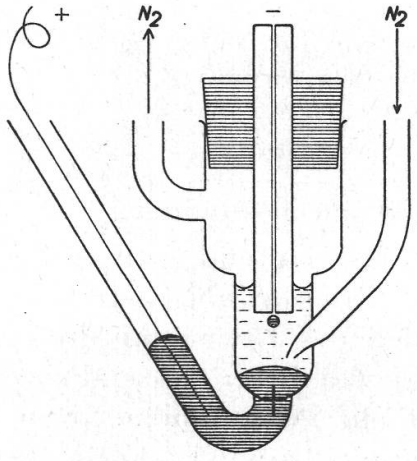
läßt Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Lösung in der Elektrolytzelle zu. Das Galvanometer ist über einen Reduktor eingeschaltet, das heißt über ein System von Widerständen, das erlaubt, die Galvanometerempfindlichkeit herabzusetzen, ohne die Dämpfungsbedingungen zu ändern. Ausführliche Darstellungen der Polarographie finden sich



Figur 3
Polarograph,
Schema nach Heyrovski
E = elektrolytische Zelle
L = Galvanometerlampe
Q = Quecksilbergefäß
G = Spiegelgalvanometer
P = photographische Trommel
R = Reduktor

bei Heyrovsky (1941, 1948), Brdicka (1941) und Kolthoff-Lingane (1941).

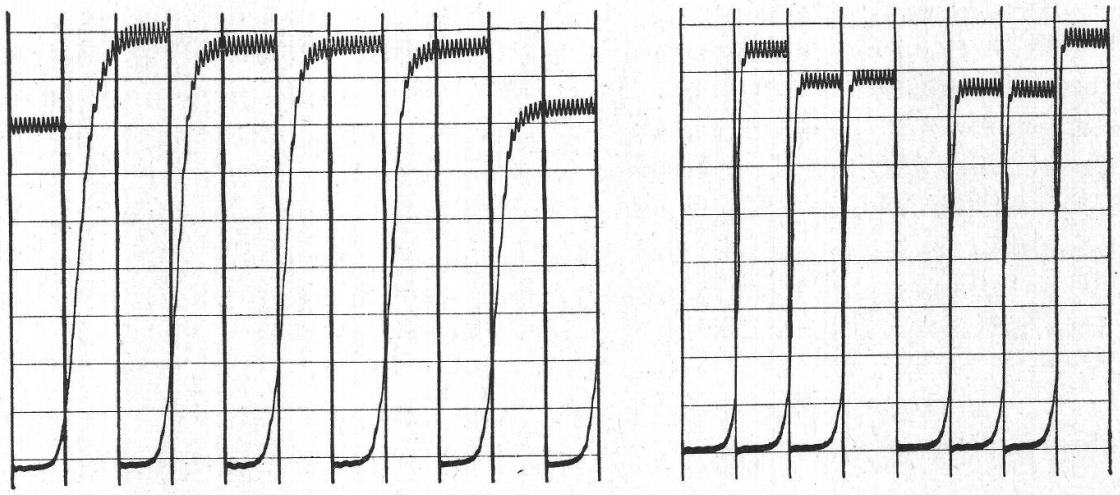
Für eine Fumarsäurebestimmung waren rund zehn Minuten erforderlich, wobei die Zeit für die sterile Entnahme der Probe inbegriffen ist. Es wurden jedesmal mit der in der Flamme sterilisierten Pipette



Figur 4
Elektrolytische Zelle, für polarographische Zwecke, zum Einhängen in ein Wasserbad

0,6—0,8 cm³ Lösung dem Kulturkolben entnommen und davon abgemessene 0,5 cm³ mit verdünnter Salzsäure (annähernd normal) auf $^1/_5$, $^1/_{10}$, $^1/_{20}$ oder $^1/_{40}$ verdünnt, so daß die Konzentration an Fumarsäure nicht mehr als 0,1 % und möglichst nicht weniger als 0,01 % betrug. Mit 0,5—1 cm³ dieser Lösung wurde die Elektrolytzelle gespült und

nachher mit einer gleichen Menge beschickt. Nach Durchleiten von Stickstoff (zur Entfernung des ebenfalls polarographisch reagierenden Sauerstoffs) und Annahme der Meßtemperatur (25° C ± 0,2° C) wurde die wachsende Spannung angelegt. Von einem bestimmten Kathodenpotential an wird die Fumarsäure reduziert und ermöglicht dadurch einen Stromanstieg um einen bestimmten, von der Zahl der zudiffundierenden Teilchen abhängigen Betrag. Der Stromanstieg drückt sich in der Stromspannungskurve als *polarographische Stufe* aus. Der reagierende Stoff wird von ihrem durch das Kathodenpotential definierten Ort qualitativ (allerdings nicht sehr spezifisch) und von ihrer Höhe (als



Figur 5

Polarographische Stufen der Fumarsäure. Steril entnommene Proben der Kulturlösungen wurden mit *n*-Salzsäure auf 1/10 verdünnt und polarographiert. Die einzelnen Stufen entsprechen Proben aus verschiedenen Kulturen. Links Ausschnitt aus einem Polarogramm mit vollständig gezeichneten Stufen; rechts sind die Stufen verkürzt (Ausschaltung des mittleren Teils, d. h. des Stromanstiegs) durch Überspringen einer Windung des Potentiometerdrahtes

Ausdruck der Zunahme der Stromstärke) quantitativ bestimmt (Fig. 5). Durch Abfallen und Neubildung des kathodischen Quecksilbertropfens schwankt die Stromstärke zwischen Null und dem Spitzenwert; das langsam schwingende Galvanometer zeigt aber nur ein relativ geringes Pendeln um den Mittelwert. Bei der Eichung wird natürlich mit Vorteil die Konzentration an Fumarsäure nicht auf die Stromstärke, sondern auf die Höhe der polarographischen Stufe bezogen.

Von den *polarographisch in der Nähe der Fumarsäure reagierenden Stoffen* (Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und andere α-Ketosäuren) ist keiner in derartigen Mengen zu erwarten, daß er die quantitative Fumarsäurebestimmung stören könnte; in vielen Versuchen wurde außerdem die Fumarsäure präparativ gewonnen durch Versetzen

der Kulturlösung mit Salzsäure und Auskristallisieren der charakteristischen, verhältnismäßig schwer löslichen Nadeln der freien Fumarsäure. Die in der Kulturlösung möglichen weitern Säuren (Bernstein-, Apfel-, Milch- und Essigsäure) reagieren polarographisch überhaupt nicht.

Trockenmasse und Verdunstungsverlust

Nach Versuchsabbruch wurden Lösung und Myzel vom verbliebenen Marmor getrennt, auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht und abgesaugt. Um nötigenfalls die Konzentrierung der Lösung durch Verdunstung unter Berücksichtigung der entnommenen Proben rechnerisch ausgleichen zu können, wurde die Menge der gewonnenen klaren Lösung bestimmt. Das Myzel wurde, um eventuell darin steckenden Marmorsand zu entfernen, so oft als nötig mit etwa doppelt normaler Salzsäure gewaschen und abgesaugt und zuletzt gründlich mit Leitungswasser nachgewaschen, scharf abgesaugt und ausgedrückt. Die meist nur sehr kleinen Myzelmengen waren jeweilen schon nach wenigen Stunden lufttrocken und wurden nach Versuchsabschluß zusammen bei 102—105° C fertig getrocknet. Größere und deshalb langsamer trocknende Myzelien wurden sofort in den Trockenofen gebracht und in der üblichen Weise getrocknet.

Bestimmung des Äthylalkohols

Ein Aliquot der ausgegorenen Lösung wurde mit Schwefelsäure auf kongoblaue Reaktion gebracht und $^2/_3$ davon abdestilliert, das Destillat auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, mit Natronhydroxyd gegen Lackmus alkalisch gemacht und wiederum $^2/_3$ davon abdestilliert. In diesem zweiten Destillat konnte, falls mindestens 0,5 % Alkohol vorhanden war, die Bestimmung mit genügender Genauigkeit refraktometrisch vorgenommen werden; Methylalkohol, Aldehyde und Ketone waren höchstens in Spuren nachzuweisen. War für die refraktometrische Bestimmung die Alkoholkonzentration zu gering, so wurde sie mit dem Zeißschen Interferometer und titrimetrisch (nach Nicloud) bestimmt [1].

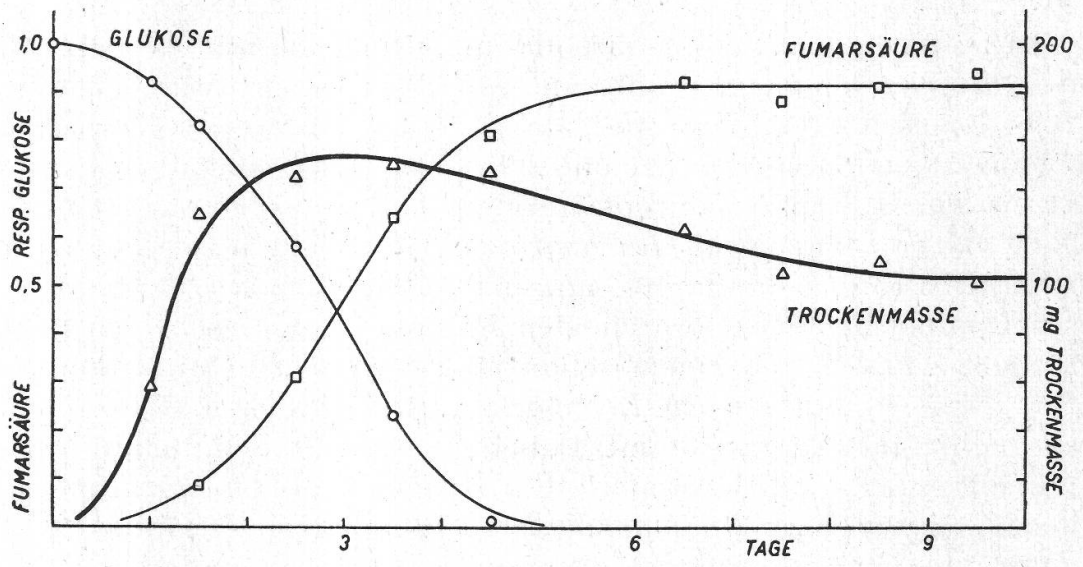
Bestimmung der zurückgebliebenen Glukose

Eine Probe der Kulturlösung wurde jeweilen der Fehlingreaktion unterworfen und bei positivem Ausfall die Glukose nach Bertrand bestimmt (Fehlingreaktion, Lösen des Kupferoxyduls in Ferrisulfat—Schwefelsäure, Titrieren der Ferro-Ionen mit Permanganat).

[1] Den Herren Dr. E. Iselin, Vorsteher des kantonalen chemischen Laboratoriums, und J. Studinger danke ich für die Einführung in die Methode der Alkoholbestimmung und die Durchführung der interferometrischen und titrimetrischen Messungen.

Zeitlicher Verlauf des Glukoseverbrauches, der Änderung der Trockenmasse und der Fumarsäurebildung

Figur 6 zeigt, daß die *Fumarsäurekonzentration einen konstanten Wert* erreicht, während die *Trockenmasse* wieder *zurückgeht:* der Pilz ist also nicht imstande, die Fumarsäure zur Deckung seines Energiebedarfes im Betriebsstoffwechsel heranzuziehen, während er sie im Baustoffwechsel als Kohlenstoffquelle auszunützen vermag (vgl. den Abschnitt über den Einfluß der Glukosekonzentration, S. 187). Die *Bildung* der Fumarsäure ist vor allem eine Angelegenheit des *Betriebsstoffwechsels:* das geht daraus hervor, daß die Säurebildung nach dem



Figur 6

Zeitlicher Ablauf der Kulturen. Versuch 60. 2 % Glukose, 0,02 % Ammonsulfat, 30° C

○———○ Glukosekonzentration: Bruchteile der Anfangskonzentration

□———□ Fumarsäurekonzentration: Prozentgehalt der Lösung

△———△ Trockenmasse

Aufhören des Wachstums, d. h. beim Maximum an Trockenmasse, am intensivsten ist. Während des starken Myzelwachstums wird viel weniger Säure gebildet. Das gleiche ergibt sich auch aus der Erhöhung des Fumarsäureertrages durch Drosselung des Myzelwachstums (vgl. S. 182) und die Bildung von Fumarsäure durch in reine Glukoselösung versetztes Myzel (vgl. die Bilanzversuche S. 193). Die Kurven zeigen auch den raschen Verlauf der Schüttelkulturen: nach drei Tagen ist das Maximum an Myzelmasse, nach fünf Tagen das Maximum der Fumarsäurekonzentration erreicht.

Es ist noch zu bemerken, daß die einzelnen Punkte der Figur 6 in ihrem Gewicht nicht gleichwertig sind. Zur Bestimmung der Trockenmasse mußte natürlich der Versuch in einzelnen Kolben abgebrochen werden: nach den ersten 24 Stunden waren es drei, nach $1^1/_2$, $2^1/_2$,

3½ und 4½ Tagen je zwei Kolben, die abgebrochen und aus deren Werten die zur Zeichnung der Kurve verwendeten Mittel berechnet wurden. Vom fünften Tag an wurde jeweilen nur noch ein Kolben abgebrochen. Das gleiche wie für das Trockengewicht gilt für die Glukosekonzentration, während bei der Fumarsäurekonzentration stets mehrere Werte zur Mittelung zur Verfügung standen, mit Ausnahme derer von 8½ und 9½ Tagen, als nur noch zwei bzw. ein Kolben vorhanden waren.

Die Fumarsäurebildung durch verschiedene Stämme der Gattung Rhizopus Ehrenberg

Die Versuche zur Fumarsäurebildung begann ich mit einem Stamm von *Rhizopus japonicus* Vuill., dessen Ursprungsort wahrscheinlich C. B. S. Baarn ist. Nachdem stud. phil. J. Meili von einer Keimschale mit einem Torf-Sand-Gemisch und ich selbst von keimendem Weizen noch je einen Stamm *Rhizopus* isoliert hatten (später wurde vom C. B. S. Baarn Stamm 1 als *Rh. nigricans* Ehrenberg und Stamm 2 als *Rh. arrhizus* Fischer bestimmt), unternahm ich einen ersten Vergleichsversuch mit dem bisher verwendeten *Rh. japonicus,* den beiden neuen *Rhizopus 1* und 2 und einem schon länger in der Institutssammlung befindlichen Stamm von *Rh. Delemar* (Boid.) Wehmer und Hanz., der ursprünglich aus Baarn stammt. Dabei (Versuch 20, Schüttelkultur mit 12 % Glukose und 0,3 % Ammonsulfat) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Rh. japonicus* und *Rh. Delemar* (1,17 und 1,23 % Fumarsäure im Mittel), wohl aber zwischen diesen und den beiden *Rh. nigricans*-Stämmen, von denen der eine nur 0,19, der andere gar nur 0,098 % Fumarsäure bildete.

Später erhielt ich aus Baarn zehn weitere *Rhizopus*-Stämme, nämlich *Rh. nigricans* Ehrenberg, *Rh. microsporus* van Tieghem und *Rh. circinans* van Tieghem in je zwei geschlechtlich verschiedenen Stämmen, von denen aber die beiden *Rh. nigricans* nicht mit + und —, sondern mit *a* und *b* bezeichnet waren, ferner *Rh. tritici* Saito, *Rh. tonkinensis* Vuill., *Rh. chinensis* Saito und *Rh. arrhizus* Fischer. Alle Stämme waren auf Bierwürze-Agar geimpft; trotz verschiedener Überimpfungen auf den bei *Rh. japonicus* bewährten Substraten und drei weitern (Brot, Weizenflocken, gequetschte Früchte der Sonnenblume, alle in Agar) waren *Rh. microsporus* + und —, *Rh. tonkinensis, Rh. chinensis* und *Rh. arrhizus* nicht zu intensiver Sporenproduktion zu bringen, so daß für die Stoffwechselversuche nur *Rh. circinans* + und —, *Rh. nigricans a* und *b* sowie *Rh. tritici* verwendet werden konnten. In einem ersten Vergleich zwischen den beiden Stämmen von *Rh. circinans* ergab sich, wie Tabelle 1 zeigt, daß, entgegen den Befunden von Bernhauer und Knobloch (1941, ebenfalls an *Rh. circinans*), beide Stämme sowohl

in Schüttel- als auch in Deckenkultur Fumarsäure zu bilden vermochten, wenn auch der Stamm + wesentlich höhere Ausbeute ergab. Foster und Waksman (1939 *a, c*) hatten zwar auch an einem Paar Stämmen von *Rh. nigricans* festgestellt, daß nur der +-Stamm Fumarsäure bildete, aber auch schon betont, daß dies kein durchgehendes Merkmal sei, was Bernhauer und Knobloch (1941) übersehen zu haben scheinen. In bezug auf die Trockenmasse zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

Tabelle 1
Vergleich der Stämme + und — von *Rh. circinans*
Versuch 28. 4,2 % Glukose, 0,1 % Ammonsulfat. T = 30° C

	% Fumarsäure		Zeitbedarf Tage
	+	—	
Schüttelkultur .	1,42	0,80	14
Deckenkultur ..	1,53	0,39	24

Bemerkenswert ist, daß *Rh. japonicus* unter entsprechenden Bedingungen (4,2 % Glukose, 0,1 % Ammonsulfat, Schüttelkultur) nur etwa 0,6 bis 0,7 % Fumarsäure liefert, diese aber schon in knapp 3½ Tagen (80 Stunden). Von den beiden Stämmen *Rh. nigricans* kam unter den gewählten Bedingungen nur Stamm *a* zum Wachsen, und auch das nur schwach und zögernd und nur in Schüttelkultur, nicht aber als Decke. Wie ich bei den Weiterimpfungen der Stammkulturen feststellen konnte, muß für diese beiden Stämme das Temperaturmaximum nahe bei 30° C liegen [1], so daß ich ihre Stammkulturen nicht im Brutschrank bei 30° C aufwachsen ließ wie die übrigen, sondern von der Impfung an bei Zimmertemperatur hielt. Möglicherweise half eine andere, ebenfalls ungünstig liegende Kulturbedingung neben der überoptimalen Temperatur mit, *Rh. nigricans* am Wachsen in den Kulturversuchen zu verhindern. *Rh. tritici* vergärte seine Lösung (mit 2 % Glukose und 0,04 % Ammonsulfat) zwar ebenso rasch wie *Rh. japonicus,* lieferte aber nur 0,101 % statt 0,50 % Fumarsäure und blieb in Deckenkultur sogar unter 0,01 % Fumarsäure. *Außer den in diesem Abschnitt angeführten wurden alle Untersuchungen mit Rh. japonicus durchgeführt.*

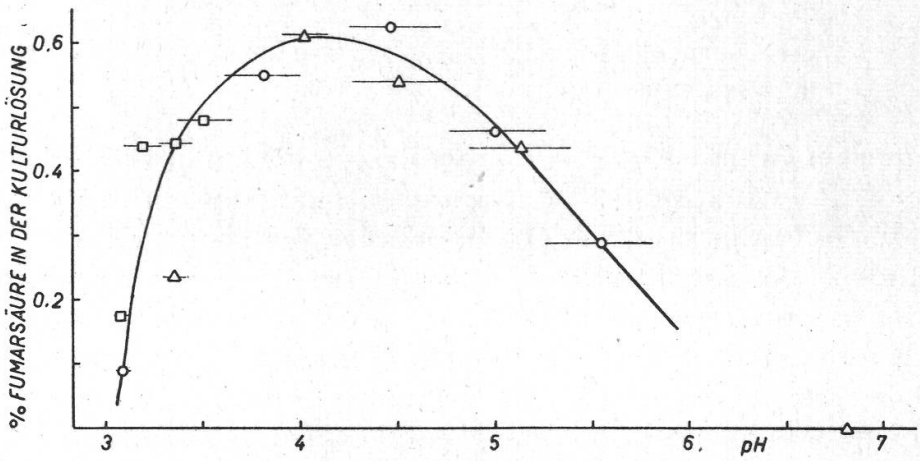
Den hier angeführten Vergleichen verschiedener *Rhizopus*-Arten kommt nur orientierender Wert für die Auswahl eines geeigneten Stammes für die weitern Untersuchungen zu. Um die Vergleiche an sich sinnvoll zu machen, müßte natürlich die Lage der Kardinalpunkte, besonders der Temperatur, aber auch anderer Faktoren, berücksichtigt werden, da sie für die einzelnen Arten verschieden liegen (für die Kardinalpunkte der Temperatur in bezug auf das Wachstum vgl. Hawker [1950,

[1] Später fand ich bei Hawker (1950) für *Rh. nigricans* als Maximum für das Wachstum 31° C angegeben.

S. 167]). Dieser Einwand gilt auch für die Arbeit von Rauch, Mielke-Miksch und Bernhauer (1950).

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Es ist nicht einfach, die Einwirkung wechselnder Wasserstoffionenkonzentrationen auf einen Organismus nachzuprüfen: *mit der aktuellen Azidität wechseln immer auch eine ganze Anzahl anderer Milieufaktoren,* mehr als das bei der Änderung anderer Bedingungen der Fall ist. Dazu kommt noch die Einwirkung der Puffersubstanzen als solcher, die sich zum Beispiel bei meinen Versuchen darin zeigte, daß der Pilz in einem $\frac{m}{10}$ Phosphatpuffer vom *p*H 7,42 noch langsam zu wachsen vermag, in



Figur 7

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration. 1,4 % Glukose, 0,02 % Ammonsulfat, $\frac{m}{5}$ sekundäres Natriumzitrat mit Zusätzen von Salzsäure resp. Natronlauge. —□— Versuch 41. —△— Versuch 43. —○— Versuch 56. Der waagrechte Strich bezeichnet den Bereich der Aziditätsänderung während des Versuches

$\frac{m}{5}$ vom *p*H 7,59 nicht und ebensowenig im $\frac{m}{5}$ Zitratpuffer vom *p*H 6,80, obwohl er in einem Phosphatpuffer gleicher Azidität und Konzentration sehr gut gedeiht. Während also das Maximum für das Wachstum im Phosphatpuffer zwischen *p*H 7,4 und 7,6 liegt, sinkt es im Zitratpuffer auf weniger als 6,8; im Zitrat vom *p*H 5,81 wächst der Pilz wieder sehr gut. Es wäre natürlich interessant, die Abhängigkeit der Fumarsäurebildung von der Azidität in den beiden Puffern zu vergleichen; leider gibt aber der $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer so stark nach (um 2 *p*H-Einheiten), daß dieses Unterfangen sinnlos wird. Die Pufferkonzentration kann natürlich nicht beliebig gesteigert werden, da sonst die osmotischen Werte störende Größen annehmen, und ebensowenig darf die Glukose-

gabe zur Verminderung der Fumarsäurebildung so gering genommen werden, daß der Baustoffwechsel einen zu großen Teil beansprucht (vgl. den Abschnitt «Einfluß der Glukosekonzentration»). Figur 7 zeigt deshalb lediglich die Versuche mit $\frac{m}{5}$ Zitrat und 1,5 % Glukose. Die waagrechten Linien geben die *p*H-Verschiebung während des Versuchs; die erreichte Fumarsäurekonzentration ist in der Mitte des durchlaufenen Intervalls aufgetragen.

Die *Optimumkurve der Fumarsäurebildung* deckt sich keineswegs mit der des Myzelwachstums: Die Trockenmasse wird durch die Stickstoffdosierung bestimmt und hängt wenigstens gegen den Neutralpunkt hin nicht von der Azidität ab, soweit diese dem Pilz überhaupt noch das Wachsen erlaubt; das Maximum an Wasserstoffionen für das Wachstum des Pilzes wurde nicht geprüft, doch liegt es jedenfalls über dem Maximum für die Fumarsäurebildung (*p*H unter 3).

Die Vermutung von Bernhauer und Knobloch (1941), die Beifügung von Marmor zur Nährlösung sei deshalb nötig, weil «die Fumarsäurebildung nur einen Abfangvorgang darstellt, bei dem die Fumarsäure in Form des schwerlöslichen Ca-Salzes aus der Lösung ausfällt und so dem weitern Angriff der Enzyme des Pilzes entzogen» werde, wird nicht nur durch die oben wiedergegebenen Kurven widerlegt, sondern auch durch die Beobachtung, daß freie Fumarsäure in reiner Lösung bei 18° C mit 0,4 % gesättigt ist und dann *p*H 2,3 zeigt; nach Erwärmen mit gefälltem Kalziumkarbonat gelangt sie aber bei der gleichen Temperatur zur Sättigungskonzentration 0,9 % bei *p*H 7,1.

Foster und Davis (1948) fanden mit ihrem Stamm von *Rh. nigricans* in anaeroben Schüttelkulturen als tiefstes *p*H, das noch Fumarsäurebildung erlaubt, 2,5; das Optimum lag zwischen 3,0 und 4,0; diese Azidität stellte sich durch die Beigabe von 0,01 bis 0,04 % Kalziumkarbonat ein. Schon bei *p*H 4,75 (d. h. bei 0,1 % Kalziumkarbonat) ging der Fumarsäureertrag auf die Hälfte zurück. Da die beiden amerikanischen Autoren gefälltes Karbonat verwendeten, ergab ein Überschuß davon «nearly neutral *p*H», das sich in aerober Kultur als optimal für die Fumarsäurebildung erwies. Erstaunlich und wohl ein Indiz für die große Bedeutung des Redox-Potentials für die beiden verschiedenen Arten der Fumarsäurebildung ist der große Unterschied in der Lage des Optimums bei aerober und anaerober Kultur.

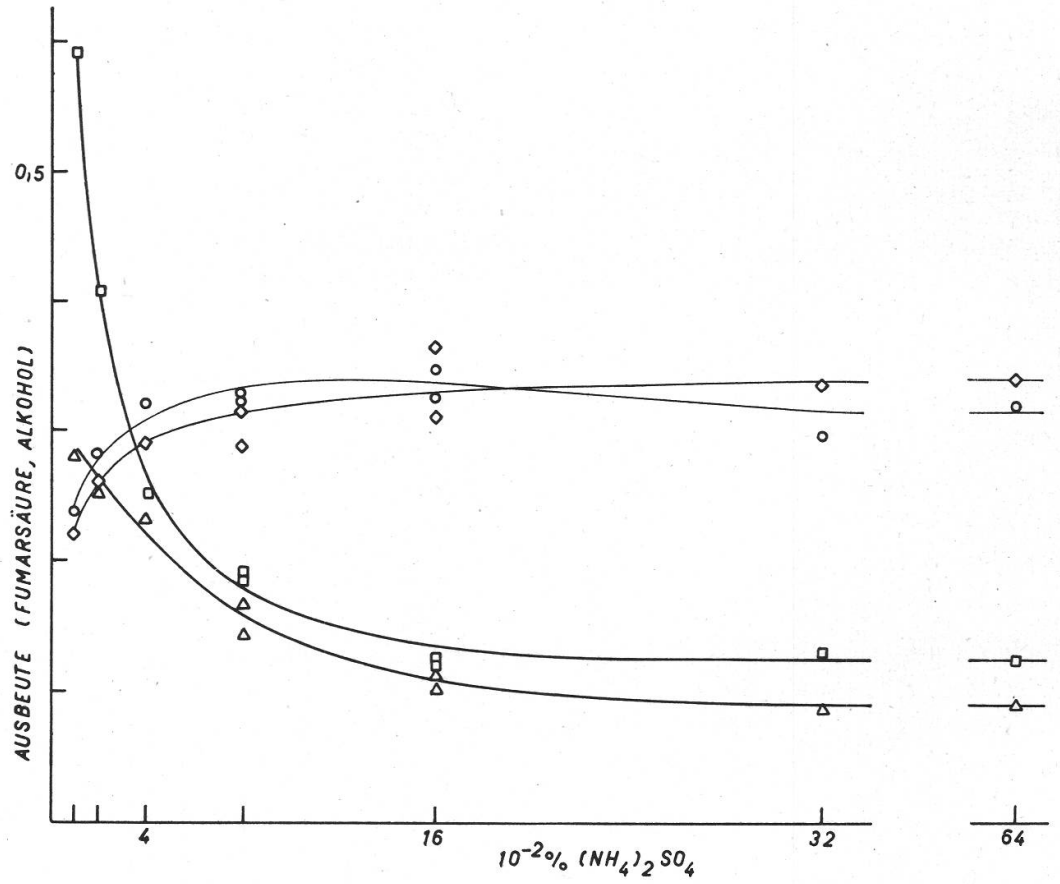
Es scheint, daß die Reaktion gegenüber verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bei den einzelnen Stämmen sehr verschieden ist; Foster und Waksman (1939 *a*) berichten von einem Stamm von *Rh. nigricans,* der in Abwesenheit von Kalziumkarbonat das *p*H der Kulturlösung auf 2,4 senkte und dabei weiter Fumarsäure produzierte, die dann als solche auskristallisierte.

Die Wirkung anorganischer Nährstoffe

Die Versuche mit verschiedenen anorganischen Stoffen führen zu Schlüssen, die sich gegenseitig stützen, weshalb sie unter einem gemeinsamen Titel zusammengefaßt und gemeinsam diskutiert werden sollen.

Einfluß der Stickstoffkonzentration

Wie schon erwähnt und begründet, wurde der Stickstoff in allen Versuchen als Ammonsulfat geboten. In allen Fällen lieferte Glukose



Figur 8

Einfluß der Konzentration an Ammonsulfat auf die Ausbeute an Fumarsäure und Alkohol. Als Ausbeute ist das Verhältnis des gebildeten Endprodukts zum Glukoseverbrauch (beide in Gramm) bezeichnet

Äthanol Fumarsäure

○——○ □——□ 2 % Glukose, Versuche 30 und 33

◇——◇ △——△ 18 % Glukose, Versuche 31 und 32

den Kohlenstoff; ihre Konzentrationen (2 %, 10 %, 18 %) wurden auf Grund der Versuche über den Einfluß der Glukosekonzentration gewählt. Da die Bildungsgleichungen der Fumarsäure nicht feststehen bzw. die Fumarsäure gleichzeitig auf zwei verschiedene Arten gebildet

werden kann, ist die Ausbeute einfach als Verhältnis der gebildeten Menge Fumarsäure zur verbrauchten Mengen Glukose angegeben.

Wie aus Figur 8 hervorgeht, nimmt die *Fumarsäureausbeute* mit steigender Stickstoffdosierung ab und wird bei mehr als 0,1 % Ammonsulfat nahezu konstant. Ebenso verhält sich die Geschwindigkeit der Umsetzung (vgl. Tabelle 2). Daß mit wenig Stickstoff die Ausbeute bei starker Glukosedosierung nicht mehr so hoch ist wie bei niedriger Glukosekonzentration, dürfte auf den hohen osmotischen Wert der Lösung zurückzuführen sein.

Tabelle 2
Fumarsäurebildung und Konzentration an Ammonsulfat
Versuche 30 und 33. 2 % Glukose, T = 30° C; Zeitbedarf in Stunden bis zum Aufhören der Fumarsäurebildung

Ammonsulfat %	> 0,08	0,08	0,04	0,02	0,01
Zeitbedarf, Stunden ...	< 40	40	64	104	180

Die *Alkoholbildung* verhält sich gerade umgekehrt wie die Fumarsäurebildung: mit steigender Stickstoffdosierung nimmt die Menge des gebildeten Alkohols zu (vgl. Figur 8).

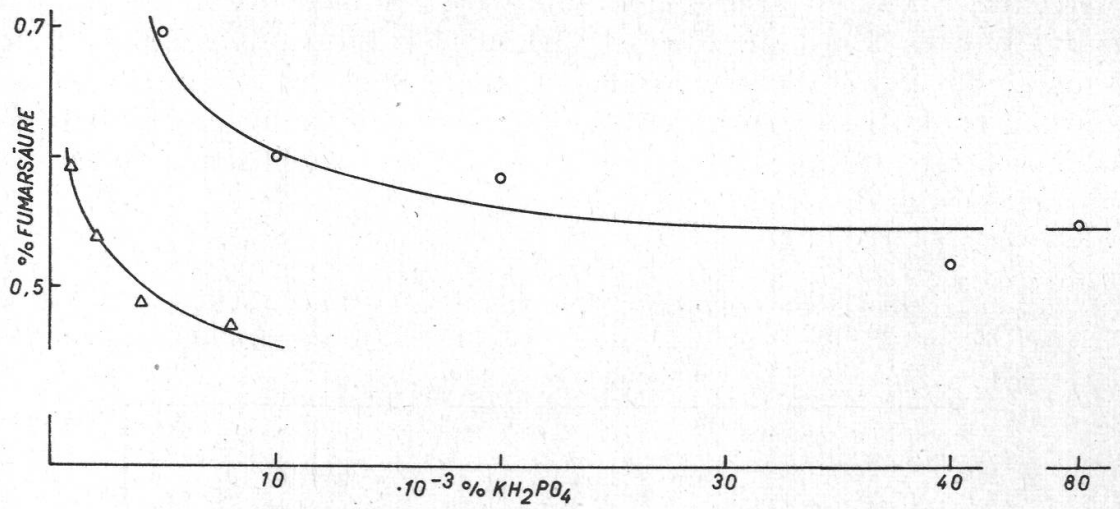
Einfluß der Phosphatkonzentration

Wie in allen andern Versuchen, so wurde auch hier der Phosphor als Kaliumdihydrogenphosphat geboten; die Änderung der Kalidosis wurde durch Verwendung einer äquimolaren Kalichloridlösung zum Verdünnen der Phosphatlösung vermieden. Bei der Ammonsulfatkonzentration von nur 0,02 % kann sich die Verringerung der Phosphatkonzentration natürlich erst bei sehr kleinen Dosen auswirken: bei mehr als 0,02 % KH_2PO_4 ist kein Einfluß zu erkennen, und selbst bei nur 0,001 % wird das Trockengewicht der Myzelien nicht verringert, wohl aber die Umsetzung der Glukose verlangsamt und der Ertrag an Fumarsäure erhöht (Tabelle 3, Figur 9). Es scheint somit, daß die Phosphorylierung bei weniger als 0,004 % Kaliphosphat in der Nährlösung zum Engpaß wird, der das Tempo der Umsetzung bestimmt. Wie bei der Verringerung der Myzelmenge (durch verkleinertes Angebot

Tabelle 3
Fumarsäurebildung und Phosphatkonzentration
Versuch 58. 1,4 % Glukose, 0,02 % Ammonsulfat, T = 30° C; Zeitbedarf in Tagen bis zum Aufhören der Fumarsäurebildung

Primäres Kaliphosphat %	0,008	0,004	0,002	0,001
Zeitbedarf, Tage	6	6	9	12

an assimilierbarem Stickstoff), geht auch hier der Herabsetzung der Geschwindigkeit des Glukoseumsatzes eine Steigerung des Ertrages parallel, worauf in der Diskussion zurückzukommen sein wird.



Figur 9

Einfluß der Phosphatkonzentration auf die Fumarsäurebildung

1,4 % Glukose, 0,02 % Ammonsulfat, $\frac{m}{5}$ Natriumzitrat (sekundär), 30° C

○———○ Versuch 57 △———△ Versuch 58

Wirkung des Sauerstoffmangels

In einem Versuch wurde das Myzel 36 Stunden lang unter aeroben Bedingungen wachsen gelassen und dann die Wattezapfen auf den Kolben mit geschmolzenem Paraffin verschlossen; um der Kohlensäure einen Abzug offen zu lassen, wurde die Paraffindichtung mit einer Präpariernadel durchstochen. Von den verschlossenen Kolben war die Hälfte vorher mit einem Stickstoffstrom durchgespült worden; um Verdunstungsverluste am bereits gebildeten Alkohol zu vermeiden, war der schwache Gasstrom nicht durch die Kulturlösung selbst geführt worden. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, bewirkte aber die Spülung mit Stickstoff kaum Unterschiede.

Die Absperrung des Sauerstoffs zeigte nach 24 Stunden vorerst nur auf die Fumarsäurebildung eine schwache Wirkung; beim Versuchsabbruch nach 60 Stunden war das Trockengewicht der unter Luftabschluß stehenden Myzelien leicht, die Fumarsäurebildung bedeutend zurückgeblieben, während der Mehrertrag an Alkohol vielleicht überhaupt nicht signifikant ist. Das mag zu einem guten Teil daran liegen, daß die Alkoholbildung früher als die Fumarsäurebildung beginnt: zur Zeit des Kolbenverschlusses ist ein Drittel der Äthanolmenge gebildet, aber erst ein Fünfzigstel bis ein Zehntel der gesamten Fumarsäuremenge; die starke Streuung der Fumarsäurewerte rührt natürlich davon her, daß, absolut genommen, sehr kleine Unterschiede bei der erst minimen Menge stark ins Gewicht fallen.

Tabelle 4

Wirkung des Sauerstoffentzuges

Versuch 34. 4 % Glukose, 0,05 % Ammonsulfat; Temperatur 30° C

Versuchsgruppe A: Beim Versuchsbeginn abgebrochene Kolben.
B: Unverschlossene Kontrollkolben.
C: Verschlossene, nicht mit N_2 gespülte Kolben.
D: Nach Spülung mit Stickstoff verschlossene Kolben.

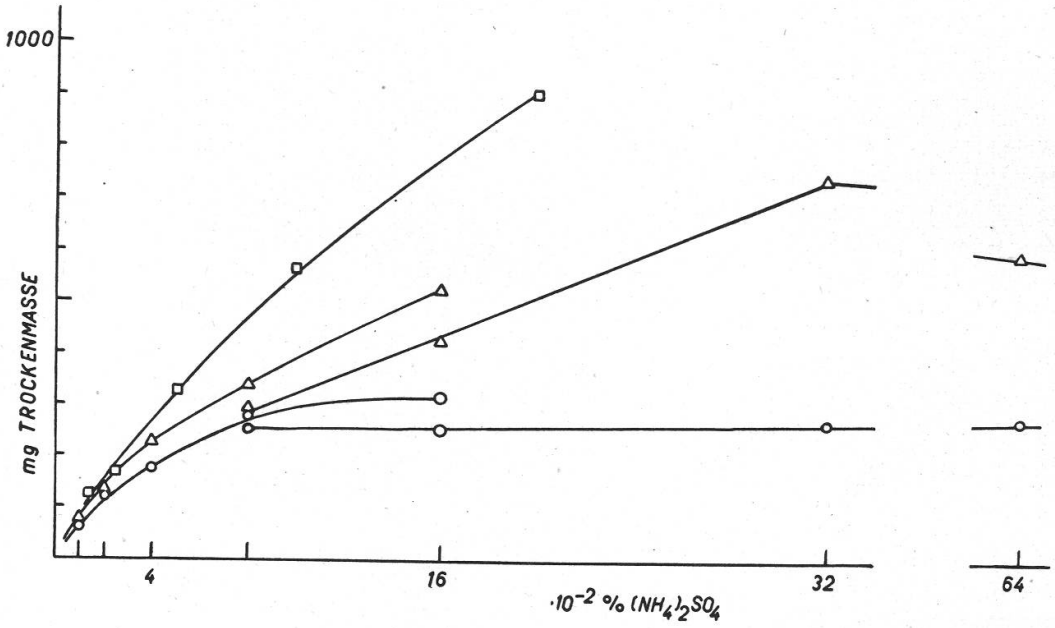
Die Werte für die Trockenmasse und den Alkoholgehalt entstammen je einem Kolben. Die Werte für die Fumarsäurekonzentration, die der gleichen Versuchsgruppe zugeordnet sind und in der gleichen Kolonne stehen, gehören zu identischen Kolben

	mg Trockenmasse			% Äthylalkohol			% Fumarsäure			
Zustand beim Versuchsbeginn (Alter der Kulturen 36 Stunden)										
A	145	160	165	0,33	0,56	0,50	0,046	0,108	0,119	
B							0,027	0,08	0,029	0,029
C							0,044	0,027	0,12	0,064
D							0,072	0,051	0,073	0,037
Zustand 24 Stunden später (Alter der Kulturen 60 Stunden)										
B	195	217		1,02	1,44		0,68	0,92	0,67	0,74
C	197	199		0,90	1,34		0,64	0,52	0,57	0,53
D	192	194		1,44	1,07		0,37	0,47	0,60	0,55
Zustand 60 Stunden später (Alter der Kulturen 96 Stunden)										
B	250	243		1,28	1,32				1,18	1,13
C	219	230		1,37	1,82				0,62	0,70
D	227	235		1,57	1,29				0,71	0,85

Diskussion dieser Versuche

Jede Verlangsamung der Fumarsäurebildung, erfolge sie nun durch Verminderung der Menge des aktiven Myzels (Versuche über den Einfluß der Ammonsulfatkonzentration) oder durch Verminderung der Phosphatkonzentration (bis diese offenbar zum Minimumfaktor für die Phosphorylierung wird), *führt zu einer Erhöhung der Ausbeute.* Das legt den Schluß nahe, daß die Bildung der Fumarsäure selbst die Bedingungen zu ihrer Entstehung verschlechtert. Da die Fumarsäuregärung über die Thunberg-Wieland-Kondensation pro Molekül verarbeiteter Glukose drei Moleküle Sauerstoff verlangt, kann bei intensivem Umsatz Sauerstoffmangel eintreten, um so mehr als die produzierte Kohlensäure das Entstehen eines Unterdrucks und damit einer Saugwirkung verhindert. Alkoholgärung und Fumarsäurebildung zusammen können sogar leicht dazu führen, daß mehr Moleküle Kohlendioxyd gebildet als Moleküle Sauerstoff verbraucht werden; die entstehende Massenbewegung des Kohlendioxyds aus dem Kulturkolben heraus muß das Eindiffundieren des Sauerstoffs natürlich noch bremsen. Bei schnellem Glukoseumsatz muß also der anaerobe Vorgang, die Alkoholgärung,

gegenüber dem aeroben, der Fumarsäurebildung, gefördert werden. Die Verminderung der Fumarsäurebildung nach Absperrung des Sauerstoffs stützt diese Auffassung; daß dabei keine signifikante Zunahme der Alkoholbildung eintritt, paßt wiederum zur Beobachtung, daß bei verminderter Fumarsäurebildung infolge schnellen Umsatzes nicht so viel Alkohol mehr entsteht, wie man erwarten möchte. Möglicherweise entsteht dann eine merkliche Menge Milchsäure, auf deren Vorhandensein die Lösungen aber nicht geprüft worden waren. Daß auch unter anaeroben Bedingungen Fumarsäure entsteht, zwingt zur Annahme der



Figur 10
Einfluß der Konzentration an Ammonsulfat auf die Bildung von Trockenmasse
○———○ 2 % Glukose, Versuche 30 und 33
□———□ 10 % Glukose, Versuch 25
△———△ 18 % Glukose, Versuche 31 und 32

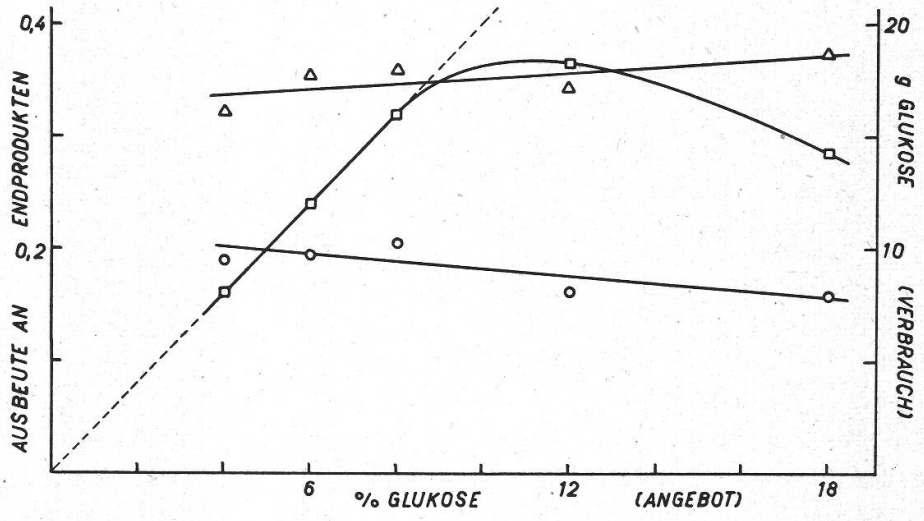
Fumarsäurebildung über die Wood-Werkman-Kondensation. Wie aber Foster und Davis (1949) gezeigt haben, wirkt die Erhöhung der Kohlendioxydkonzentration nicht, wie man nach dem Massenwirkungsgesetz erwarten sollte, fördernd auf die Bildung von C_4-Dikarbonsäuren, sondern hemmend durch Blockierung des verantwortlichen Enzyms: in reiner Kohlendioxydatmosphäre wurde überhaupt keine Fumarsäure mehr gebildet, trotz Glukoseaufnahme, und schon 1 % Kohlendioxyd wirkte gegenüber kohlendioxydfreier Atmosphäre hemmend auf die Glukoseaufnahme und die Fumarsäurebildung. Möglicherweise liegt aber zwischen 0 und 1 % doch noch ein Optimum. Es wäre interessant, dies zu überprüfen, da die normale Atmosphäre ja nur 0,03 % Kohlendioxyd enthält. Ob bei schnellem Kohlenhydratumsatz durch die Erhöhung der Kohlendioxydspannung die Wood-Werkman-Reaktion gefördert oder gehemmt wird, ist vielleicht nur eine Frage des Ausmaßes.

Die in den Versuchen über die Wirkung der Ammonsulfatkonzentration festgestellten *Trockengewichte* (Figur 10) passen nun allerdings nicht restlos zur Deutung, wonach wegen der größern Myzelmasse die Umsetzungsgeschwindigkeit erhöht wird und dadurch Sauerstoffmangel eintritt, der dann einen Rückgang des Fumarsäureertrages bewirkt. Während die meisten Trockengewichte in diese Interpretation hineinpassen, zeigen sich Abweichungen bei der höchsten Ammonsulfatkonzentration (0,64 %) des Versuches 32 (Fallen des Trockengewichtes ohne Steigerung der Fumarsäureausbeute) und im ganzen Versuch 25 gegenüber den andern Versuchen: Die Trockenmassen sind hier höher ohne Verminderung der Fumarsäureausbeute. Innerhalb des Versuches 25 herrscht jedoch sehr gute Übereinstimmung. Daß in den Versuchen mit niedriger Glukosekonzentration die Trockenmassen von 0,08 % Ammonsulfat an konstant bleiben, ist sehr einfach dadurch zu erklären, daß hier der Kohlenstoff für die Myzelbildung begrenzend wird. Hier kann auch die geringe Fumarsäurebildung im Baustoffwechsel eine Rolle spielen, nicht aber bei den Versuchen mit 10 und 18 % Glukose.

Die Kohlenstoffversorgung

Einfluß der Glukosekonzentration

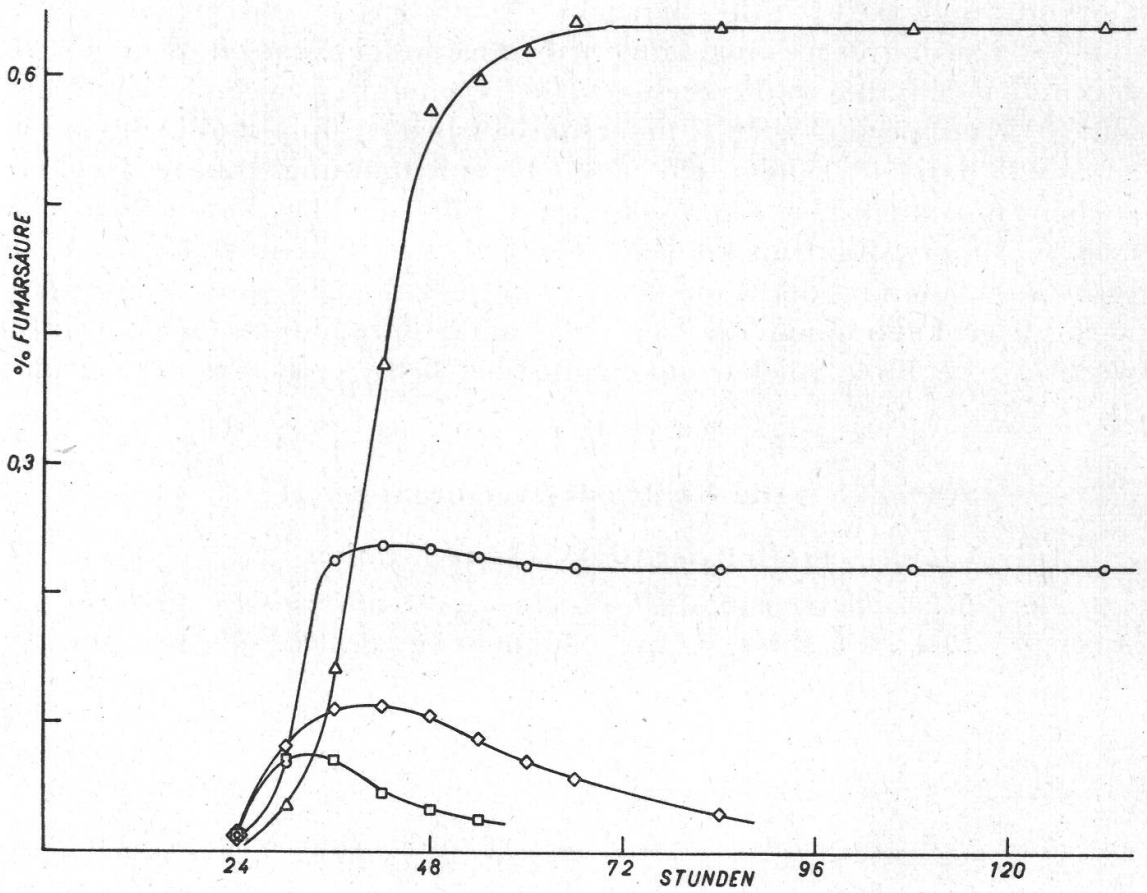
Die Glukosekonzentration hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Ausbeute an Fumarsäure, solange sie nicht für das Myzelwachstum ins



Figur 11
Einfluß der Glukosekonzentration auf den Stoffumsatz
Versuch 26. 0,1 % Ammonsulfat, 30° C

□———□ Glukoseverbrauch
– – – – – Maximal möglicher Glukoseverbrauch (Glukoseangebot)
△———△ Ausbeute an Äthylalkohol
○———○ Ausbeute an Fumarsäure

Minimum kommt; ebenso wird der Alkoholertrag kaum verändert. Anders verhält es sich jedoch mit der absoluten Menge an gebildeter Fumarsäure: sie steigt in linearer Proportion mit der angebotenen Glukosemenge, bis diese 8 % erreicht. Von höhern Konzentrationen an wird nicht mehr alle Glukose aufgenommen, und bei 18 % bleibt sogar die absolute aufgenommene Menge gegenüber den niedrigern Konzen-



Figur 12

Zeitlicher Verlauf der Fumarsäurebildung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen
Versuch 54. 0,05 % Ammonsulfat, 30° C

△——△ 3 % Glukose ○——○ 1,5 % Glukose
◇——◇ 1 % Glukose □——□ 0,75 % Glukose

trationen zurück (Figur 11). Daß in allen Arbeiten mit Deckenkulturen durchwegs 8 bis 12 % Glukose als günstig angegeben werden, hängt damit zusammen, daß zur Bildung einer kräftigen Pilzdecke verhältnismäßig viel Stickstoff geboten werden muß, was auch zu hoher Glukosegabe zur Einhaltung eines günstigen Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnisses zwingt (siehe unten). Mit F o s t e r und W a k s m a n (1939 *a, b),* stimmen meine Ergebnisse in bezug auf die Glukoseaufnahme überein; während aber die beiden amerikanischen Autoren von 2,5 bis 20 % Glukose eine kontinuierliche Abnahme des Ertrages von 0,47 auf

0,30 verzeichnen, ergibt sich aus meinen Kurven eine Abnahme von 0,21 auf 0,16 bei einem von 4 % auf 18 % steigenden Glukoseangebot. Der Unterschied in der absoluten Höhe der Ausbeute erklärt sich leicht daraus, daß F o s t e r und W a k s m a n ihre Ergebnisse an stationären Decken und nicht an Schüttelkulturen gewonnen haben und auch sonst andere Bedingungen boten.

Anders verhält es sich, wenn die Glukose als Minimumfaktor für die Myzelbildung bestimmend wird: zunächst läßt sich die schon früher beobachtete Verminderung der Umsetzungsgeschwindigkeit mit steigender Glukosekonzentration erneut beobachten (Fig. 12); vermutlich ist die Zunahme des osmotischen Wertes dafür verantwortlich. Am auffälligsten ist aber, daß *Rh. japonicus bei knapper Zuckerversorgung die gebildete Fumarsäure wieder aufzunehmen vermag,* bei reichlicher jedoch nicht. Die Grenze liegt beim Verhältnis Ammonsulfat : Glukose wie 1 : 30, was dem Verhältnis Stickstoff : Kohlenstoff wie 1 : 22 entspricht. Der Schluß, daß der Pilz *nur im Baustoffwechsel die Fumarsäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten vermag,* im Betriebsstoffwechsel jedoch nicht, wird besonders gestützt durch die schwache, aber signifikante Abnahme der Fumarsäurekonzentration beim kritischen Verhältnis zwischen Ammonsulfat und Glukose (Figur 12, Kurve für 1,5 % Glukose) und das darauf folgende strenge Konstantbleiben.

Tabelle 5
Glukosekonzentration und Trockengewicht
Versuch 61. 0,05 % Ammonsulfat. Mittel aus drei Werten

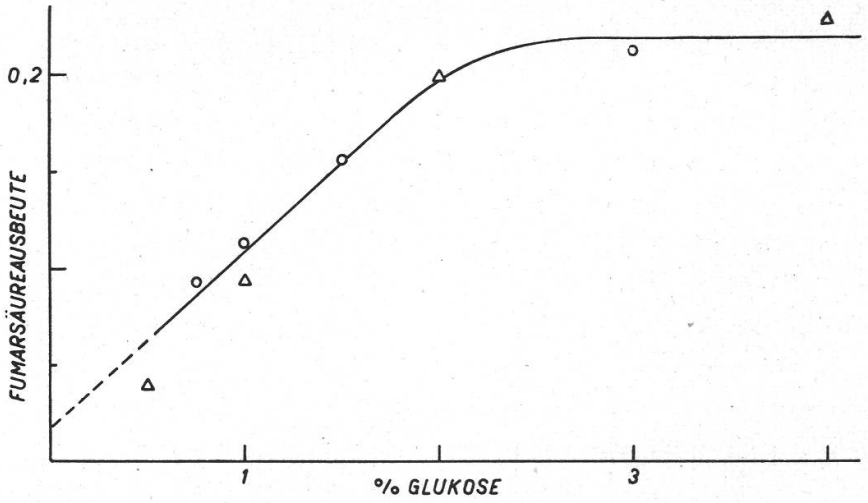
Glukose, %	0,25	0,5	1	2	4
Trockenmasse, mg .	91	112	189	263	239

Entsprechend zeigt auch die Tabelle der Trockengewichte (Tabelle 5) erst bei Glukosekonzentrationen unter 2 % ein Absinken der Trockenmasse; bei 2 % und 4 % Glukose ist der Stickstoff und nicht mehr der Kohlenstoff im Minimum. Daß bei weniger als 2 % Glukose die Trockengewichte nicht streng proportional zur Zuckermenge abnehmen, liegt natürlich daran, daß dank der Verwertung der Fumarsäure dem Organismus mehr Energie und Kohlenstoff zur Verfügung stehen, als wenn er die Glukose nur bis zur Fumarsäure abbauen würde.

Die wichtige Rolle, die die Fumarsäure und die andern C_4-Dikarbonsäuren beim Aufbau des Pilzmyzels spielen, geht auch daraus hervor, daß im Baustoffwechsel der Ertrag an Fumarsäure wesentlich geringer ist als im Betriebsstoffwechsel. Nun läßt sich zwar der Betriebsstoffwechsel für sich allein untersuchen, nicht aber der Baustoffwechsel: dieser ist immer auch vom Betriebsstoffwechsel begleitet. Es wird aber

der Baustoffwechsel einen um so größeren Anteil am gesamten Kohlehydratumsatz haben, je größer das relative Wachstum ist, also die Zunahme an Myzelmasse bezogen auf das bereits vorhandene Myzel, und je früher der Fumarsäureausstoß mit dem Kohlehydratverbrauch verglichen wird. Zum gleichen Ergebnis muß die Verringerung des Angebotes an Kohlehydrat führen: entsprechend zeigt Figur 13 bei kleinem Glukoseangebot (unter 2 %) auch nur geringe Fumarsäureausbeuten (Quotienten aus dem Fumarsäuremaximum in Figur 12 und dem zugehörigen Angebot an Glukose).

Die Extrapolation der Kurve zum Glukoseangebot 0 zeigt, daß im *reinen Baustoffwechsel die Fumarsäureproduktion minim* wird, wenn



Figur 13
Einfluß niedriger Glukosekonzentrationen auf die Ausbeute an Fumarsäure. 0,05 % Ammonsulfat, 30° C
○———○ Versuch 54 △———△ Versuch 61

sie nicht sogar auf Null sinkt. Bei höhern Glukosekonzentrationen gelangt man anderseits in asymptotischer Näherung zum Wert 0,22 für die Ausbeute im reinen Betriebsstoffwechsel, einem Wert, zu dem auch die Versuche mit variierter Konzentration an Ammonsulfat führen (vgl. Figur 8 bei 0,05 % Ammonsulfat).

Das Ergebnis dieser Versuche stimmt überein mit den Befunden von F o s t e r und W a k s m a n (1939 *b*), die durch Zinkzugaben bei einem Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis über 1 : 25 keine Fumarsäure mehr erhielten, wohl aber viel höhere Myzelgewichte: bei Zinkzugabe war offenbar die Glukose für die Myzelbildung Minimumfaktor, so daß sie völlig im Baustoffwechsel verbraucht wurde, andernfalls war aber der Baustoffwechsel durch den Zinkmangel begrenzt, und von der Glukose blieb ein wesentlicher Teil für den Betriebsstoffwechsel und damit die Fumarsäurebildung übrig.

Die Eignung verschiedener Kohlenstoffquellen

Um bei der Prüfung verschiedener Kohlenstoffquellen auf ihre Eignung für die Fumarsäurebildung tatsächlich von gleichen Voraussetzungen ausgehen zu können und das Bild der Fumarsäuregärung nicht durch verschiedene Wachstumsbedingungen und daraus abzuleitende Unterschiede der Myzelien stören zu lassen, begann ich die Versuche mit jeweilen nur 150 cm^3 Nährlösung, die aber sämtliche mineralischen Bestandteile und Glukose enthielten. Nach 36 Stunden, wenn das Myzel ausgewachsen und die Glukose verbraucht war, kamen in jeden Kolben nochmals 50 cm^3, in denen die zu prüfenden Zucker gelöst waren. Zur Stabilisierung der Wasserstoffionenkonzentration während des Sterilisierens enthielten die Zuckerlösungen 0,1 % KH_2PO_4; ihre Azidität war *p*H 5,4. Auf das gesamte Volumen von 200 cm^3 berechnet, enthielten die Nährlösungen 0,02 % Ammonsulfat und 0,5 % Glukose, dazu Kaliphosphat, Magnesiumsulfat und Marmor wie üblich. Bei den zu untersuchenden Kohlenstoffquellen wurde das Glyzerin 0,15molar, die Monosaccharide 0,075molar, die Disaccharide 0,0375molar und die Trisaccharide entsprechend 0,025molar gegeben. Bei der Einwaage wurden natürlich die Unterschiede im Wassergehalt der einzelnen Präparate in Rechnung gestellt.

Vorversuche hatten gezeigt, daß der Pilz nicht auf Verunreinigungen der verwendeten Glukose reagiert; er hatte aus reinster, wasserfreier Glukose (Siegfried), aus *Glycosum depuratum pulvis* (offenes Handelspräparat) und aus hydrolisiertem Kartoffelmehl, also «technischer Glukose» eigener Herstellung, gleich viel Fumarsäure geliefert; das gilt für Schüttel- und für Deckenkulturen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Befunden Bernhauers (1936, 1941), der die Wichtigkeit der Verwendung «technischer Glukose» für die Fumarsäuregärung betont. Trotz dieser Unempfindlichkeit des Pilzes wurden reine Präparate gleicher Herkunft (Roche) verwendet, mit Ausnahme der Saccharose, für die ein Präparat des Lebensmittelhandels genommen wurde, und des Glyzerins, das ein auf den Wassergehalt nachgeprüftes Analysenpräparat von Schering-Kahlbaum war. In jedem Versuch diente Glukose als Kontrolle, deren Fumarsäureertrag jeweilen gleich 100 % gesetzt wurde; die Tabelle 6 zeigt in den vier Versuchen auch gleich die Reproduzierbarkeit der Fumarsäureausbeute aus Glukose.

Da die Geschwindigkeit der Umsetzung unter den gegebenen Bedingungen (Schüttelkulturen ohne besondere Belüftung) den Ertrag an Fumarsäure beeinflußt, können streng genommen nur Kohlenstoffquellen miteinander verglichen werden, die annähernd gleich schnell verbraucht werden. Auf jeden Fall darf man nicht besonders langsam umgesetzte (wie die Zuckeralkohole Mannit und Sorbit) nur deshalb als günstig gegenüber der Glukose bezeichnen, weil sie höhere Erträge liefern.

Ausnützung verschiedener Kohlenstoffquellen

Tabelle 6

Die zu prüfenden Zucker wurden 36 Stunden alten, auf Glukose angesetzten Schüttelkulturen beigegeben. Alle Werte sind Mittel aus je drei Einzelwerten. Die erste Kolonne enthält die Versuchsnummer. Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu demonstrieren, sind auch die Myzelgewichte angegeben

	Kohlenstoffquelle	% Fumarsäure Total	% Fumarsäure Netto[1]	Ertrag gegen Glukose	mg Myzel trocken	Zeit[2] Tage
53	Glukose	0,821	0,650	100	128	3,5
	Arabinose	0,210	0,040	6	137	5
	Ribose	0,207	0,045	7	132	6
	Xylose	> 0,8	> 0,65	> 100	147	9
	Rhamnose	0,156	0	—	123	4
51	Glukose	0,788	0,645	100	142	4
	Galaktose	0,780	0,627	97	142	6
	Fruktose	0,945	0,789	122	146	5
	Glyzerin	0,225	0,070	11	139	7
55	Glukose	0,782	0,622	100	140	3
	Mannose	0,840	0,682	110	146	3
	Mannit	⩾ 0,8	⩾ 0,64	⩾ 105	143	9
	Sorbose[3]	0,162	0	—	121	5
	Sorbit	> 1,14	> 0,86	> 138	144	9
52	Glukose	0,784	0,608	100	131	4
	Laktose	0,144	0	—	128	4
	Maltose	0,739	0,595	98	131	4
	Saccharose	0,825	0,686	113	125	4
	Raffinose[4]	(0,413)	(0,268)	(44)	135	(4)

[1] Nach Abzug der beim Zusetzen der zu prüfenden Kohlenstoffquellen bereits vorhandenen Fumarsäure.

[2] Vom Zusetzen der Zucker bis zum Aufhören der Fumarsäurebildung resp. bis zum Versuchsabbruch.

[3] Trotz dem Ausbleiben der Fumarsäurebildung verschwanden 28 % (in einem andern Versuch 34 %) des Zuckers aus der Lösung.

[4] Verfrühter Versuchsabbruch: es waren noch 55 % des zugesetzten Zuckers in der Lösung. In einem zweiten Versuch ergab Raffinose gleich viel Fumarsäure wie Glukose bei verdoppelter Umsetzungszeit.

Von den *Monosacchariden* sind die *Pentosen Arabinose* und *Ribose* sehr ungeeignete Kohlenstoffquellen; sie liefern in der doppelten Zeit nur 6 und 7 % vom Ertrag der Glukose. Die *Xylose* liefert zwar Fumarsäure in der gleichen Größenordnung wie die Glukose, braucht aber das Dreifache an Zeit. Die *Methylpentose Rhamnose* wird überhaupt nicht verwertet. Unter den *Hexosen* ist das gleiche mit der *Sorbose* der Fall; merkwürdigerweise verschwindet sie aber bis zum Versuchsabbruch doch zu einem Teil aus der Lösung: im einen Fall verschwanden 34 %,

im andern 28 % der zugesetzten Menge. *Galaktose* liefert gleich viel Fumarsäure wie Glukose (der Unterschied von 3 % ist nicht signifikant), wird aber etwas langsamer umgesetzt. Auffällig ist der bedeutende Mehrertrag aus *Fruktose;* die Geschwindigkeit der Bildung ist gleich wie bei der Glukose, doch hält sie etwas länger an. Die *Mannose* steht zwischen beiden und ist signifikant von ihnen verschieden. Bei den *Zuckeralkoholen* zeigt sich, daß der Ersatz der Aldehydgruppe der Mannose durch eine Karbinolgruppe die Umsetzung bremst. Daß *Sorbit,* obwohl Sorbose keine Fumarsäure liefert, einen hohen Ertrag liefert, erklärt sich leicht daraus, daß sich der Sorbit auch von der Glukose ableiten läßt, und dieser gegenüber ist seine Umsetzung gebremst, wie die Umsetzung des *Mannits* gegenüber der Mannose.

Von den *Disacchariden* (die nach dem Sterilisieren durch die Fehlingreaktion auf das Ausbleiben einer wesentlichen Hydrolyse geprüft wurden) bewährt sich *Laktose* auch gegenüber *Rh. japonicus* als nicht vergärbarer Zucker, obwohl seine Bestandteile Glukose und Galaktose ohne besondere Schwierigkeit umgesetzt werden. Leicht umsetzbar sind *Maltose* und *Saccharose;* sie liefern die nach ihrer Zusammensetzung zu erwartenden Mengen Fumarsäure, d. h. Maltose soviel wie ein entsprechendes Quantum Glukose, während der Ertrag aus Saccharose genau in der Mitte zwischen dem aus Glukose und dem aus Fruktose bleibt. *Rh. nigricans* vermag nach F o s t e r (1949) Saccharose nicht anzugreifen.

Das *Trisaccharid Raffinose* besteht aus Fruktose, Glukose und Galaktose; es hydrolysiert leicht in Fruktose und das Disaccharid *Melibiose.* Daß die Umsetzung anfangs bedeutend rascher erfolgt als später, deutet darauf hin, daß in der sauren Kulturlösung diese Hydrolyse eintritt und die Melibiose nur langsam umgesetzt werden kann. Als einziger Körper mit *drei Kohlenstoffatomen* wurde *Glyzerin* geprüft; seine Umsetzung erfolgt nur sehr langsam.

Kohlenstoffbilanz und Weg der Fumarsäurebildung

Wie in der Einleitung erwähnt, kommen vor allem zwei Wege für die Bildung der Fumarsäure in Betracht: der eine führt über Alkohol und Essigsäure, von der zwei Moleküle in der Thunberg-Wieland-Kondensation zu Bernsteinsäure vereinigt werden, worauf durch Dehydrierung Fumarsäure entsteht, im andern wird durch die Wood-Werkman-Reaktion aus Brenztraubensäure und Kohlendioxyd Oxalessigsäure gebildet und diese über Apfelsäure zu Fumarsäure umgeformt. Es ergeben sich somit zwei verschiedene Bruttogleichungen:

nach Thunberg-Wieland $C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 = C_4H_4O_4 + 2\,CO_2 + 4\,H_2O$

nach Wood-Werkman $C_6H_{12}O_6 + 2\,CO_2 = 2\,C_4H_4O_4 + 2\,H_2O$

Nach Butkewitsch und Fedoroff, die die Thunberg-Wieland-Kondensation als Grundlage der Fumarsäurebildung durch *Rhizopus* postulierten (vgl. Einleitung), müssen sich also die Gewichte der Hexose und der Fumarsäure wie 180 : 116, unter Zugrundelegung der Wood-Werkman-Reaktion aber wie 180 : 232 verhalten. *Bei der Untersuchung des Einflusses der Ammoniumkonzentration erhielt ich mit wenig Glukose und wenig Ammonsulfat mehr Fumarsäure und Äthanol zusammen, als auf Grund der Thunberg-Wieland-Kondensation möglich gewesen wäre.* Dieser Befund zwingt zur Annahme, daß auch unter *aeroben* Bedingungen die Wood-Werkman-Kondensation abläuft. Zur Bestätigung wurde ein Versuch unter besondern Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt (Verwendung von *Glycosum purissimum anhydricum pro iniectionem* Siegfried, Wasserfreiheit nachgeprüft; Kontrolle der Eichung des Polarographen; Bestimmung des Äthanols im Destillat maßanalytisch mit Kalibichromat und optisch mit dem Zeißschen Interferometer durch Herrn J. Studinger im kantonalen chemischen Laboratorium); er lieferte die Zahlen der Tabelle 7. Der Überschuß an Endprodukten des Stoffwechsels gegenüber dem Glukoseverbrauch ist signifikant; dabei ist die sicher ebenfalls gebildete Apfelsäure noch gar nicht berücksichtigt und ebensowenig die zur Myzelbildung verbrauchte Glukose. Das Myzel eines Kolbens enthielt im Durchschnitt 50 mg Trockenmasse.

Tabelle 7

Äquivalenz der Endprodukte zum Glukoseverbrauch

Versuch 37. 1 % Glukose, 0,01 % Ammonsulfat, T = 30° C

Kolben-Nummer	1	2	3	4	5	6
Gefundene Werte:						
Fumarsäure, %	0,51	0,58	0,51	0,534	0,505	0,524
Äthylalkohol, %	0,09	0,09	$0{,}11_5$	$0{,}084_5$	0,10	0,11
Berechnete Werte, als % Glukose:						
Fumarsäure[1]	0,82	0,93	0,82	0,86	0,81	0,84
Äthylalkohol	$0{,}17_6$	$0{,}18_6$	$0{,}22_5$	$0{,}16_5$	$0{,}19_6$	$0{,}22_5$
Glukoseverbrauch, ber.	$0{,}99_6$	$1{,}11_6$	$1{,}04_5$	$1{,}02_5$	$1{,}00_6$	$1{,}06_5$
Glukoseverbrauch, gef.	0,91	0,91	0,91	0,92	0,91	0,92
Äquivalenzüberschuß der Endprodukte	$0{,}08_6$	$0{,}20_6$	$0{,}13_5$	$0{,}10_5$	$0{,}09_6$	$0{,}14_5$

Nachdem Foster und Davis (1948) bereits durch einen entsprechenden Versuch mit einem *Rhizopus*-Stamm, der Milch- und

[1] Berechnet unter der Annahme der Thunberg-Wieland-Kondensation. Aus den Kolben 1—3 wurden zur Verfolgung des Gärverlaufs Proben entnommen. Die Kolben 4—6 blieben bis zum Abbruch unberührt.

Fumarsäure produziert, die Fumarsäurebildung über die Wood-Werkman-Kodensation unter *anaeroben* Bedingungen nachgewiesen haben, zeigt nun dieser Versuch, daß auch *aerob* ein beträchtlicher Teil der C_4-Dikarbonsäuren durch Kondensation von Brenztraubensäure mit Kohlendioxyd entsteht [1].

Dieses Ergebnis mußte die Erstellung einer vollständigen Kohlenstoffbilanz als aufschlußreich in quantitativer Beziehung erscheinen lassen[2]. Dabei erwies sich, daß die getrennte Bestimmung der C_4-Dikarbonsäuren bei den gegebenen niedrigen Konzentrationen sehr heikel ist; für die Kohlenstoffbilanz ist aber dieser Umstand insofern nicht von sehr großer Bedeutung, als bei der Essigsäure und sämtlichen C_4-Dikarbonsäuren jedem abdissoziierbaren Wasserstoffion zwei Atome Kohlenstoff entsprechen. Der in diesen Säuren enthaltene Kohlenstoff kann also durch die Bestimmung des von ihnen aus dem Marmor freigesetzten Kalziums und Austitrieren der Lösung bis zum Neutralpunkt ermittelt werden[3]. Die Kalziumbestimmung ist auf alle Fälle unumgänglich, da die aus dem Marmor freigewordene Menge Kohlensäure bekannt sein muß. Das Kohlendioxyd wurde wie üblich in Barytlauge aufgefangen.

Da es sich zeigte, daß die Konzentration an *Bernsteinsäure* unter 0,02 % blieb[4], konnte angenommen werden, daß sich *die sauren Bestandteile der Lösung auf Fumar- und Apfelsäure beschränkten.* Diese Annahme ließ sich durch Prüfung des Permanganatverbrauchs indirekt bestätigen[5].

Die Bilanzversuche wurden, um den Baustoffwechsel auszuschließen, mit *fertigem Myzel* durchgeführt, das während 38 Stunden in $\frac{m}{5}$ Natriumzitrat auf der Schüttelmaschine gewachsen und sehr fein-

[1] Der Ablauf dieser Reaktion in *Rhizopus*-Myzel, das unter aeroben Bedingungen lebt, wurde von F o s t e r et al. (1941) mit einer ganz andern Methode, nämlich durch Verwendung radioaktiven Kohlenstoffs in Kohlendioxyd, erstmals nachgewiesen. R a u c h et al. (1950) haben in aeroben Deckenkulturen «mehrmals festgestellt», daß die Menge der Endprodukte mehr als 100 % der gegebenen Glukosemenge entsprach. Die protokollarischen Zahlen beschränken sich aber auf die Mitteilung einer Versuchsreihe von vier Parallelkolben, von denen nur einer in seinen Endprodukten über 100 % an Glukoseäquivalenten lieferte.

[2] Die Durchführung dieser Versuche erfolgte in gemeinsamer Arbeit mit cand. phil. Rudolf C h r i s t, der sich im besonderen um die quantitative Bestimmung der C_4-Dikarbonsäuren bemühte, wofür ich ihm viel Dank schulde.

[3] Die Bestimmung des Kalziums erfolgte durch Fällung als Oxalat und oxydimetrische Bestimmung des Niederschlags mit Kaliumpermanganat.

[4] Rohe Kulturlösung, in der die Bernsteinsäurebestimmung völlig negativ geblieben war, wurde mit Bernsteinsäure bis zur Konzentration 0,2 % versetzt (20 mg in 10 cm^3), worauf die Bestimmung 0,185 % Bernsteinsäure nachwies.

[5] Auf Grund der Analyse der rohen Kulturlösung (Gesamtsäurebestimmung, polarographische Fumarsäurebestimmung, Differenz Apfelsäure) wurde der Permanganatverbrauch errechnet, die Säuren als Bariumsalze gefällt, abgetrennt, wieder gelöst und der Permanganatverbrauch bestimmt, der um 7 % zu hoch ausfiel. Die Durchführung der Operationen mit reiner Fumarsäure-Apfelsäure-Lösung ergab einen um 6 % zu hohen Permanganatverbrauch.

körnig war; es enthielt pro Versuch zwischen 350 und 400 mg Trockenmasse. Das Myzel wurde aseptisch in eine Gaswaschflasche mit doppeltem Boden gebracht; vom Kohlendioxyd befreite Preßluft strömte durch das als oberer Boden dienende Glasfilter in feiner Verteilung in die Lösung. Durch Einstellen in ein reguliertes Wasserbad wurde auch diese Flasche wie alle andern Versuche auf 30° C gehalten. Die Kulturlösung enthielt in 300 cm^3 6 g Glukose und war zum Sterilisieren mit einem Tropfen Salzsäure angesäuert (was 1 % der bei Versuchsende festgestellten Menge abdissoziierbaren Wasserstoffes lieferte); die Waschflasche wurde mit 3,6 g Marmor in Stücken beschickt und separat sterilisiert. Leider liegt bei dieser sonst sehr praktischen Flasche zwischen den beiden Böden ein toter Raum, so daß ein Teil der Nährlösung nicht mit dem Myzel in Kontakt gelangt; daraus resultiert auch noch nach dem Aufhören der Gärung ein Rest Glukose. In den beiden letzten Versuchen wurde der tote Raum durch Auffüllen mit Glasperlen so weit verkleinert, daß die Glukose praktisch völlig aufgebraucht wurde.

Aus den Versuchen resultierten die Tabellen 8 und 9.

Tabelle 8
Resultate der Stoffwechselanalyse

Versuch	65	66	67
	mg	mg	mg
Verbrauchte Glukose	5450	6000	6000
Äthylalkohol	840	725	823
Kohlendioxyd	2120	2230	2300
Kalzium in Lösung	870	930	1076
Kohlendioxyd netto	1160	1210	1120
Fumarsäure (polarographisch) ...	2400	2540	2790
Apfelsäure (Gesamts. – Fumars.) .	740	1210	1510

Tabelle 9
Kohlenstoffbilanz

Versuch	65		66		67	
Kohlenstoffgehalt	mg	%	mg	%	mg	%
der verbrauchten Glukose ...	2180	100	2400	100	2400	100
der Säuren	1280	59	1510	63	1720	71
des Äthylalkohols	440	20	380	16	430	18
des Kohlendioxyds	320	15	330	14	310	13
aller Endprodukte	2040	94	2220	93	2460	102

Der Kohlenstoffgehalt der Endprodukte beträgt im Mittel 96 %. Das Manko von 4 % gegenüber der verbrauchten Glukose liegt innerhalb der zu erwartenden Fehlergrenzen, woraus sich ergibt, daß *kein in*

nennenswerten Mengen auftretendes Stoffwechselprodukt der Analyse entgangen ist.

Beim Vergleich der Bruttoformeln nach Thunberg-Wieland (1) und nach Wood-Werkman (2) fällt auf, daß im ersten Fall Kohlendioxyd gebildet und im zweiten solches verbraucht wird. Wenn gleich viel Glukose auf die eine wie auf die andere Weise abgebaut wird, tritt überhaupt kein Kohlendioxyd in der Bruttogleichung auf (3):

Thunberg-Wieland $C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 = C_4H_4O_4 + 4\,H_2O + 2\,CO_2$ (1)

Wood-Werkman $C_6H_{12}O_6 + 2\,CO_2 = 2\,C_4H_4O_4 + 2\,H_2O$ (2)

$2\,C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 = 3\,C_4H_4O_4 + 6\,H_2O$ (3)

Nach diesen Überlegungen wird in der Tabelle 10 das Kohlendioxyd weiter aufgeteilt: der größere Teil ist nach seiner Herkunft dem Alkohol zuzuordnen, der Rest einem bestimmten Säurequantum, das nach der Thunberg-Wieland-Gleichung gebildet wurde. Dann bleibt der größte Teil der Säuren übrig; da ihm kein Kohlendioxyd mehr zugeordnet werden kann, gilt für ihn die oben angeführte Gleichung (3). Auf Grund dieser Gleichung ist dann die Tabelle 11 berechnet; dem nach Thunberg-Wieland gebildeten Drittel ist natürlich die unter Kohlendioxydabgabe entstandene Säuremenge (zweitletzte Zeile der Tabelle 10) beigefügt.

Tabelle 10

Differenzierung der Kohlenstoffbilanz

Es wird angenommen, daß der Organismus *nicht* atmet

Versuch	65	66	67
Kohlenstoffgehalt	mg	mg	mg
des Äthylalkohols	440	380	430
des dazu äquivalenten CO_2	220	190	215
des überschüssigen CO_2	100	140	95
der Säuren, bei deren Bildung dieses CO_2 entstand	200	280	190
der restlichen Säuren	1080	1230	1530

Tabelle 11

Verhältnis der beiden Arten der Säurebildung

Vers.-Nr.	Säurebildung nach	Kohlenstoffgehalte der gebildeten Säuren mg	%	Mittel %
65	Thunberg-Wieland	$200 + \frac{1}{3}\cdot 1080 = 560$	44	
66		$280 + \frac{1}{3}\cdot 1230 = 690$	46	44
67		$190 + \frac{1}{3}\cdot 1530 = 700$	41	
65	Wood-Werkman	$\frac{2}{3}\cdot 1080 = 720$	56	
66		$\frac{2}{3}\cdot 1230 = 820$	54	56
67		$\frac{2}{3}\cdot 1530 = 1020$	59	

Nachdem nun bekannt ist, wie sich die gesamte Säuremenge auf die zwei Bildungsprozesse verteilt, kann berechnet werden, wieviel Glukose für jeden einzelnen beansprucht wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt; dabei ist nur jener Kohlenstoff berücksichtigt, der direkt aus Glukose entnommen wird, nicht aber das Kohlendioxyd, das in der Wood-Werkman-Kondensation in Säuren eingebaut wird und natürlich auch aus der Glukose stammt; es ist bei jener Reaktion berücksichtigt, bei der es gebildet wird.

Tabelle 12
Verwendung der verbrauchten Glukose
Es wird angenommen, daß der Organismus *nicht* atmet

Vers.-Nr.	Produkte der	Auf direktem Weg aus der Glukose entnommener Kohlenstoff mg	%	Mittel %
65	Äthanolbildung	660	32	
66	$C_6 \rightarrow 2\ C_2 + 2\ C_1$	570	26	28
67		645	26	
65	Thunberg-Wieland-	$^3/_2 \cdot 560 = 840$	41	
66	Kondensation	$^3/_2 \cdot 690 = 1035$	47	44
67	$C_6 \rightarrow C_4 + 2\ C_1$	$^3/_2 \cdot 700 = 1050$	43	
65	Wood-Werkman-	$^3/_4 \cdot 720 = 540$	26	
66	Kondensation	$^3/_4 \cdot 820 = 615$	28	28
67	$C_6 \rightarrow 2\ C_3$	$^3/_4 \cdot 1020 = 766$	31	

Wie die Tabellen 11 und 12 zeigen, wird unter den gegebenen *streng aeroben Bedingungen mehr als die Hälfte der C_4-Dikarbonsäuren auf dem Weg über die Wood-Werkman-Kondensation gebildet* und über ein Viertel der verbrauchten Glukose dafür verwendet.

Bei der oben entwickelten Auswertung der Kohlenstoffbilanz wurde angenommen, daß kein Kohlehydrat veratmet, d. h. völlig zu Kohlendioxyd und Wasser abgebaut wird. Es kann aber umgekehrt auch angenommen werden, daß alles Kohlendioxyd, das den Äquivalenzwert des Äthanols überschreitet (also das «überschüssige» der Tabelle 10 und das bei der Wood-Werkman-Kondensation benötigte), durch vollständigen Zuckerabbau entstand, oder mit andern Worten, *daß das Myzel atmet, aber keine Säure nach dem Schema von Thunberg und Wieland bildet.* Es ergeben sich dann die folgenden Formeln:

Atmung $C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 = 6\ CO_2 + 6\ H_2O$ (4)

Wood-Werkman $3\ C_6H_{12}O_6 + 6\ CO_2 = 6\ C_4H_4O_4 + 6\ H_2O$ (5)

$4\ C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 = 6\ C_4H_4O_4 + 12\ H_2O$ (6)

Wie man sieht, ist Gleichung (6) einfach eine Verdoppelung der Gleichung (3). Auf dieser Grundlage (Atmung bei völliger Unterdrückung der Thunberg-Wieland-Kondensation) ist Tabelle 13 berechnet.

Tabelle 13

Verwendung der verbrauchten Glukose

Es wird Atmung angenommen, aber das Vorkommen der Thunberg-Wieland-Kondensation ausgeschlossen.

Vers.-Nr.	Produkte der	Auf direktem Weg aus der Glukose entnommener Kohlenstoff mg	%	Mittel %
65	Äthanolbildung	660	32	
66	$C_6 \rightarrow 2\ C_2 + 2\ C_1$	570	26	28
67		645	26	
65	Atmung	$100 + {}^1/_4 \cdot 1280 = 420$	21	
66	$C_6 \rightarrow 6\ C_1$	$280 + {}^1/_4 \cdot 1510 = 518$	23	22
67		$190 + {}^1/_4 \cdot 1720 = 525$	21	
65	Säurebildung	${}^3/_4 \cdot 1280 = 960$	47	
66	$C_6 \rightarrow 2\ C_3$	${}^3/_4 \cdot 1510 = 1132$	51	50
67		${}^3/_4 \cdot 1720 = 1290$	53	

Wie in der Tabelle 12, so ist auch hier das Ziel der Zusammenstellung die relativen Anteile am Glukosebedarf festzulegen; auch hier ist das Kohlendioxyd dem Prozeß seiner Entstehung zugeordnet und nicht dem Glukosebedarf der Wood-Werkman-Reaktion. Die in der Diskussion der beiden Extremfälle gefundenen Grenzwerte, zwischen denen sich das wirkliche Stoffwechselgeschehen bewegt haben muß, sind in der Tabelle 14 zusammengestellt:

Tabelle 14

Grenzwerte der Möglichkeiten des Zuckerabbaus

Von 100 % Glukose (= 6000 mg) wurden im Mittel von drei Versuchen verwendet für die	Extremfall 1 Tab. 12		Extremfall 2 Tab. 13	
Alkoholbildung	28 %	1680 mg	28 %	1680 mg
Atmung	—	—	22 %	1320 mg
Thunberg-Wieland-Kondensation	44 %	2540 mg	—	—
Wood-Werkman-Kondensation	28 %	1680 mg	50 %	3000 mg

Die Milligramme sind aus den Prozenten errechnet

Unter den gegebenen *streng aeroben Bedingungen* sind also 28 % der aufgenommenen Glukose im anaeroben Prozeß der Alkoholgärung verwertet worden, und mindestens 28 % (aber höchstens 50 %) sind durch die Wood-Werkman-Kondensation in C_4-Dikarbonsäuren übergegangen. Vom Rest läßt sich nicht sagen, ob er völlig veratmet wurde oder mehr die Thunberg-Wieland-Kondensation alimentiert hat. Solange nur Ausgangs- und Endprodukte des Stoffwechsels quantitativ erfaßt werden, ist *eine bestimmtere Aussage grundsätzlich unmöglich.* Das gilt nicht nur für die Kohlenstoffbilanz, sondern auch bei Einbeziehung von Sauerstoff und Wasser: die Differenz der in den Extremfällen 1

und 2 für die Wood-Werkman-Kondensation benötigten Glukosemengen ist gleich der im Fall 2 veratmeten und gleich der Hälfte der im Fall 1 für die Thunberg-Wieland-Kondensation verwendeten (da ja der Prozeß nach Wood-Werkman doppelt soviel Fumarsäure liefert wie der nach Thunberg-Wieland). Da bei der Atmung aber doppelt soviel Sauerstoff verbraucht wird wie bei der Thunberg-Wieland-Kondensation, *unterscheiden sich die beiden Extremfälle auch nicht in der Sauerstoffaufnahme.* Dieser Schluß ergibt sich auch daraus, daß bei bekannten Mengen kohlenstoffhaltiger Endprodukte des Stoffwechsels und Glukose als Ausgangsmaterial auch die Menge des zu Wasser oxydierten Wasserstoffs (und somit der gesamte Sauerstoffbedarf) bekannt ist.

Zusammenfassung

1. Es wird fortlaufend die *Anhäufung von Fumarsäure* in den Kulturlösungen des Phycomyceten *Rhizopus japonicus* Vuill. untersucht. Der Pilz wird in *Schüttelkulturen* gezogen; die Bestimmung der Fumarsäure erfolgt *polarographisch.* Alle Versuche werden bei 30° C durchgeführt.
2. Als günstiges Substrat für rasches Wachstum und reichliche Sporenbildung der Stammkulturen erweist sich Agar mit Hefewasser, Glukose und Kreide oder mit Hefewasser und Mannit.
3. Das klassische «*Reiskornmyzel*» der Schüttelkulturen entwickelt sich nur in *Pufferlösungen;* bei Anwesenheit von *Marmor* zur Säureabstumpfung bildet sich das Myzel faserig-wolkig aus.
4. Bei *Rhizopus circinans* van Tieghem wird auch für den *Minusstamm* beträchtliche Fumarsäureanhäufung in der Kulturlösung nachgewiesen.
5. Das Minimum der *Wasserstoffionenkonzentration* für das Wachstum von *Rh. japonicus* liegt im $^1/_5$molaren Phosphatpuffer bei *p*H 7,5, im gleich konzentrierten Zitratpuffer zwischen *p*H 6,8 und 6; das Optimum für die Fumarsäurebildung liegt bei *p*H 4 bis 4,5, das Maximum bei *p*H 3,0. Das Aziditätsmaximum für das Wachstum des Pilzes liegt bei noch tieferem *p*H; es wurde nicht untersucht. Das Trockengewicht des Myzels änderte sich im geprüften *p*H-Bereich nicht.
6. Wird die Myzelmenge durch kleine *Stickstoff*dosen (unter 0,1 % Ammonsulfat) niedrig gehalten, so sinkt die Geschwindigkeit der Glukoseumsetzung. Dabei *steigt die Fumarsäurebildung* beträchtlich an, während die *Alkoholbildung zurückgeht.*
7. Bei der Herabsetzung der *Phosphat*dosis zeigt sich eine Verminderung der Umsetzungsgeschwindigkeit der Glukose und damit parallel eine Steigerung der Fumarsäureausbeute, schon bevor die

Myzelmenge durch Phosphatmangel herabgesetzt wird. Die Herabsetzung der Umsetzungsgeschwindigkeit wird durch die *Begrenzung der Phosphorylierung* erklärt.

8. Unterbrechung des Gasaustausches zwischen dem Kulturkolben und der äußern Atmosphäre führt zu einem starken Rückgang, jedoch nicht zu völligem Erlöschen der Fumarsäurebildung, die also auch *anaerob* erfolgen kann.
9. Daß die *Verlangsamung der Glukoseumsetzung* sowohl durch Herabsetzung der Myzelmenge als auch durch Begrenzung der Phosphatdosis zu einer *Erhöhung der Fumarsäureausbeute* führt, wird durch die Verbesserung des Verhältnisses zwischen den Geschwindigkeiten des Gasaustausches und der Glukoseumsetzung erklärt.
10. Wird mehr als 8 % Glukose geboten, so wird sie (bei maximal 0,1 % Ammonsulfat) nicht mehr restlos aufgenommen.
11. Bleibt das Verhältnis Ammonsulfat : Glukose unter 1 : 60 bei 0,05 % Ammonsulfat und unter 1 : 40 bei 0,1 % Ammonsulfat, so beeinflußt die *Glukosekonzentration* die *Ausbeute* an Fumarsäure (bezogen auf verbrauchte Glukose) *nicht wesentlich.*
12. Erreicht das *Verhältnis Ammonsulfat : Glukose 1 : 30* oder mehr (Stickstoff : Kohlenstoff wie 1 : 22), so kommt die *Kohlenstoffquelle* für die Myzelbildung ins *Minimum.*
13. Im *Betriebsstoffwechsel* wird die Fumarsäure von *Rh. japonicus nicht angegriffen, wohl aber im Baustoffwechsel.*
14. Im *Baustoffwechsel* wird die Fumarsäure höchstens in Spuren ausgeschieden: die *Ausbeute* (Fumarsäureausscheidung : Glukoseverbrauch) *bleibt unter 0,05.*
15. Als *Kohlenstoffquellen* für die Fumarsäurebildung ungeeignet sind Rhamnose, Sorbose und Laktose; sehr langsam umgesetzt werden Arabinose, Ribose und Glyzerin; rascher erfolgt die Fumarsäurebildung aus Xylose, Mannit und Sorbit, wobei Sorbit durch die besonders hohen Erträge auffällt. Mit gleichem Ertrag wie Glukose und nur wenig langsamer wird Galaktose umgesetzt. Gleich schnell wie Glukose werden Mannose, Fruktose, Maltose und Saccharose verwertet, wobei *die Glukose von Mannose um 10 % und von Fruktose sogar um 20 % im Fumarsäureertrag übertroffen wird;* die Disaccharide geben die ihren Hexosen entsprechenden Ausbeuten.
16. Auch unter aeroben Bedingungen, die Voraussetzung sind für den Ablauf der Thunberg-Wieland-Kondensation, können so große Mengen Fumarsäure gebildet werden, daß ihre Entstehung über die Thunberg-Wieland-Kondensation allein nicht möglich ist; die Kohlenstoffbilanz zeigt, daß *auch aerob mehr als die Hälfte,*

wenn nicht die gesamte Menge der in die Kulturlösung ausgeschiedenen *Dikarbonsäuren* mit vier Kohlenstoffatomen *über die Wood-Werkman-Kondensation* entstanden ist.

Die vorliegende Arbeit entstand im Botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber, der mir auch als Vorsteher des Instituts Instrumente und Material in großzügiger Weise zur Verfügung stellte. Für beides möchte ich ihm herzlich danken. Herr Prof. Geiger-Huber gestattete mir auch, für Serienarbeiten die Dienste von Fräulein L. de Vries in Anspruch zu nehmen; für ihre wertvolle Mithilfe bin ich ihr Dank schuldig. Fräulein V. Uehlinger und Herrn Dr. H. Huber möchte ich bestens danken für die Anfertigung der Photographien, ebenso dem Abwart des Instituts, Herrn E. Spaar, für mancherlei technische Unterstützung.

Literaturverzeichnis

Barinowa, S. A., 1941. Über die Bildung von Fumar- und Bernsteinsäure in den Kulturen von *Rhizopus nigricans*. Microbiol., 10/6, 716. — Ref.: Biol. Abstr., **17,** 1943, 2121; Zbl. f. Bakt., II, **106,** 1944, 215.

Bernhauer, K., 1939. Gärungschemisches Praktikum. Berlin.

— und Knobloch, H., 1941. Oxydative Gärungen; in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig, **3,** 2456.

— und Thole, H., 1936. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. I. Die Bildung von Apfelsäure bei der Fumarsäuregärung. Biochem. Zschr., **287,** 167.

Brdicka, R., 1941. Polarographie; in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig, **1,** 579.

Butkewitsch, Wl. S., 1927. Über die Säurebildung bei Pilzen. Biochem. Zschr., **182,** 99.

— und Fedoroff, M. W., 1929 *a*. Über die Bildung von Fumarsäure in den Zuckerkulturen von *Mucor stolonifer (Rhizopus nigricans)* und sein Verhalten zur Brenztraubensäure. Biochem. Zschr., **206,** 440.

— — 1929 *b*. Über die Umwandlung der Essigsäure durch *Mucor stolonifer* in Bernstein- und Fumarsäure und das Verfahren zur Trennung und quantitativen Bestimmung dieser Säuren. Biochem. Zschr., **207,** 302.

— — 1930 *a*. Über die Verhältnisse zwischen Essig-, Bernstein-, Fumar- und Oxalsäure in den Kulturen von *Mucor stolonifer* und einigen andern Pilzen. Biochem. Zschr., **219,** 87.

— — 1930 *b*. Über die Umwandlung des Äthylalkohols in den Kulturen von *Mucor stolonifer*. Biochem. Zschr., **219,** 103.

Foster, J. W., 1949. Chemical Activities of Fungi. New York.

— und Carson, S. F., 1950. Metabolic Exchange of Carbon Dioxide with Carboxyls and Oxidative Synthesis of C_4 Dicarboxylic Acids. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **36,** 219.

— — Anthony, D. S., Davis, J. B., Jefferson, W. E., und Long, M. V., 1949. Aerobic Formation of Fumaric Acid in the Mold *Rhizopus nigricans:* Synthesis by Direct C_2 Condensation. Proc. nat. Acad. Sci. US, **35,** 663.

Foster, J. W., Carson, S. F., Ruben, S., und Kamen, M. D., 1941. Radioactive Carbon as an Indicator of Carbon Dioxide Utilization. VII. The Assimilation of Carbon Dioxide by Molds. Proc. Nat. Acad. Sci., **27,** 590.

— and Davis, J. B., 1948. Anaerobic Formation of Fumaric Acid by the Mold *Rhizopus nigricans*. J. Bact., **56,** 329.

— — 1949. Carbon Dioxide Inhibition of Anaerobic Fumarate Formation in the Mold *Rhizopus nigricans*. Arch. Biochem., **21,** 135.

— and Waksman, S. A., 1939a. The Production of Fumaric Acid by Molds belonging to the Genus *Rhizopus*. J. Am. Chem. Soc., **61/1,** 127.

— — 1939b. The specific Effect of Zinc and other Heavy Metals on Growth and Fumaric Acid Production. J. Bact., **37,** 599.

— — 1939c. Fumaric Acid Formation Associated with Sexuality in a strain of *Rhizopus nigricans*. Science, **89,** 37.

Hawker, L. E., 1950. Physiology of Fungi. London.

Heyrovsky, J., 1941. Polarographie. Wien.

— 1948. Polarographisches Praktikum. Berlin.

Kluyver, A. J., und Perquin, L. H. C., 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchungen. Biochem. Zschr., **266,** 68.

Kolthoff, J. M., and Lingane, J. J., 1941. Polarography. New York.

Krebs, H. A., 1943. The Intermediary Stages in the Biological Oxidation of Carbohydrates. Adv. Enzym., III, 191.

Lilly, V. G., 1951. Physiology of the Fungi. New York.

Martin, C., und Lynen, F., 1950. Probleme des Zitronensäurezyklus. Adv. Enzym., **10,** 167.

Ochoa, S., 1946. Enzymic Mechanisms of Carbon Dioxide Assimilation. Currents in Biochemical Research, Interscience, New York.

— Mehler, A. H., und Kornberg, A., 1947. Reversible Oxidative Decarboxylation of Malic Acid. J. Biol. Chem., **167,** 871.

Rauch, J., Mielke-Miksch, R., und Bernhauer, K., 1950. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. 3. Mitt.: Vergleichende Prüfung verschiedener Fumarsäurebildner in der Oberflächenkultur. Biochem. Zschr., **320,** 384.

— — Miksch, J. N., und Bernhauer, K., 1950. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. 4. Mitt.: Zur Fumarsäuregärung in der Submerskultur. Biochem. Zschr., **320,** 390.

Slade, H. D., und Werkman, C. H., 1943. Assimilation of Acetic Acid and Succinic Acid Containing Heavy Carbon by Aerobacter Indologenes. Arch. Biochem., **2,** 97.

Thunberg, Th., 1920. Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen Enzyme. Arch. Physiol., **40,** 1.

Virtanen, A. J., 1923. Über die Propionsäuregärung. Soc. Sci. Fenn., Comment. Phys.-Math., **1,** 36.

— 1925. Über die Propionsäuregärung II. Soc. Sci. Fenn., Comment. Phys.-Math., **2,** 20.

— und Karström, H., 1931. Acta Chem. Fenn., **137,** 17. (Zit. nach Wikén, 1950.)

Waksman, S. A., und Foster, J. W., 1938. Effet du zinc sur la végétation du *Rhizopus nigricans* et la production d'acide par cet organisme. C. R. Acad. Sc. Paris, **207,** 483.

Wieland, H., 1922. Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. Ergeb. Physiol., **20,** 477.

Wikén, Torsten, 1950. Stoffwechselmechanismen bei Gärungsorganismen. Schweiz. Zschr. f. Allg. Path. und Bakt., **8,** 511.

Wood, H. G., und Werkman, C. H., 1936 *a*. The Utilization of CO_2 in the Dissimilation of Glycerol by the Propionic Acid Bacteria. Biochem. J., **30,** 48.

— — 1936 *b*. Mechanism of Glucose Dissimilation by the Propionic Acid Bacteria. Biochem. J., **30,** 618.

— — 1938. The Utilization of CO_2 by the Propionic Acid Bacteria. Biochem. J., **32,** 1262.

— — 1940 *a*. The Fixation of CO_2 by Cell Suspension of Propionibacterium pentosaceum. Biochem. J., **34,** 9.

— — 1940 *b*. The Relationship on Bacterial Utilization of CO_2 to Succinic Acid Formation. Biochem. J., **34,** 127.

— — Hemingway, A., und Nier, A. O., 1942. Fixation of Carbon Dioxide by Pigeon Liver in the Dissimilation of Pyruvic Acid. J. Biol. Chem., **142,** 31.