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

**Herausgeber:** Schweizerische Botanische Gesellschaft

**Band:** 63 (1953)

**Artikel:** Untersuchungen über die Lactoflavinbildung durch Aspergillus niger van Tieghem

**Autor:** Sarasin, Alice

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-44369

**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**

# Untersuchungen über die Lactoflavinbildung durch Aspergillus niger van Tieghem

Von *Alice Sarasin*

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel)

Eingegangen am 1. Oktober 1952

**Inhalt**

| | Seite |
|---|---|
| Einleitung | 287 |
| Die Kultur von *Aspergillus niger* | 288 |
| Nachweis und Bestimmung des Lactoflavins in der Kulturlösung | 290 |
| Einfluß der Nährstoffe | 293 |
| Der Einfluß der Konzentration an Magnesium-Ionen | 293 |
| Der Einfluß der Stickstoffquelle | 296 |
| Der Einfluß der Kohlenstoffquelle | 299 |
| Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Lactoflavinbildung | 303 |
| Die Wirkung der Monojodessigsäure | 304 |
| Der Einfluß von HCN | 305 |
| Der Einfluß von Sublimat | 306 |
| Die Lactoflavinbildung bei verschiedenen Rassen von *Aspergillus niger* | 308 |
| Zusammenfassung | 314 |
| Literaturverzeichnis | 316 |

## Einleitung

Im Jahre 1938 wurde durch Lavolley und Laborey in der Kulturflüssigkeit von *Aspergillus niger* Lactoflavin nachgewiesen. Es zeigte sich, daß der Pilz diesen Farbstoff in magnesiumarmer Nährlösung bilden kann. Ein Jahr später veröffentlichten die beiden Forscher eine eingehende Beschreibung des entdeckten Farbstoffes; sie wiesen vor allem auf die Absorptionskurve der gereinigten Kulturlösung im UV-Licht hin, welche dieselben Charakteristika wie eine wäßrige Lösung von synthetischem Lactoflavin zeigte.

Kitavin (1940) konnte den gleichen Organismus zur Lactoflavinbildung anregen, wenn er ihn in einer Nährlösung mit normalem Mg-Gehalt kultivierte, der er aber $HgCl_2$ zugesetzt hatte. Die Ausbeute an Lactoflavin war dann so groß, daß er es nach der Methode von Karrer und Kuhn (1934) in kristalliner Form darstellen konnte. In dasselbe Jahr fällt auch die Untersuchung von Knobloch und Sellmann (1940). Sie untersuchten den Einfluß verschiedener Bedingungen, wie die Art der Stickstoffquelle, $CO_2$-Gehalt und gewisse Rassenunterschiede auf die Lactoflavinbildung durch *Aspergillus niger*.

Alle diese Arbeiten gewähren gewisse Einblicke in den Vitaminstoffwechsel des Pilzes, dagegen fehlen quantitative Angaben; Flavinmenge und Grad des Pilzwachstums sind immer nur angedeutet.

Für die vorliegende Untersuchung stellte sich daher die Aufgabe, die in der Literatur beschriebenen Tatsachen über den Lactoflavinstoffwechsel von *Aspergillus niger* zu ergänzen, und zwar besonders hinsichtlich der quantitativen Verhältnisse und des zeitlichen Verlaufs der Bildung.

Die Untersuchung erhielt dadurch noch eine spezielle Note, als sie an den Rassen von *Aspergillus niger* van Tieghem erfolgte, die Galli (1946) bereits in bezug auf die Bildung von Ascorbinsäure und Zitronensäure studiert hatte.

## Die Kultur von Aspergillus niger

Als Versuchsorganismus diente *Aspergillus niger* v. Tieghem, und zwar die von Galli (1946) hier isolierten Stämme $A_2$, $A_3$, $A_5$, $A_7$ und $A_8$.

Für die meisten Versuche wurde Stamm $A_2$ benützt; andere Stämme wurden nur herangezogen, um die Rassenunterschiede zu untersuchen.

Zur Kultivierung des Pilzes dienten Fernbachkolben mit 150 cm³ Nährlösung, die bei einzelnen Versuchen gemäß den jeweiligen Angaben variiert wurde, grundsätzlich aber folgendermaßen zusammengesetzt war: 0,2 % $NH_4NO_3$, 0,1 % $KH_2PO_4$, 0,025 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 % Saccharose (auf Mg-Freiheit geprüft).

Bei Mg-armen Kulturen wurde der fehlende $SO_4$-Gehalt durch Zugabe von $K_2SO_4$ ersetzt. Die Nährlösung wurde durch dreimaliges Erhitzen im strömenden Dampf während je einer halben Stunde, im Abstand von zirka 24 Stunden, sterilisiert.

Zur Kultivierung des Impfgutes diente Bierwürzeagar, der allerdings bei einigen Versuchen durch Biomalzagar ersetzt wurde. Dieser Wechsel beeinflußte bei allen Rassen auffallend die Lactoflavinbildung. Im allgemeinen wurden deshalb die Pilze auf demselben Substrat gezüchtet, aber es kam dann vor, daß sie nach mehrmaligem Umimpfen keine Sporen mehr bildeten. Durch gelegentliches Umimpfen auf Tomatenagar ließ sich diese Erscheinung vermeiden.

Nach dem Impfen mit einer Suspension bekannten Sporengehaltes [1] wurden die Kulturen im Thermostaten bei optimaler Temperatur von 30° C gehalten. Bei der Kultur wie auch bei allen Messungen wurde darauf geachtet, daß die lactoflavinhaltige Kulturlösung vor Licht möglichst geschützt blieb, weil Lactoflavin sehr lichtempfindlich ist.

In Vorversuchen ergab sich, daß die *Anzahl der geimpften Sporen* keinen wesentlichen Einfluß auf Wachstum und Lactoflavinbildung hatte (s. Tabelle 1). Die einzelnen Daten aus dieser Tabelle stellen jeweils Mittelwerte aus drei Kolben dar; die Streuung der Einzelwerte ist so groß, daß auch die größte Differenz der Mittelwerte beim relativen Lactoflavingehalt kaum als signifikant betrachtet werden darf.

Auch das *Sporenalter* schien nur geringen Einfluß auf die Lactoflavinbildung zu haben (s. Tabelle 2). Ein Vergleich des relativen Lactoflavingehaltes zeigte, daß Kul-

---

[1] Die Sporendichte einer Suspension wurde mit Hilfe eines Blutkörperchen-Zählapparates ermittelt. Dieses Auszählen wurde mehrmals wiederholt und von den gefundenen Werten der Durchschnitt berechnet. Von der bestimmten Suspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und damit ein lichtelektrisches Photometer geeicht. Für einen bestimmten Ausschlag des Meßinstrumentes war dann die Sporenzahl der photometrierten Suspension bekannt.

Tabelle 1

Einfluß der geimpften Sporenmenge

Versuch 27 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
30. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Sporenzahl ($\cdot 10^6$) pro Kolben geimpft . | 2,5 | 1,25 | 0,63 | 0,31 |
| Trockensubstanz g ..... | 0,94 | 0,96 | 0,99 | 0,98 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ ..... | 4,24 | 4,57 | 4,28 | 4,70 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ ..... | 4,51 | 4,76 | 4,32 | 4,78 |

turen aus älteren Sporen ein wenig mehr Lactoflavin bilden als solche aus jüngeren. Da die Unterschiede jedoch nicht groß waren, wurde das Sporenalter später nicht mehr berücksichtigt, sondern allgemein ein bis vier Wochen alte Sporen verwendet.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes am Schluß der Versuche wurde die Myceldecke auf einem getrockneten und gewogenen Filter abgenutscht und gut mit Wasser gespült. Nach dem Antrocknen auf dem Filter bei niedrigen Temperaturen erfolgte das eigentliche Austrocknen bei 100° C bis Gewichtskonstanz erreicht war.

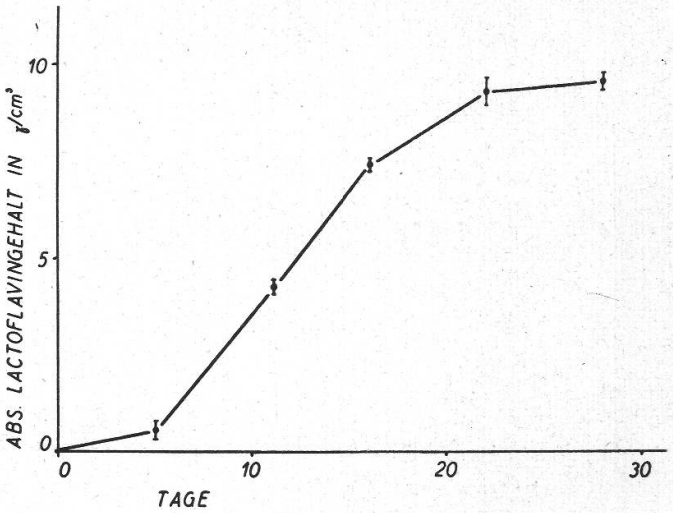
Tabelle 2

Einfluß des Sporenalters

Versuch 24 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
28. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Sporenalter in Wochen ..... | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Trockensubstanz g ..... | 1,05 | 1,02 | 1,10 | 0,96 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ .... | 2,69 | 2,54 | 3,35 | 2,89 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ ..... | 2,56 | 2,49 | 3,02 | 3,01 |

Um ein Bild zu bekommen über *die Streuung der Einzelresultate,* wurde folgender Versuch durchgeführt: Zwölf Versuchskolben wurden mit derselben Nährlösung gefüllt und nach Sterilisation und Impfung bei denselben Versuchsbedingungen ge-




Figur 1
Die zu erwartende mittlere Abweichung des Mittelwertes einer Versuchsserie von 3 Kolben. (Berechnet aus der Streuung des Lactoflavingehaltes in 12 parallel geführten Kulturen)

halten (der Gehalt an $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ betrug $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, weil sich diese Konzentration in andern Versuchen für die Lactoflavinbildung als optimal erwiesen hatte). Die Resultate sind in Figur 1 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Streuung der Versuchswerte

Versuch 14 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
5 % Saccharose

$$m_n = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}\ ;\ n = 12;\ d = \text{Mittelwert minus Einzelwert}$$

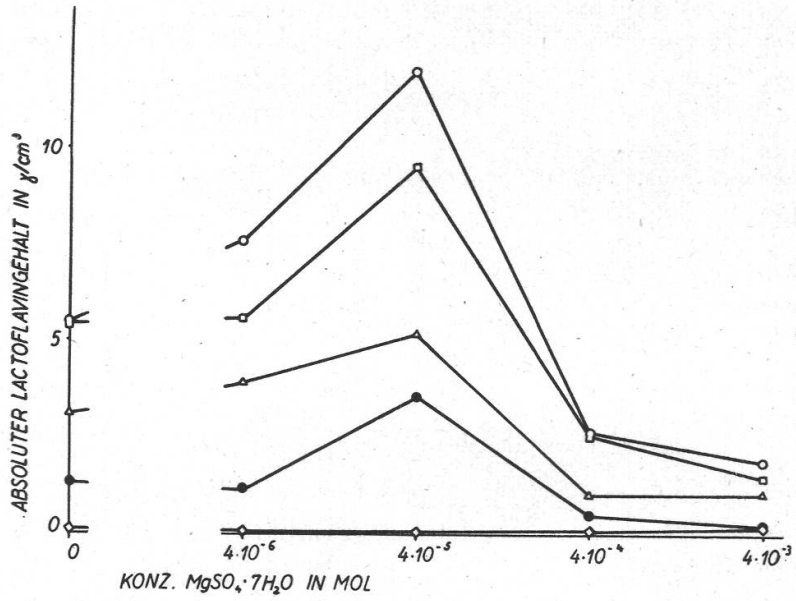
| Versuchstag | Mittelwert aus 12 Kolben $\gamma/cm^3$ Lactoflavin | $m_{12}$ | |
|---|---|---|---|
| | | $\gamma/cm^3$ | % |
| 5 | 0,53 | ±0,053 | 10,00 |
| 11 | 4,22 | ±0,116 | 2,72 |
| 16 | 7,40 | ±0,079 | 1,07 |
| 22 | 9,22 | ±0,160 | 1,74 |
| 28 | 9,48 | ±0,118 | 1,25 |

Die mittlere Abweichung vom Mittelwert liegt zwischen 1 und 3 %, nur am Anfang des Versuchs ist sie größer (10 %). Auch das Wachstum der Pilze ist anfangs nicht so gleichmäßig wie im weiteren Verlauf des Versuchs.

Die relativ geringen «individuellen» Schwankungen erlaubten das Arbeiten mit einer kleinen Zahl von Vergleichskulturen. Im allgemeinen erwies sich eine Parallelführung von drei bis vier Kolben als geeignet.

## Nachweis und Bestimmung des Lactoflavins in der Kulturlösung

Um den Pilz zur Lactoflavinbildung anzuregen, wurde er auf Mg-armer Nährlösung kultiviert (s. Figur 2). Schon nach fünf Tagen färbte sich die Kulturlösung gelblich und zeigte unter der UV-Lampe gelb-




Figur 2
Der absolute Lactoflavingehalt in Abhängigkeit von der Mg-Konzentration
23° C – 5 % Saccharose
◇——◇ 5. Versuchstag
●——● 9. Versuchstag
△——△ 13. Versuchstag
□——□ 17. Versuchstag
○——○ 23. Versuchstag

grüne Fluoreszenz; nach weiteren drei Wochen war die Lösung tiefgelb. Sie wurde nun mit verschiedenen charakteristischen Reaktionen auf das Vorhandensein von Lactoflavin geprüft. Sämtliche Versuche wurden parallel auch mit synthetischer, wässeriger Lösung von Lactoflavin (Roche) ausgeführt und ergaben dieselben Resultate.

1. Die Zugabe einer Spur $Na_2S_2O_4$ reduzierte das Pigment zu einer nicht fluoreszierenden Form. Kräftiges Schütteln mit Luft bewirkte Reoxydation des Farbstoffes, so daß dieser wieder wie ursprünglich floreszierte.
2. Die Kulturlösung wurde durch längeres Erhitzen eingeengt; es zeigte sich dabei keine Schädigung des Vitamins. Durch Behandeln mit Fullererde ließ sich vollständige Adsorption erreichen; auch $Al_2O_3$ erwies sich als geeignetes Adsorptionsmittel. Die Elution mit einem Gemisch von Methanol-Pyridin-Wasser gelang vollständig. Das Eluat wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, der Farbstoff löste sich nicht darin.
3. Das erwähnte Eluat wurde außerdem in zwei Hälften geteilt, die eine angesäuert, die andere alkalisch gemacht, und beide während vier Stunden dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt. Nach der Bestrahlung erschien die saure Lösung farblos, während die alkalische unverändert blieb. Beim Ausschütteln mit Chloroform löste sich in beiden Fällen ein grünlich fluoreszierender Stoff. (Im ersten Fall entsteht aus dem Lactoflavin das Lumichrom, im zweiten das Lumiflavin. Beides sind Lactoflavinderivate, die sich formelmäßig hauptsächlich durch das Fehlen des Riboserests von der ursprünglichen Substanz unterscheiden und beim Bestrahlen mit Licht entstehen.)
4. Die mikrobiologische Bestimmung mit *Lactobacillus casei* 7469 erbrachte den Nachweis, daß die Gesamtmenge des fluoreszierenden Stoffes mit Lactoflavin identisch war [1].

Hinweise für qualitativen Nachweis und Angaben über die Eigenschaften des Vitamins finden sich zum Beispiel bei folgenden Autoren: Abderhalden und Mouriquaud (1948), Fontaine, M. und Raffy, A. (1940), Gstirner, F. (1950), György, P. (1951), Hodson, A. Z. und Norris, L. C. (1939), Karrer, P. (1934), Kuhn, R. (1933).

Zur *quantitativen Bestimmung* erwies sich die fluorimetrische Methode als die günstigste. Eine kleine Probe Kulturlösung genügt zur Analyse (s. Seite 292); dies ermöglicht eine mehrfache Probenentnahme aus derselben Kultur in geeigneten Zeitabständen, so daß sich der zeitliche Verlauf der Lactoflavinbildung in der gleichen Kultur verfolgen läßt.

---

[1] Herrn cand. phil. Emmenegger, der in unserem Institut diese Bestimmung durchführte, danke ich bestens für die freundliche Überlassung dieses Versuchsresultats.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode gegenüber dem Tierversuch und dem mikrobiologischen Test besteht in der raschen Durchführbarkeit. Bei Benützung geeigneter Filter wird die Methode einigermaßen spezifisch (siehe unten).

Das verwendete Fluorimeter [1] arbeitet folgendermaßen: Das UV-Licht einer Hg-Lampe gelangt durch ein Primärfilter in die zu untersuchende Lösung. Das hier entstehende Fluoreszenzlicht wird gefiltert und seine Intensität photoelektrisch gemessen. Das Primärfilter läßt vor allem UV-Licht durch, welches Lactoflavin zur Fluoreszenz anregt; durch die Sekundärfilter gelangen in erster Linie Lichtwellen, die im Bereich des erregten Fluoreszenzlichtes liegen. Der in den erwähnten Photozellen entstehende Photostrom wird mit dem Strom einer weitern Zelle verglichen, die das Licht mit Hilfe eines Spiegelsystems direkt von der Hg-Lampe erhält, wobei ein Galvanometer als Nullinstrument dient.

Die Bestimmung des Lactoflavingehaltes in der *Kulturlösung* gestaltete sich folgendermaßen: Es wurde eine Eichkurve hergestellt, wobei als Standardlösung eine stark verdünnte, wäßrige Natriumfluoreszeinlösung diente. Eine Lactoflavinlösung kam für diesen Zweck nicht in Frage, da schon eine kurze Bestrahlung mit UV-Licht merkliche Zersetzung bewirkte. Die Konzentration des Standards betrug 0,5 $\gamma/cm^3$. Sie ermöglichte das Arbeiten im empfindlichsten Bereich des Instrumentes und erlaubte deshalb eine starke Verdünnung der zu messenden Proben. Die niedrige Konzentration des Standards war auch deshalb vorteilhafter, weil die Eichkurve in dem erwähnten Bereich eine Gerade bildet, was bei höheren Konzentrationen nicht der Fall ist. Aus der Eichkurve konnte dann mit Hilfe der Steigung die Konzentration des Lactoflavingehaltes einer Probe in einfacher Weise berechnet werden. Zur Einstellung der Nullage im Instrument wurde destilliertes Wasser benützt. Dieses ergab denselben Ausschlag wie eine Probe steriler Nährlösung: Der Effekt der bläulichen Fluoreszenz des Rohrzuckers wurde also durch die Gelbfilter vollkommen ausgeschaltet.

Für eine Messung genügte im allgemeinen $^1/_2$ bis 1 $cm^3$, in einzelnen Fällen sogar $^1/_8$ $cm^3$ Kulturlösung. Um den Strahlengang im Instrument gut auszunützen, eignete sich eine Verdünnung der Kulturlösung auf 20 $cm^3$.

Um sicher zu sein, daß sich keine Stoffe mit störender Fluoreszenz in der Probe befanden, wurde diese mit einer Spur $Na_2S_2O_4$ versetzt und dadurch das Lactoflavin vollkommen reduziert. Nach dieser Behandlung durfte am Fluorimeter kein Ausschlag mehr festgestellt werden. Die Reoxydation mit Luftsauerstoff gelang nie vollkommen; meistens war der Ausschlag nach Durchführung des Versuchs etwa 5 % zu klein. Dasselbe war aber auch bei einem Blindversuch mit synthetischer Lactoflavinlösung der Fall. Wahrscheinlich wird bei der Behandlung mit $Na_2S_2O_4$ ein kleiner Prozentsatz des Farbstoffs irreversibel reduziert. Aus diesem Grund wurde die Reduktion nur in größeren Zeitabständen als Kontrollversuch durchgeführt, wo sie stets denselben Effekt hatte.

In einigen Versuchen mußte auch das *Mycel* auf seinen Lactoflavingehalt geprüft werden. Zu dem Zweck wurde die Pilzdecke mit destilliertem Wasser gespült, dann zerkleinert und mit Methanol versetzt. Um das Mycel vollkommen zu extrahieren, genügt eine Einwirkungszeit des Extraktionsmittels von zwei Tagen. Die Bestimmung des Lactoflavingehaltes im Extrakt geschah ebenfalls fluorimetrisch.

---

[1] «Lumetron» der Photovolt Corporation.

## Einfluß der Nährstoffe

### Einfluß der Konzentration an Magnesium-Ionen

Die Untersuchungen von Lavolley und Laborey (1938) zeigten, daß die Lactoflavinbildung beim Herabsetzen des $Mg^{++}$-Gehaltes der Nährlösung gefördert wurde.

Um den Einfluß der $Mg^{++}$-Konzentration eingehender zu untersuchen, wurden Kulturen mit Nährlösungen von verschiedenem $Mg^{++}$-Gehalt angesetzt und ihr Lactoflavingehalt in bestimmten Zeitabständen geprüft. Nicht alle Kulturen bildeten gleichviel Lactoflavin. Schon nach neun Tagen zeigte sich, daß der Lactoflavingehalt in der Kulturlösung mit $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ am größten war (s. Figur 2); dies änderte

Tabelle 4

Wachstum bei verschiedener Konzentration an Magnesium-Ionen

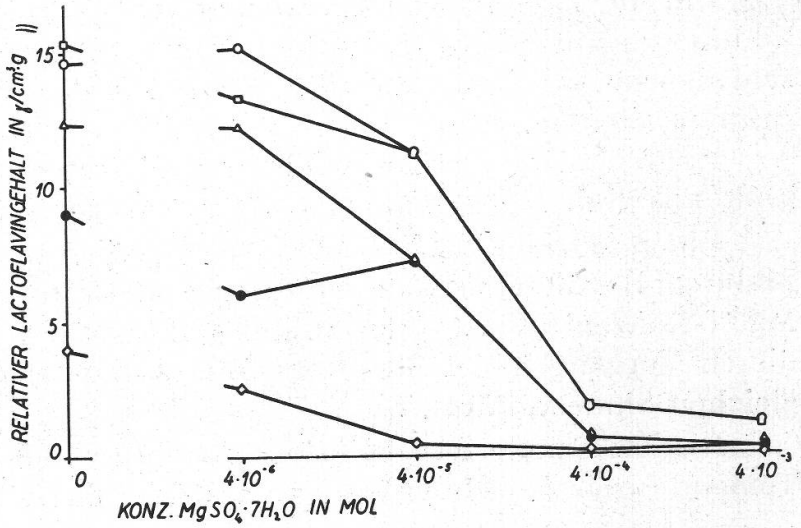
Versuch 10 5 % Saccharose T = 30° C

| Molaritäten $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0 | $4 \cdot 10^{-6}$ | $4 \cdot 10^{-5}$ | $4 \cdot 10^{-4}$ | $4 \cdot 10^{-3}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Trockensubstanz g | | | |
| 5. Tag | 0,05 | 0,04 | 0,23 | 0,47 | 0,99 |
| 9. Tag | 0,12 | 0,20 | 0,50 | 1,17 | 1,89 |
| 13. Tag | 0,25 | 0,28 | 0,65 | 1,42 | 1,09 |
| 17. Tag | 0,35 | 0,42 | 0,85 | 1,38 | 1,56 |

auch nicht während der ganzen Versuchsdauer. Die Nährlösungen mit geringerem oder größerem Gehalt an $Mg^{++}$ schienen keine dermaßen stimulierende Wirkung auf die Lactoflavinbildung auszuüben.

Aber auch auf das Wachstum hatte die $Mg^{++}$-Konzentration einen starken Einfluß (siehe Tabelle 4).

Je mehr $Mg^{++}$ dem Pilz zur Verfügung stand, desto besser entwickelte er sich; entsprechendes gilt übrigens auch für die Sporen-



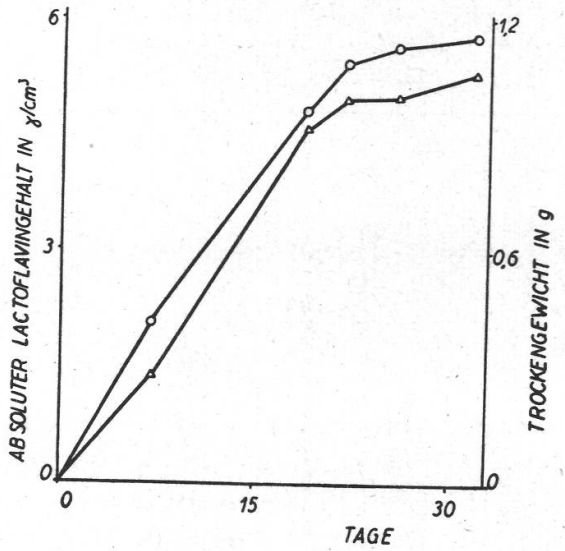

Figur 3

Der relative Lactoflavingehalt in Abhängigkeit von der Mg-Konzentration

23° C – 5 % Saccharose

◇——◇ 5. Versuchstag
●——● 9. Versuchstag
△——△ 13. Versuchstag
□——□ 17. Versuchstag
⊙——⊙ 23. Versuchstag

bildung. Die Wirkung des $Mg^{++}$ auf die Lactoflavinbildung konnte darum klarer erfaßt werden, wenn der absolute Lactoflavingehalt zur Menge des gebildeten Mycels, und zwar seiner Trockensubstanz, in Beziehung gebracht wurde (s. Figur 3). Die optimale $Mg^{++}$-Konzentration lag nun viel niedriger. Relativ am meisten Lactoflavin wurde in Nährlösungen ohne $Mg^{++}$-Zusatz gebildet, entsprechend dem kümmerlichen Wachstum in solchen Kulturlösungen. Schlechtes Wachstum und intensive relative Lactoflavinbildung verliefen also im gleichen Sinn. Allerdings stellte sich auch heraus, daß nur wachsendes Mycel zur Lactoflavinsynthese fähig ist (s. Figur 4). Anfänglich nahmen Trockengewicht und Lactoflavingehalt rasch zu; im Verlauf des Versuches näherten sich beide konstanten Endwerten.




Figur 4
Die Beziehung zwischen Wachstum und Lactoflavinbildung
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
5 % Saccharose
○——○ Wachstum
△——△ Lactoflavinbildung

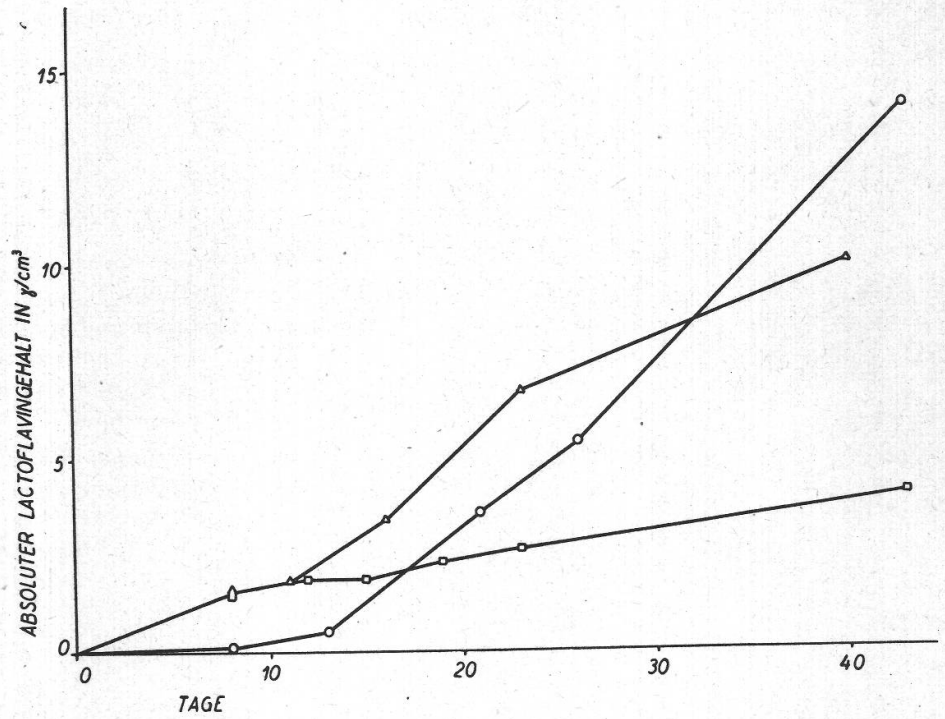
Immerhin nahm in vereinzelten Fällen, und zwar bei Verwendung besonderer C-Quellen, der Lactoflavingehalt nachträglich wieder ab (Seite 301 ff.).

Um die *Temperaturabhängigkeit* von Wachstum und Lactoflavinbildung zu untersuchen, wurden Kulturen mit Nährlösungen von verschiedenem Anfangsgehalt an $Mg^{++}$ bei je drei verschiedenen Temperaturen gehalten.

Es stellte sich heraus, daß bei allen Temperaturen die Lactoflavinbildung durch $Mg^{++}$-Mangel gefördert wurde (s. Tabelle 5).

Einen starken Einfluß hatte die Temperatur auf die Lactoflavinbildung. Bei tieferen Temperaturen verlief im allgemeinen bei allen $Mg^{++}$-Konzentrationen die Bildung langsamer. Eine Erklärung für diesen Vorgang bildet die Beobachtung, daß auch das Wachstum im gleichen Sinne verläuft.

Die Zeitspanne der intensiven Lactoflavinbildung war bei tieferen Temperaturen jedoch größer, vermutlich als Folge des langsameren,



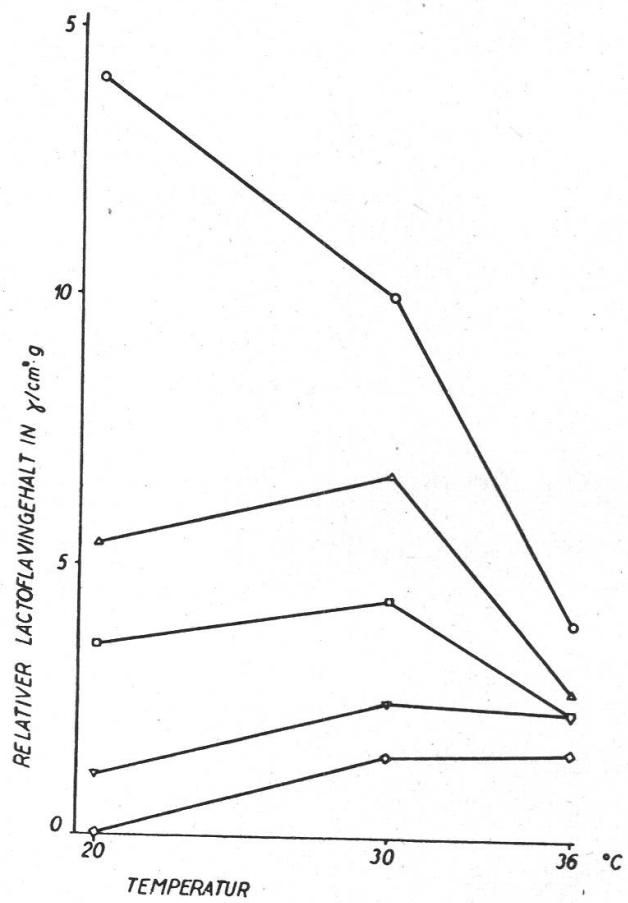

Figur 5
Der zeitliche Verlauf der Lactoflavinbildung bei verschiedenen Temperaturen
$10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose
○——○ 20° C △——△ 30° C □——□ 36° C

jedoch länger andauernden Pilzwachstums. Damit ist auch die Tatsache erklärbar, daß im Verlauf des Versuches bei tieferen Temperaturen mehr Lactoflavin gebildet wurde (s. Figur 5).

Einen Gegensatz zu andern Versuchen, wenn auch nicht sehr wesentlicher Art, ergibt ein Vergleich des relativen Lactoflavingehaltes am Ende der Untersuchung. Der Pilz produzierte relativ am meisten Lacto-

Tabelle 5
Temperaturabhängigkeit von Wachstum und Lactoflavinbildung
Versuch 5 5 % Saccharose T. S. = Trockensubstanz

| Temperatur (Versuchsabbruch) | 20° C (49. Tag) | | | 30° C (48. Tag) | | | 36° C (43. Tag) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Molarität | T. S. g | abs. Lactoflavingehalt γ/cm³ | rel. Lactoflavingehalt γ/cm³ / g | T. S. g | abs. Lactoflavingehalt γ/cm³ | rel. Lactoflavingehalt γ/cm³ / g | T. S. g | abs. Lactoflavingehalt γ/cm³ | rel. Lactoflavingehalt γ/ m³ / g |
| $10^{-3}$ | 2,97 | 2,40 | 2,05 | 3,56 | 2,66 | 0,92 | 1,69 | 0,50 | 0,62 |
| $10^{-4}$ | 2,94 | 2,68 | 1,05 | 3,21 | 1,98 | 0,70 | 1,94 | 0,70 | 0,49 |
| $10^{-5}$ | 1,80 | 14,00 | 8,45 | 1,41 | 10,00 | 8,15 | 2,06 | 4,00 | 1,94 |
| 0 | 1,31 | 7,20 | 6,73 | 1,21 | 6,80 | 6,45 | 1,90 | 4,00 | 2,16 |




Figur 6
Die Lactoflavinbildung in Abhängigkeit von der Temperatur
$10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
5 % Saccharose
◇——◇ 8. Versuchstag
▽——▽ 13. Versuchstag
□——□ 19. Versuchstag
△——△ 23.–26. Versuchstag
○——○ 43.–49. Versuchstag

flavin in einer Nährlösung von $10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Sonst war dies der Fall, wenn die Nährlösung des Pilzes überhaupt kein Mg enthielt.

Für weitere Versuche, die sich nicht mit der Temperaturabhängigkeit befaßten, wurde die mittlere Temperatur von 30° C bevorzugt, weil hier der Endgehalt an Lactoflavin rascher erreicht war als bei tieferen Temperaturen, dafür aber größer war als bei höheren Temperaturen.

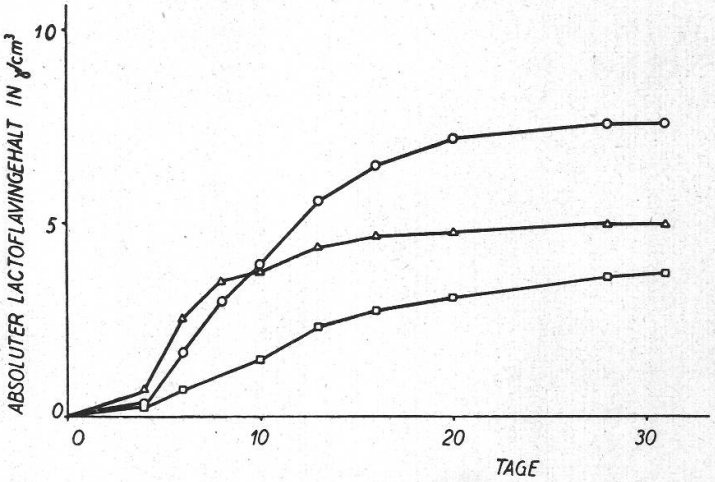
## Der Einfluß der Stickstoffquelle

Nach Lavolley und Laborey (1938) findet intensivere Lactoflavinbildung statt, wenn die Nährlösung als N-Quelle $NO_3$-Ionen statt $NO_4$-Ionen enthält. Nur am Anfang, während der Keimung der Sporen, liegen die Verhältnisse umgekehrt.

Ein Vergleichsversuch, bei dem $KNO_3$, $NH_4NO_3$ und $(NH_4)_2SO_4$ als N-Quellen verwendet wurden, bestätigte diese Beobachtung (s. Figur 7 und Tabelle 6): $KNO_3$ förderte die Lactoflavinbildung am meisten, $(NH_4)_2SO_4$ am wenigsten; in $NH_4NO_3$-haltiger Kulturlösung fand sich ein mittlerer Lactoflavingehalt.

Diese Versuche geben aber auch Aufschluß über die Bedeutung der Stickstoffquelle in bezug auf Bildung von Trockensubstanz und Lacto-

Figur 7
Der Einfluß der Stickstoffquelle auf den zeitlichen Verlauf der Lactoflavinbildung
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose – 0,07 % Stickstoff
○——○ $KNO_3$
△——△ $NH_4NO_3$
□——□ $(NH_4)_2SO_4$




flavin: das Mycel, welches $KNO_3$ als N-Quelle erhielt, wies am Schluß das geringste Trockengewicht auf. Das größte fand sich in Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$.

Tabelle 6
Einfluß der Stickstoffquelle auf die Lactoflavinbildung

Versuch 22 — $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
31. Tag — 5 % Saccharose
0,07 % Stickstoff
(Abbruch des Versuchs)

| | $KNO_3$ | $NH_4NO_3$ | $(NH_4)_2SO_4$ |
|---|---|---|---|
| Trockengewicht g ..... | 0,97 | 1,15 | 1,43 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ ..... | 7,58 | 4,95 | 3,73 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ ..... | 7,87 | 4,32 | 2,63 |

Wachstum und Lactoflavinbildung wurden also durch die beiden erwähnten Ionen in entgegengesetztem Sinne beeinflußt. Etwas Ähnliches hatte sich ja auch beim Vergleich des Einflusses verschiedener Konzentrationen an Magnesium-Ionen gezeigt: in Nährlösungen mit geringem $Mg^{++}$-Gehalt wurde die Lactoflavinbildung gefördert, das Wachstum aber gehemmt.

Eindeutig ließ sich die entgegengesetzte Wirkung der beiden Ionen in solchen Kulturen feststellen, die eine gleiche N-Menge erhielten, bei denen aber das Verhältnis von $NO_3$ zu $NH_4$ variiert wurde (s. Tabelle 7 und Figur 8). Je mehr $NO_3$ die Lösung enthielt, desto intensiver war die Lactoflavinbildung. Die Kulturen mit maximalem $NO_3$-Zusatz bildeten relativ fast doppelt soviel Lactoflavin wie diejenigen mit dem geringsten $NO_3$-Gehalt.

Bei Veränderung des Gesamtstickstoffgehaltes zeigte sich, daß in jedem Fall am meisten Lactoflavin gebildet wurde, wenn $NO_3$ als N-Quelle diente; am eindeutigsten erwiesen sich auch hier wieder die

Werte für den relativen Lactoflavingehalt (s. Figur 9 und Tabelle 8). $NH_4NO_3$ förderte unerwarteterweise die Lactoflavinbildung nicht so stark wie $NH_4Cl$.

Figur 8
Wachstum und Lactoflavinbildung bei verschiedenem Verhältnis von $NO_3$ zu $NH_4$
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose – 29. Tag (Versuchsabbruch) – Gesamtstickstoffgehalt jeweils 0,07 %

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| N-Gehalt als $NO_3$ (%) | 0,0007 | 0,007 | 0,035 | 0,063 | 0,0693 |
| N-Gehalt als $NH_4$ (%) | 0,0693 | 0,063 | 0,035 | 0,007 | 0,0007 |

▨ Trockengewicht in g ▥ rel. Lactoflavingehalt in $\gamma/cm^3 \cdot g$

Tabelle 7
Lactoflavinbildung und Verhältnis von $NO_3$ zu $NH_4$
Versuch 26 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
29. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)
Gesamtstickstoffgehalt in jeder Kultur = 0,07 %

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| N-Gehalt in Form von $NO_3$ %[1] ..... | 0,0007 | 0,007 | 0,035 | 0,063 | 0,0693 |
| N-Gehalt in Form von $NH_4$ %[1] ..... | 0,0693 | 0,063 | 0,035 | 0,007 | 0,0007 |
| Verhältnis $NO_3$ zu $NH_4$ ..... | 1:100 | 1:10 | 1:1 | 10:1 | 100:1 |
| Trockensubstanz g ..... | 1,233 | 1,183 | 1,003 | 0,771 | 0,757 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ ..... | 6,41 | 6,66 | 6,40 | 7,35 | 7,38 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ ..... | 5,20 | 5,63 | 6,37 | 9,53 | 9,63 |

[1] In diesem Versuch wurde $NaNO_3$ und $NH_4Cl$ verwendet.

Figur 9
Die Lactoflavinbildung in Abhängigkeit von der Konzentration der Stickstoffquelle
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose – 28. Tag (Versuchsabbruch)
○——○ $NaNO_3$
△——△ $NH_4NO_3$
□——□ $NH_4Cl$

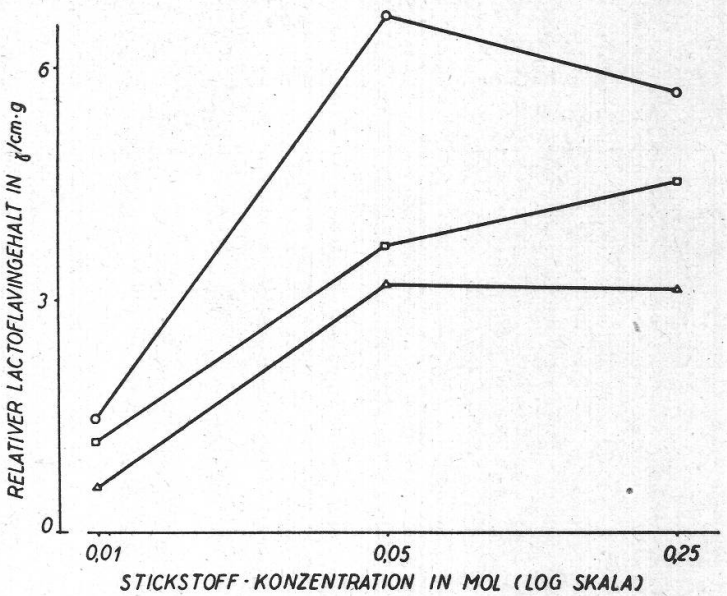



Tabelle 8
Bedeutung verschiedener Stickstoffquellen
Versuch 25 — $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
29. Tag — 5 % Saccharose
(Versuchsabbruch)

| | N-Gehalt % | Trockengewicht g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|---|
| $NaNO_3$ | 0,014 | 0,610 | 0,90 | 1,50 |
| | 0,070 | 0,802 | 5,32 | 6,63 |
| | 0,350 | 0,508 | 2,89 | 5,69 |
| $NH_4Cl$ | 0,014 | 0,702 | 0,83 | 1,18 |
| | 0,070 | 1,083 | 4,01 | 3,70 |
| | 0,350 | 1,240 | 5,61 | 4,53 |
| $NH_4NO_3$ | 0,014 | 0,711 | 0,42 | 0,59 |
| | 0,070 | 0,978 | 3,09 | 3,16 |
| | 0,350 | 1,042 | 3,27 | 3,14 |

Vergleicht man jedoch die Wirkung jeder einzelnen N-Quelle bei verschiedenen Konzentrationen für sich, so findet man im allgemeinen bei erhöhtem N-Gehalt auch eine Zunahme der Trockensubstanz; Entsprechendes gilt aber auch für den relativen Lactoflavingehalt. So tritt hier zum erstenmal ein Fall auf, bei dem die Förderung des Wachstums vermehrte Lactoflavinproduktion nach sich zieht.

## Der Einfluß der Kohlenstoffquelle

Pilzwachstum und Lactoflavinbildung wurden durch eine erhöhte Zuckerkonzentration stark gefördert. Der Einfluß auf das Wachstum war eindeutig: mit zunehmender Zuckerkonzentration fand eine viel größere Deckenbildung statt (s. Tabelle 9).

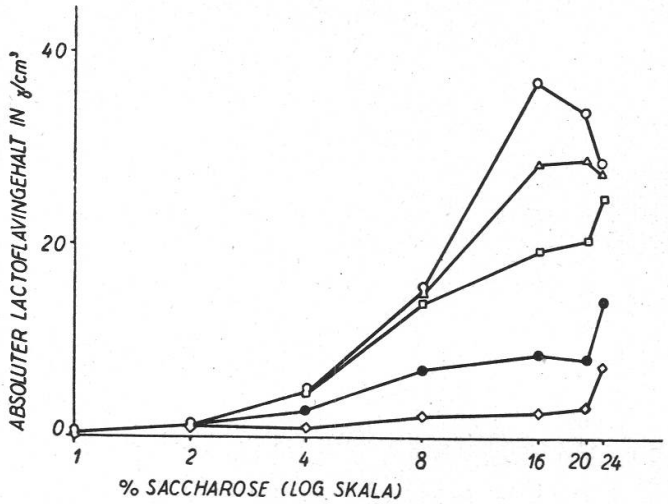
Tabelle 9

Wachstum und $B_2$-Bildung bei verschiedenen Saccharosekonzentrationen

Versuch 33 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C

| Versuchsdauer in Tagen | Saccharose in % | Trockensubstanz g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|---|
| 49 | 1 | 0,28 | 0,51 | 1,86 |
| | 2 | 0,39 | 1,58 | 4,08 |
| | 4 | 0,86 | 5,16 | 6,02 |
| 62 | 8 | 0,87[1] | 15,0 | 17,3 |
| | 16 | 2,34 | 50,7 | 21,6 |
| | 20 | 3,35 | 40,9 | 12,2 |
| | 24 | 3,23 | 33,0 | 10,2 |

Erhöhter Saccharosezusatz förderte aber auch die Bildung von Lactoflavin (s. Tabelle 9 und Figur 10). Während der ersten Hälfte der Versuchsdauer erwies sich die Nährlösung mit 24 % Saccharose als optimal. Das Optimum verschob sich aber im zweiten Teil des Versuches, so daß dann die Kulturlösung mit 16 % Saccharosegehalt die Lactoflavinbildung am meisten förderte.




Figur 10

Der Einfluß der Saccharosekonzentration auf die Lactoflavinbildung

30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

◇——◇ 10. Versuchstag
●——● 21. Versuchstag
□——□ 31. Versuchstag
△——△ 39. Versuchstag
○——○ 49. Versuchstag

Da sich das Wachstum der einzelnen Kulturen so stark unterschied, war auch hier die Berechnung des relativen Lactoflavingehaltes von Bedeutung. Die in Tabelle 9 aufgezeichneten Werte zeigen, daß auch relativ am meisten Lactoflavin gebildet wurde, wenn der Saccharosegehalt der Nährlösung 16 % betrug; die Steigerung des Zuckergehaltes

[1] Der Unterschied im Trockengewicht zwischen Kulturen mit 4 % und 8 % Saccharosezusatz ist vermutlich darum so klein, weil die Versuchsdauer im zweiten Fall länger war und so mehr von den im Mycel enthaltenen organischen Stoffen wieder veratmet werden konnten.

von 1 bis 16 % hatte also nicht nur besseres Wachstum, sondern auch vermehrte Lactoflavinproduktion zur Folge. Hier zeigt sich also zum zweitenmal die Tatsache, daß Verbesserung des Wachstums auch eine solche der Lactoflavinbildung zur Folge haben kann.

Die Kultivierung des Pilzes auf *verschiedenartigen* C-Quellen beeinflußte Wachstum und Lactoflavinbildung in hohem Maße (s. Tabelle 10).

Tabelle 10

Einfluß verschiedener C-Quellen

Versuch 31 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO \cdot 7H_2O$ T = 30° C

36. Tag
(Versuchsabbruch)

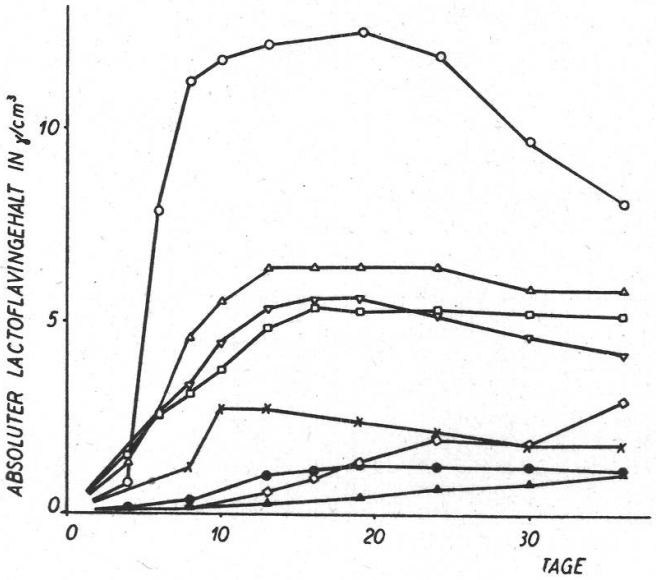
| C-Quelle (5 %) | Trockensubstanz g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|
| Stärke | 0,83 | 1,83 | 2,34 |
| Saccharose | 0,73 | 5,88 | 8,03 |
| Maltose | 0,67 | 8,19 | 12,30 |
| Laktose | 1,39 | 1,16 | 0,83 |
| Glukose | 0,86 | 5,16 | 6,02 |
| Fruktose | 1,43 | 1,05 | 0,73 |
| Galaktose | 1,28 | 2,96 | 3,31 |
| Glycerin | 0,80 | 4,16 | 5,17 |

Es ist aber nicht so, daß einzelne Zuckerarten, wie zum Beispiel die Glukose, bei diesen Versuchsbedingungen vom Pilz etwa weniger gut aus der Lösung aufgenommen würden. Die Zuckerbestimmung am Schluß des Versuches zeigte, daß sich in keiner Lösung mehr bestimmbare Reste von Zucker befanden; nur Galaktose und Fruktose waren noch in Spuren zu finden (0,1 bis 0,2 %). Der Pilz kann demnach nicht alle C-Quellen gleich gut verwenden.

Es ist auffallend, daß fast alle Kulturen mit den kleineren Trockensubstanzmengen relativ und absolut mehr Lactoflavin bilden. Die im Baustoffwechsel weniger gut verwertbaren Nährstoffe fördern also die Lactoflavinbildung. So wiesen Kulturen auf Stärke, Maltose, Saccharose, Glukose und Glycerin geringes Trockengewicht und, außer auf Stärke, intensive Lactoflavinbildung auf. Gerade das Gegenteil war der Fall, wenn statt dessen Fruktose oder Laktose als C-Quelle gegeben wurde. Galaktose bewirkte ein mittleres Wachstum; dasselbe galt für die Lactoflavinbildung.

Auffallenderweise verringerte sich der Lactoflavingehalt der Kulturlösung in einzelnen Fällen gegen den Schluß der Versuche (siehe Figur 11). Dies ließ sich beobachten in Lösungen mit Maltose, Glycerin und Stärke. Möglicherweise wurde in diesen Fällen Lactoflavin vom Pilz wieder aufgenommen und im Betriebstoffwechsel verwertet.

Da das Lactoflavinmolekül Ribose enthält, schien ein Versuch mit dieser Pentose als C-Quelle besonders interessant. Es zeigte sich jedoch, daß der Pilz auf Ribose fast gar nicht wuchs: es entwickelte sich nur




Figur 11
Der Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Lactoflavinbildung
Konzentration der C-Quelle je 5 %
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

×——× Stärke
○——○ Maltose
△——△ Saccharose
●——● Laktose
□——□ Glukose
▲——▲ Fruktose
◇——◇ Galaktose
▽——▽ Glycerin

eine ganz dünne Decke. Auch Lactoflavin trat nur in geringen Mengen in der Kulturlösung auf (s. Tabelle 11). Ganz ähnlich wie auf Glukose verhielt sich der Pilz hingegen, wenn Arabinose als C-Quelle diente.

Tabelle 11
Einfluß von Pentosen

Versuch 34 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
28. Tag (Abbruch des Versuchs) Saccharose zum Vergleich

| C-Quelle 4 % | Trockensubstanz g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|
| Arabinose ..... | 0,7 | 7,05 | 10,30 |
| Ribose ..... | 0,27 | 0,34 | 1,24 |
| Saccharose ..... | 0,89 | 4,46 | 5,03 |

Von den untersuchten C-Quellen wiesen mehrere eine strukturelle Beziehung zur Glukose auf. Es sind dies: Maltose, Saccharose und Arabinose. Gerade diese Stoffe, wie auch Glukose selbst, beeinflußten das Wachstum und die Lactoflavinbildung der einzelnen Kulturen in ähnlicher Weise.

Der Versuch, Kulturen auf den Zuckerabbauprodukten Brenztraubensäure und Acetaldehyd aufzuziehen, mißlang. Die Pilze konnten in diesem Fall nicht zum Wachstum und noch weniger zur Lactoflavinbildung angeregt werden. Die Zugabe dieser Stoffe zu Kulturen mit

jungem Mycel, das in 2prozentiger Saccharoselösung gewachsen war, verhinderte sogar dessen Weiterentwicklung.

Ein Vergleich der gefundenen Beziehungen zwischen Wachstum und Lactoflavinbildung führt also zu folgenden Ergebnissen:

*Lactoflavinbildung und Wachstum verlaufen gleichsinnig*

1. bei Veränderung der Zuckerkonzentration
2. bei Veränderung der Stickstoffkonzentration.

*Lactoflavinbildung und Wachstum verlaufen nicht gleichsinnig*

1. bei Variierung der Magnesiumionenkonzentration
2. bei Verwendung verschiedenartiger C-Quellen
3. bei Verwendung verschiedenartiger N-Quellen.

## Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Lactoflavinbildung

Die bisherigen Versuche ließen keine Schlüsse über Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Lactoflavinbildung zu, so daß weitere nötig wurden.

Da der aerobe Organismus auf eine geeignete Atmosphäre angewiesen ist, wurde der Einfluß ihrer Veränderung auf Wachstum und Lactoflavinbildung untersucht; die Änderung geschah durch Einleiten von $CO_2$ und in einem andern Versuch durch den Abschluß der Kulturen von der Außenluft.

Lavolley und Laborey (1938) beschrieben einen Versuch, in welchem sie gesteigerte Lactoflavinbildung beobachteten, wenn sie in die Kolben der Kulturen von *Aspergillus niger* $CO_2$ einleiteten.

Die vorliegenden Untersuchungen führten jedoch zu andern Ergebnissen. Die Lactoflavinbildung wurde nämlich durch Einleiten von $CO_2$ in junge Kulturen von *Aspergillus niger* gehemmt (s. Tabellen 12 und 13).

Tabelle 12
Lactoflavinbildung in $CO_2$-Atmosphäre
Versuch 19 — $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
5 % Saccharose

| | Lactoflavingehalt der Kulturlösung | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7. Versuchstag vor der $CO_2$-Zufuhr | | 25. Versuchstag *vor* d. erneuten Luftzufuhr | | 32. Versuchstag *nach* erneuter Luftzufuhr | |
| | γ/cm³ | % | γ/cm³ | % | γ/cm³ | % |
| Kontrolle ohne $CO_2$ | 2,1 | 100 | 3,7 | 100 | 3,9 | 100 |
| Versuch mit $CO_2$ .. | 2,0 | 95 | 2,4 | 65 | 3,2 | 82 |

Tabelle 13

Einfluß von $CO_2$ auf Wachstum und Lactoflavinbildung

Versuch 19 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C

32. Tag 5 % Saccharose

(Abbruch des Versuchs)

| | Trockensubstanz g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|
| Kontrolle ohne $CO_2$ ..... | 1,1 | 3,9 | 3,5 |
| Versuch mit $CO_2$ ..... | 1,0 | 3,2 | 3,1 |

Bei diesen Versuchen wurde aus einem Kippapparat $CO_2$ durch ein mit Watte versehenes, sterilisiertes Glasrohr während etwa einer Stunde in die Kulturen eingeleitet. Die Kolben wurden dann mit Hilfe eines Paraffinaufgusses auf die porösen Wattestopfen luftdicht gemacht.

18 Tage nach dem Einleiten von $CO_2$ zeigten die Versuchskulturen nur noch 65 % des von den Kontrollkulturen gebildeten Lactoflavins. Erneute Luftzufuhr regte die Lactoflavinbildung wieder an, doch erreichte am Schluß der absolute Gehalt der Versuchskulturen denjenigen der Kontrollkulturen nicht ganz. Auch die Trockensubstanz war bei den Versuchskulturen etwas geringer. Der Unterbruch der Lactoflavinbildung durch Einleiten von $CO_2$ ist wohl dadurch zustandegekommen, daß gleichzeitig auch das Wachstum unterbrochen wurde.

Ein anderer Versuch, bei dem Kulturen des Pilzes durch Paraffinaufguß auf den Stopfen von der Luftzufuhr abgeschnitten wurden, ergab ähnliche Resultate. Die Lactoflavinbildung wurde stark gehemmt, bei erneuter Luftzufuhr jedoch wieder aufgenommen. Auch diese Ergebnisse können auf einen Unterbruch im Pilzwachstum zurückgeführt werden.

## Die Wirkung der Monojodessigsäure (MJES)

Nach Frear (1947) soll eine $10^{-3}$ molare Lösung der MJES sowohl die alkoholische Gärung wie auch die Säurebildung in Kulturen von *Aspergillus niger* vollständig unterdrücken, wenn das *p*H der Kulturlösung etwa 2 beträgt; eine Hemmung der alkoholischen Gärung wird schon erreicht durch Zusatz von $10^{-4}$ bis $4 \cdot 10^{-4}$ molare Lösungen des Giftes. Bei diesen niedrigen Konzentrationen soll jedoch die Säurebildung unbeeinflußt bleiben.

Es zeigte sich, daß Zugaben von MJES zur Kulturlösung auch auf die Lactoflavinbildung einen Einfluß hatten (s. Tabelle 14 u. Figur 12).

Die Zugabe des gärungshemmenden Stoffes erfolgte erst, wenn der Pilz eine dünne Myceldecke ausgebildet hatte. Zu gleicher Zeit betrug das *p*H der Kulturlösung etwa 2. Die niedrigste der verwendeten Kon-

Figur 12
Die Wirkung der MJES auf die Lactoflavinbildung
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose
↓ Zugabe von MJES
◇——◇ $10^{-2}$ mol. MJES
□——□ $10^{-3}$ mol. MJES
○——○ $10^{-4}$ mol. MJES
△——△ 0 mol. MJES

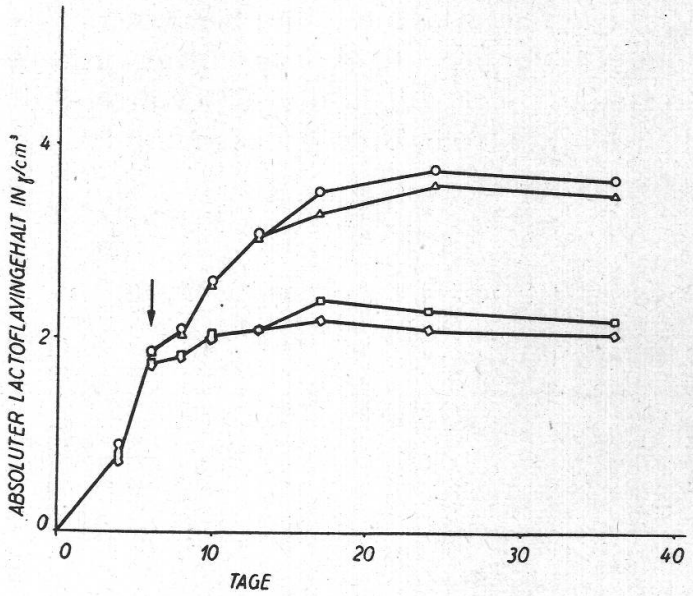



Tabelle 14
Hemmung des Wachstums durch MJES
Versuch 20 — $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
36. Tag — 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)

| MJES in Molaritäten | 0 | $10^{-4}$ | $10^{-3}$ | $10^{-2}$ |
|---|---|---|---|---|
| Trockensubstanz g | 1,11 | 1,15 | 0,43 | 0,43 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | 3,68 | 3,80 | 2,24 | 2,25 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 3,32 | 3,29 | 5,25 | 5,27 |

zentrationen von MJES hatte keinen Einfluß auf die Lactoflavinbildung; auch das Wachstum war gleich wie bei der Kontrollkultur.

Stärkere Zugaben des Giftes hatten jedoch vollständige Hemmung der Lactoflavinbildung zur Folge. Gleichzeitig muß auch das Wachstum stark beeinflußt worden sein: der große Unterschied im Trockengewicht läßt mit ziemlicher Sicherheit darauf schließen, daß es überhaupt aufgehört hatte. Relative Werte des Lactoflavingehaltes sind insofern nicht sehr aufschlußreich, als die Bildung des Vitamins wohl gleichsinnig, nicht aber proportional zum Wachstum verläuft.

Die Zugabe der MJES beeinflußt also direkt das Wachstum des Pilzes; sehr wahrscheinlich ist das Aufhören der Lactoflavinbildung unmittelbar darauf zurückzuführen.

## Der Einfluß von HCN

In den Arbeiten von Warburg (1926) finden sich Untersuchungen über die atmungshemmende Wirkung der Blausäure. Schon $10^{-5}$ molare Lösungen des Giftes genügen zur Auslösung dieses Effektes.

Die Lactoflavinbildung bei *Aspergillus niger* wurde aber erst durch eine $10^{-4}$ molare HCN-Konzentration gehemmt. Bei dieser Versuchsanstellung war jedoch das Trockengewicht am größten (s. Tabelle 15); bei der Kontrollkultur dagegen fand sich die geringste Trockenmasse.

Tabelle 15
Einfluß von HCN

Versuch 23 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
28. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)

| | | Trockengewicht g | Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | Lactoflavingehalt % | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrolle | | 1,046 | 2,91 | 100 | 2,79 |
| molar HCN | $10^{-6}$ | 1,049 | 2,93 | 101 | 2,73 |
| | $10^{-5}$ | 1,093 | 2,93 | 101 | 2,68 |
| | $10^{-4}$ | 1,102 | 2,62 | 89 | 2,44 |

Offenbar war durch den Zusatz von HCN die Veratmung von Pilzsubstanz gehemmt worden. Es leuchtet auch ein, daß die relativen Werte für den Lactoflavingehalt abnehmen in Lösungen mit größerem HCN-Zusatz, weil das am Schluß gefundene Trockengewicht eben größer ist.

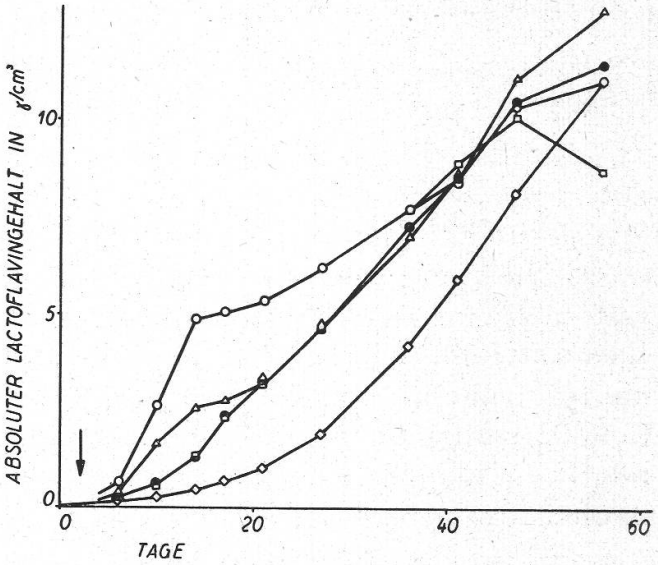
## Der Einfluß von Sublimat

Kitavin (1939) konnte durch Zusatz von $HgCl_2$ zur Kulturlösung von *Aspergillus niger* den Pilz zur Lactoflavinbildung anregen. In einem großangelegten Versuch war seine Ausbeute an Lactoflavin so groß, daß er es kristallin darstellen konnte. Er kultivierte den Organismus in einer Nährlösung mit 20 % Saccharose und hielt die Kulturen bei 35° C.

Eine Steigerung der Lactoflavinbildung durch Zusatz von $HgCl_2$ ließ sich auch in den vorliegenden Untersuchungen beobachten. Als Nährlösung diente die Grundlösung (s. Seite 288) mit einem Saccharosegehalt von 20 %. Die Pilze wurden nach dem Impfen bei einer Temperatur von 30° C kultiviert. Schon nach einem Tag zeigte sich auf der Oberfläche der Kulturlösung ein hauchdünner Mycelschleier, der sich nach weiteren drei Tagen zu einer dünnen, sporenlosen Decke zusammenschloß. Bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten sich sämtliche Kulturen gleich, obwohl bereits zwei Tage nach dem Impfen Sublimatlösungen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt worden waren. Im weiteren Verlauf des Versuchs zeigte sich jedoch eine starke Beeinflussung des Wachstums durch die Giftzugabe. Während sich in den

Kontrollkulturen eine dicke Decke ausbildete, deren zahlreiche Sporen im Verlauf des Versuches auskeimten und ein dünnes, sekundäres Mycel bildeten, starben die Versuchskulturen nach wenigen Tagen ab (bei schwacher Konzentration hielten sie sich einige Tage länger). Die dünnen Decken tauchten unter, ihre Sporen keimten aus und entwickelten sich in der Folge zu ziemlich großen, sporenlosen, sekundären Decken. Nur bei den Kulturen mit dem größten $HgCl_2$-Zusatz ($2{,}4 \cdot 10^{-3}$ molar) keimten die Sporen nicht mehr aus.

Figur 13
Die Wirkung von $HgCl_2$ auf die Lactoflavinbildung
35° C – $4 \cdot 10^{-3}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 % Saccharose
↓ Zugabe von $HgCl_2$
□——□ $2{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol. $HgCl_2$
○——○ $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ mol. $HgCl_2$
△——△ $2{,}4 \cdot 10^{-6}$ mol. $HgCl_2$
●——● $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ mol. $HgCl_2$
◇——◇ 0 mol. $HgCl_2$




Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Lactoflavinbildung ergab folgendes (s. Figur 13): Während der ersten vier Wochen wurde die Lactoflavinbildung durch die Sublimatzugaben gefördert (optimale Konzentration $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ molar). Alle Versuchskulturen, außer derjenigen mit dem größten $HgCl_2$-Zusatz, wiesen in dieser Zeit mehr Lactoflavin auf als die Kontrolle. Erst später stieg auch in der Kontrollkultur der Lactoflavingehalt. Dies kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, daß die Kulturlösung mit der Zeit an $Mg^{++}$ verarmte. Im Gegensatz dazu war der Anstieg in den andern Kulturen gegen Schluß des Versuches geringer als am Anfang, so daß nach weiteren vier Wochen die Kulturlösung der Kontrollkultur und der meisten Versuchskulturen etwa gleichviel Lactoflavin enthielt (starke Streuung der Endwerte). Die Förderung der Lactoflavinbildung beruht zum Teil also bestimmt auf dem Einfluß von $HgCl_2$, zum Teil aber wahrscheinlich auch auf dem Einfluß der an $Mg^{++}$ verarmenden Kulturlösung.

Es zeigte sich, daß in den Kulturen mit großem Sublimatzusatz das Wachstum gegenüber der Kontrolle stark gehemmt worden war (s. Tabelle 16). Der relative Lactoflavingehalt der Versuchskulturen übertraf hier denn auch denjenigen der Kontrolle.

Tabelle 16

Förderung der Lactoflavinbildung durch $HgCl_2$

Versuch 37 $4 \cdot 10^{-3}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 35° C

54. Tag 20 % Saccharose

(Abbruch des Versuchs)

| | $HgCl_2$-Gehalt in Moralitäten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | $2{,}4 \cdot 10^{-7}$ | $2{,}4 \cdot 10^{-6}$ | $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ | $2{,}4 \cdot 10^{-4}$ |
| Trockensubstanz g | 4,39 | 5,46 | 5,54 | 3,81 | 3,16 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | 10,99 | 11,52 | 12,90 | 11,10 | 8,69 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 2,50 | 2,15 | 2,33 | 2,90 | 2,74 |

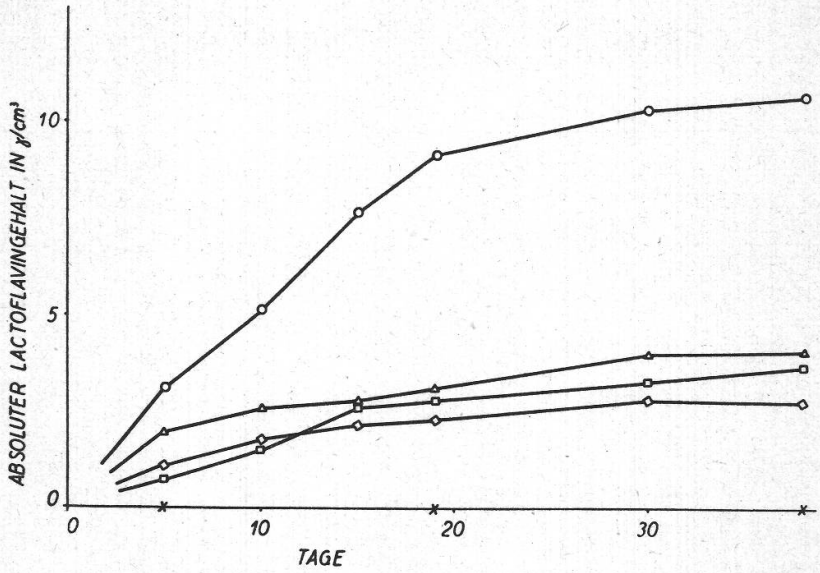
Die Lactoflavinbildung unter dem Einfluß von Sublimat war nicht unbedingt an die Bildung eines sekundären Mycels gebunden. War das Mycel zur Zeit der $HgCl_2$-Zugabe bereits kräftiger entwickelt, so blieb es erhalten und bildete gleich wie die Kontrollkultur Sporen, die aber erst nach einigen Wochen auskeimten. Auch da war der Anstieg in der Lactoflavinbildung bei der Versuchskultur am Anfang größer, während die Kontrolle am Schluß mehr Lactoflavin bildete, so daß der absolute Gehalt dann in beiden Kulturen gleich war. In Trockensubstanz und relativem Lactoflavingehalt unterschieden sich die Kulturen ebenfalls kaum.

## Die Lactoflavinbildung bei verschiedenen Rassen von Aspergillus niger

Es ist eine bekannte Tatsache, daß sich Pilzrassen meistens physiologisch stark unterscheiden; oft sind sogar die physiologischen Verschiedenheiten stärker ausgebildet als die morphologischen. Schon Galli (1946) konnte zeigen, daß die einzelnen Stämme von *Aspergillus niger* in bezug auf Ascorbinsäure- und Zitronensäurebildung stark verschieden sind.

Es zeigte sich nun, daß auch die Lactoflavinbildung einzelner Stämme ungleich war (s. Tabelle 17 und Figur 14). Die fünf bei gleichen Bedingungen (optimalem $Mg^{++}$-Gehalt) untersuchten Stämme ließen sich in drei Gruppen aufteilen, von denen die erste ($A_7$) gar kein Lactoflavin bildete, die zweite ($A_8$) eine ziemlich große Menge und die dritte ($A_2$, $A_3$, $A_5$) eine mittlere lieferte. Es ist bemerkenswert, daß Galli in bezug auf Ascorbinsäure diese Stämme in die drei gleichen Gruppen aufteilen konnte: der größte Säuregehalt fand sich bei der ersten, der kleinste bei der dritten, ein mittlerer bei der zweiten Gruppe. Das Wachstum der verschiedenen Stämme war ähnlich (s. Tabelle 17).

Die selben Stämme wurden nun auch bei andern $Mg^{++}$-Konzentrationen der Nährlösung untersucht, um die für die Lactoflavinbildung




Figur 14
Der zeitliche Verlauf der Lactoflavinbildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger*
Impfgut auf Bierwürzeagar kultiviert
30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose
△——△ $A_2$ ×——× $A_7$
□——□ $A_3$ ○——○ $A_8$
◇——◇ $A_5$

optimale $Mg^{++}$-Konzentration zu bestimmen. Dabei zeigte es sich, daß Stamm $A_7$ durch keine der verwendeten Nährlösungen zur Lactoflavinbildung angeregt werden konnte. Für Stamm $A_8$ ergab sich (s. Tabelle 18), daß der absolute Lactoflavingehalt am größten war, wenn die Nährlösung kein $Mg^{++}$ enthielt. Aus der Tabelle geht außerdem hervor, daß mit abnehmender $Mg^{++}$-Konzentration auch die Trockensubstanz zunimmt. Es ist der einzige Stamm, bei dem dies gefunden wurde, und es läßt sich keine Erklärung dafür angeben. Die dritte Gruppe mit den

Tabelle 17
Wachstum und Lactoflavinbildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger*
16. Versuch $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
38. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuchs)

| Gruppe | I | II | III | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Stamm | $A_7$ | $A_8$ | $A_2$ | $A_3$ | $A_5$ |
| Trockensubstanz g | 0,9 | 0,91 | 1,05 | 0,81 | 1,00 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | 0 | 10,66 | 4,08 | 3,69 | 2,74 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 0 | 12,10 | 3,74 | 4,45 | 2,60 |

Tabelle 18

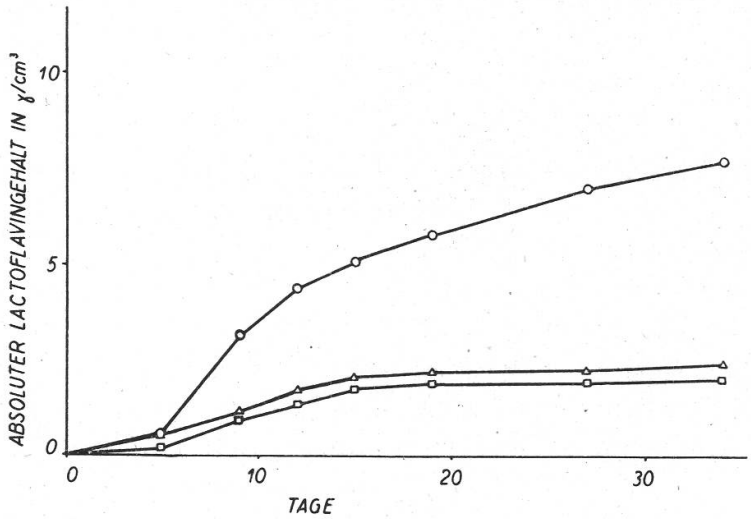
Stamm $A_8$ bei verschiedenen Konzentrationen an Magnesium-Ionen

17. Versuch Stamm $A_8$ 5 % Saccharose T = 25° C

| | $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ in Molaritäten | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | $4 \cdot 10^{-5}$ | $4 \cdot 10^{-4}$ | $4 \cdot 10^{-3}$ |
| Trockengewicht g | 1,02 | 1,01 | 0,83 | 0,67 |
| Absoluter Lactoflavingehalt $\gamma/cm^3$ | 13,2 | 9,1 | 3,1 | 2,5 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 12,9 | 9,1 | 3,8 | 3,7 |

Stämmen $A_2$, $A_3$, $A_5$ hatte ihr Optimum bei Konzentrationen von etwa $10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Eine deutliche Veränderung gewisser Rasseneigenschaften trat jedoch ein, wenn zur Herstellung des *Nährbodens für das Impfgut* an Stelle von *Bierwürze Biomalzagar* verwendet wurde (s. Tabelle 19 und Figur 15). Allerdings bildete auch jetzt Stamm $A_8$ am meisten, $A_7$ am




Figur 15

Der zeitliche Verlauf der Lactoflavinbildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger*

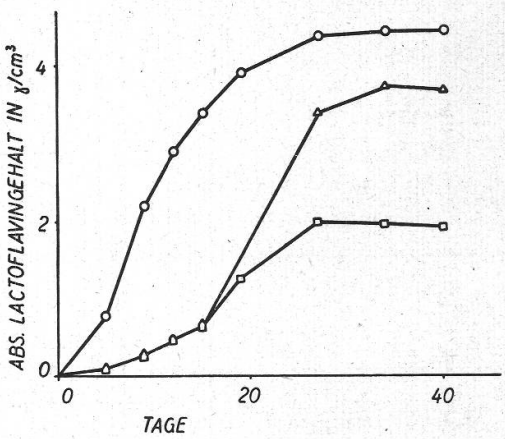
Impfgut auf Biomalzagar kultiviert

30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose

△——△ $A_2$
□——□ $A_7$
○——○ $A_8$

wenigsten Lactoflavin; daß aber $A_7$ meßbare Lactoflavinmengen bildet, war bisher nicht beobachtet worden. Beim Stamm $A_2$ verschob sich das Optimum für die Lactoflavinbildung von $4 \cdot 10^{-5}$ nach der bedeutend niedrigeren Konzentration von $4 \cdot 10^{-7}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen zeigte sich bei $A_8$ eine sehr starke Lactoflavinproduktion in einer Lösung mit hohem Gehalt an $Mg^{++}$ (s. Figur 16). Dies war besonders interessant, weil die Lactoflavinbildung schon zu Beginn des Versuches intensiv einsetzte; auch $A_7$ und $A_2$ bildeten bei diesen Bedingungen Lactoflavin, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt, wenn vermutlich die Nährlösung schon einen $Mg^{++}$-Mangel aufwies. Stamm $A_7$ behielt die Fähigkeit zur Lactoflavinbildung

Figur 16
Die Lactoflavinbildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger*
Nährlösung mit normalem Mg-Gehalt
30° C – $4 \cdot 10^{-3}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5 % Saccharose
△——△ $A_2$ □——□ $A_7$ ○——○ $A_8$




bei, wenn das Impfgut in der Folge wieder auf Bierwürzeagar zur Entwicklung gebracht wurde [1] (s. Tabelle 20).

Da Stamm $A_7$ im Gegensatz zu den Stämmen $A_2$ und $A_8$ ein intensiv grünlich fluoreszierendes Mycel aufwies, welches auf Lactoflavin hinzudeuten schien, wurden die Decken dieser Kulturen auf ihren Lactoflavingehalt geprüft. Das Ergebnis zeigte jedoch, daß die Fluoreszenz des Mycels nicht von Lactoflavin herrührte. Die Unterschiede im Lactoflavingehalt der Mycelextrakte waren relativ gering.

Tabelle 19
Verhalten verschiedener Stämme von *Aspergillus niger* bei Variierung der Konzentration an Magnesium-Ionen

Versuch 30 5 % Saccharose T = 30° C
40. Tag
(Abbruch des Versuchs) Impfgut auf Biomalz-Agar

| | | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in Molaritäten | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $4 \cdot 10^{-7}$ | $4 \cdot 10^{-5}$ | $4 \cdot 10^{-3}$ |
| $A_2$ | Trockensubstanz g | 0,92 | 1,03 | 1,32 |
| | Absoluter Lactoflavingehalt γ/cm³ | 7,88 | 2,47 | 3,17 |
| | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 8,56 | 2,39 | 2,80 |
| $A_7$ | Trockensubstanz g | 1,27 | 0,87 | 1,09 |
| | Absoluter Lactoflavingehalt γ/cm³ | 1,99 | 2,18 | 1,94 |
| | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 1,56 | 2,51 | 1,78 |
| $A_8$ | Trockensubstanz g | 0,75 | 1,01 | 0,62 |
| | Absoluter Lactoflavingehalt γ/cm³ | 6,31 | 7,92 | 4,45 |
| | Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ | 8,46 | 7,83 | 7,23 |

[1] Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen handelte es sich in der Folge immer um helle anstatt um die bisher verwendete dunkle Bierwürze.

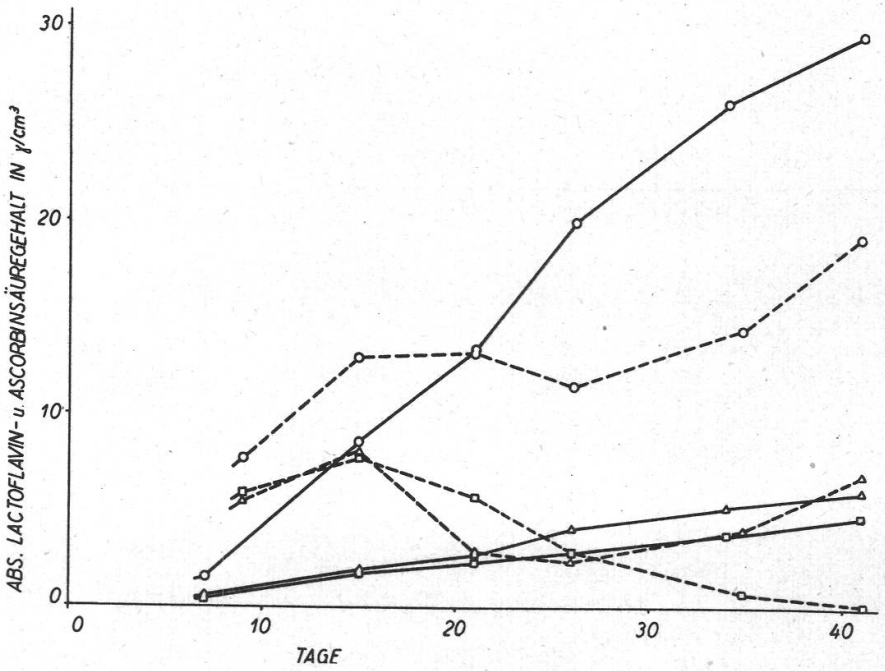
Tabelle 20

Lactoflavingehalt des Mycels und der Kulturlösung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger*

Versuch 36 $4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ T = 30° C
30. Tag 5 % Saccharose
(Abbruch des Versuches)
Nährboden des Impfgutes = helle Bierwürze

| | Stamm | | |
|---|---|---|---|
| | $A_2$ | $A_7$ | $A_8$ |
| Lactoflavingehalt des Mycels (mg) | 0,027 | 0,060 | 0,050 |
| Lactoflavingehalt der Kulturlösung (mg) | 1,160 | 0,500 | 1,340 |
| Gesamter Lactoflavingehalt (mg) | 1,187 | 0,560 | 1,390 |
| Trockensubstanz (g) | 0,74 | 0,92 | 0,72 |
| Relativer Lactoflavingehalt (mg/g) | 1,61 | 0,61 | 1,93 |

Bei den Stämmen $A_2$, $A_7$ und $A_8$ wurden *sowohl die Lactoflavin- als auch die Ascorbinsäurebildung* unter zwei verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Bestimmung der Ascorbinsäure erfolgte durch Titration mit Dichlorphenolindophenol (Tillmans Reagens). Im ersten Fall handelte es sich um Bedingungen, die sich bei Stamm $A_2$ für die Lac-




Figur 17

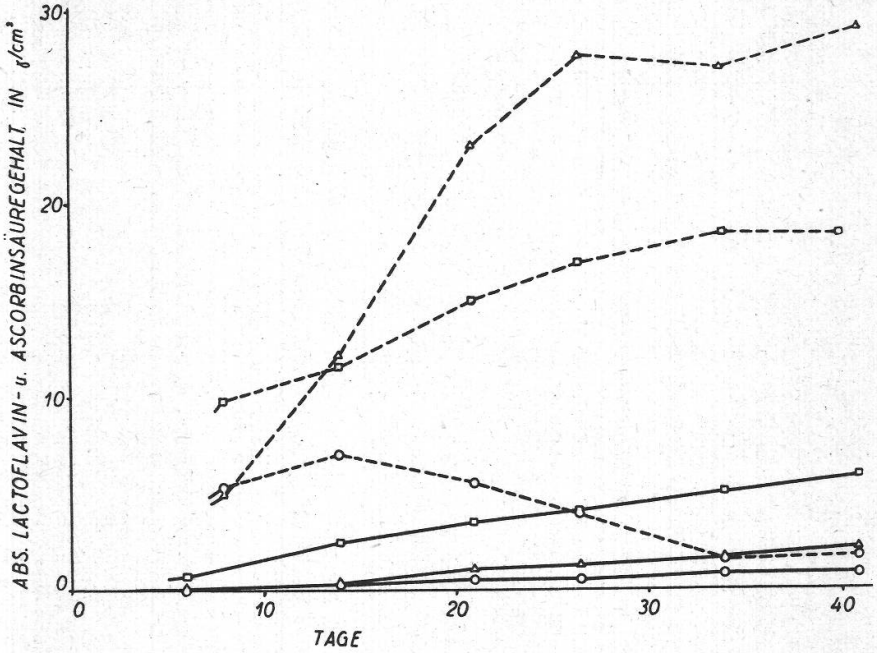
Lactoflavin- und Ascorbinsäurebildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger* bei optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung

30° C – $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 % Saccharose – $pH = 5{,}1$

—— Lactoflavinbildung ○——○ $A_2$
----- Ascorbinsäurebildung △——△ $A_7$
□——□ $A_8$

toflavinbildung als günstig erwiesen hatten ($4 \cdot 10^{-5}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 % Saccharose, $p$H = 5,1). Im zweiten Fall lagen Versuchsbedingungen vor, die nach G a l l i (1946) fördernd auf die Ascorbinsäurebildung wirkten ($10^{-3}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 % Saccharose, $pH$ = 2—2,2). Die Kulturbedingungen unterschieden sich also nur im $p$H und im $Mg^{++}$-Gehalt der Nährlösung.

Im ersten Fall (Versuch 38 *a*) bildete Stamm $A_2$ weitaus am meisten Lactoflavin (s. Figur 17 und Tabelle 21). Bei den andern Stämmen zeigte die hohe Zuckerkonzentration nicht dieselbe fördernde Wirkung




Figur 18

Lactoflavin- und Ascorbinsäurebildung bei verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger* bei optimalen Bedingungen für die Ascorbinsäurebildung

30° C – $10^{-3}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20 % Saccharose – $p$H = 2 bis 2,2

——— Lactoflavinbildung ○——○ $A_2$

----- Ascorbinsäurebildung △——△ $A_7$

□——□ $A_8$

wie bei $A_2$ (vgl. dazu Seite 300 ff.). Auch Ascorbinsäure wurde unter diesen Bedingungen von $A_2$ am meisten gebildet, während, wie bei Lactoflavin, Stamm $A_8$ am wenigsten und $A_7$ eine mittlere Ascorbinsäuremenge produzierte. Bei allen Stämmen nahm der Ascorbinsäuregehalt in der Lösung wieder ab. Dies beruht vermutlich auf Oxydation durch Luftsauerstoff (G a l l i, 1946). In den Kulturlösungen von $A_2$ und $A_7$ zeigte sich gegen Schluß des Versuchs eine erneute Zunahme von Ascorbinsäure. Vielleicht konnte der Pilz in diesen Fällen die Ascorbinsäure aus deren Abbauprodukten wieder aufbauen. G a l l i zeigte in ihrer Arbeit, daß *Aspergillus niger* zu dieser Synthese fähig ist.

In Versuch 38 *b* zeigte Stamm $A_8$ die intensivste Lactoflavinbildung; die andern Stämme bildeten davon sehr viel weniger. Die Ascorbinsäurebildung verhielt sich ganz ähnlich, wie G a l l i für diese Bedingungen beobachtet hatte: $A_7$ bildete am meisten, $A_2$ am wenigsten Ascorbinsäure. Die Bildung verlief jedoch wesentlich langsamer und, im Gegensatz zu den Beobachtungen von G a l l i , nahm der Gehalt nicht in allen Kulturen wieder ab (s. Figur 18).

Tabelle 21

Maxima des Lactoflavin- und Ascorbinsäuregehaltes bei drei Stämmen von *Aspergillus niger*

Versuche 38 *a* und *b* Abbruch des Versuchs am 41. Tag (von diesem Tag auch die Werte für den Lactoflavingehalt)

T = 30° C

| | Fördernde Bedingungen für Lactoflavinbildung $4 \cdot 10^{-5}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. 20 % Saccharose *p*H = 5,1 | | | Fördernde Bedingungen für Ascorbinsäurebildung $10^{-3}$ mol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 % Saccharose *p*H = 2 bis 2,2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Stamm | $A_2$ | $A_7$ | $A_8$ | $A_2$ | $A_7$ | $A_8$ |
| Absoluter Lactoflavingeh. $\gamma/cm^3$ (Max.) | 29,4 | 5,99 | 4,63 | 0,77 | 1.97 | 5,84 |
| Trockensubstanz g ..... | 2,92 | 3,65 | 1,83 | 1,84 | 5,78 | 2,39 |
| Relativer Lactoflavingehalt $\frac{\gamma/cm^3}{g}$ ..... | 10,1 | 1,64 | 2,53 | 0,40 | 0,34 | 2,44 |
| Absol. Ascorbinsäuregehalt $\gamma/cm^3$ (Max.) | 19,0 | 8,2 | 7,79 | 7,0 | 28,9 | 18,3 |
| Tag der Ascorbinsäurebestimmung .... | 41 | 15 | 15 | 14 | 41 | 41 |

## Zusammenfassung


1. *Aspergillus niger* wurde in $Mg^{++}$-armer Nährlösung kultiviert und darin zur Bildung eines Farbstoffs angeregt, der mit verschiedenen charakteristischen Methoden als Lactoflavin erkannt wurde.
2. Es wurde eine Methode ausgearbeitet zur quantitativen, fluorimetrischen Bestimmung des Lactoflavins direkt aus der Kulturlösung, wobei 1/2 bis 1 $cm^3$ Lösung für eine Analyse genügen.
3. Es wurden folgende Einflüsse auf die Lactoflavinbildung durch *Aspergillus niger* untersucht: $Mg^{++}$-Konzentration, Temperatur, Wachstum des Pilzes, N-Quelle, C-Quelle, anaerobe Bedingungen, Vergiftung mit HCN, Monojodessigsäure, $HgCl_2$, Rassenunterschiede, Veränderung in der Aufzucht des Impfgutes.
4. Niedrige $Mg^{++}$-Konzentrationen wirken fördernd auf die Lactoflavinbildung, hemmend auf das Wachstum von *Aspergillus niger*.
5. Die Lactoflavinbildung ist an das Wachstum des Pilzes gebunden.
6. Je höher die Temperatur, desto rascher sind Wachstum und Lactoflavinbildung beendigt, und um so geringer ist am Schluß des Versuches der Lactoflavingehalt der Kulturlösung.

7. Die Temperatur hat keinen Einfluß auf die Wirkung niedriger $Mg^{++}$-Konzentrationen: die optimale $Mg^{++}$-Konzentration ist bei allen Temperaturen dieselbe.
8. $NO_3^-$ und $NH_4^+$ haben eine entgegengesetzte Wirkung: durch $NO_3^-$ wird das Wachstum gehemmt, die Lactoflavinbildung gefördert; $NH_4^+$ wirkt im umgekehrten Sinn.
9. Eine Erhöhung der Saccharosekonzentration hat Förderung des Wachstums zur Folge. Die optimale Konzentration liegt bei 24 %. Für die Lactoflavinbildung liegt das Optimum am Anfang des Versuchs bei derselben Konzentration, verschiebt sich aber gegen Schluß nach einer tiefern Konzentration (16 %).
10. C-Quellen, welche das Wachstum fördern, hemmen die Lactoflavinbildung: zum Beispiel Fruktose, Laktose; C-Quellen, welche für das Wachstum nicht so günstig sind, fördern die Lactoflavinbildung: Saccharose, Maltose, Glukose, Arabinose, Glycerin. Eine mittlere Förderung von Wachstum und Lactoflavinbildung findet sich bei Galaktose und Stärke.
11. Anaerobe Bedingungen und Einleitung von $CO_2$ bewirken einen Unterbruch im Wachstum und damit ein Aufhören der Lactoflavinbildung.
12. HCN- und Monojodessigsäurezusatz haben in höhern Konzentrationen ebenfalls einen Wachstumsunterbruch und Aufhören der Lactoflavinbildung zur Folge.
13. $HgCl_2$-Zugabe wirkt fördernd auf die Lactoflavinbildung: in gewissen Versuchen wurde das Lactoflavin durch sekundäres Mycel gebildet, in andern durch primäres.
14. Ein Vergleich von fünf Rassen von *Aspergillus niger* zeigt, daß sich in bezug auf die Lactoflavinbildung die drei gleichen Gruppen bilden lassen, die Galli (1946) schon auf Grund der Ascorbinsäurebildung aufgestellt hatte; die Bildung der beiden Vitamine verläuft bei den drei Gruppen nicht gleichsinnig, die Vitamine vertreten sich aber auch nicht gegenseitig.
15. Durch Verwendung eines andern Nährsubstrates für das Impfgut werden gewisse Eigenschaften des ausgewachsenen Pilzes verändert.
16. Der Pilz ist imstande, gleichzeitig Lactoflavin und Ascorbinsäure zu synthetisieren.

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* ausgeführt. Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber, unter dessen Leitung die Arbeit entstand, herzlich danken für die Zuteilung des Themas, seine wertvollen Anregungen und die großzügige Überlassung der Mittel des Instituts. Auch allen andern, die mir mit guten Ratschlägen geholfen haben, vor allem Herrn Dr. H. Huber, sei hier gedankt.

## Zitierte Literatur


Abderhalden, E., und Mouriquand, G., 1948. Vitamine und Vitaminthera-pie. Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern.

Carpenter, C. C., und Friedländer, E., 1942. Occurrence of Vitamins in *Fungi*. Science, **95,** 625.

Fontaine, M., und Raffy, A., 1940. Le vitamine $B_2$ (Définitions, propriétés physiques et biologiques). Act. sci. et ind., Hermann & Cie., Paris.

Frear, D., 1947. Catalogue of Insecticides and Fungicides, **2,** 33.

Freundlich, H., 1926. Adsorption and its Significance. Colloid Chemistry, **1,** 575, Chem. Catalogue Comp.

Galli, A., 1946. Über die Bildung der Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*. Ber. d. Schweiz. Bot. Ges., **56,** 113 (Diss. Basel).

Gstirner, F., 1951. Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden. F. Emke, Stuttgart.

György, P., 1950. Vitamin Methods, **I,** Acad. Press. Inc. Publ., New York.

Hodson, A. Z., und Norris, L. C., 1939. A Fluorimetric Method for Determining the Riboflavincontent of Foodstuffs. J. Biol. Chem., **131,** 621.

Karrer, P., und Schöpp, K., 1934. Isolierung des Lyochroms aus Eigelb. Helv. Chim. Acta, **17,** 771.

— Salomon, A., und Schöpp, K., 1934. Über die Bildung von Lumichrom und Lumiflavin. Helv. Chim. Acta, **17,** 1010.

Kavanagh, F., 1941. A New Photoelectric Fluorimeter and some Applications. J. Ind. and Eng. Chem. Analytical Ed., **13,** 108.

Kitavin, G. S., 1939. Die Gewinnung von kristallinem Riboflavin durch Einwirkung von Hg-Salzen auf *Aspergillus niger*. C. R. de l'Acad. des sciences de l'URSS, **28,** Nr. 6, 517.

Knobloch, H., und Sellmann, R., 1940/41. Notiz über die Bildung eines flavinartigen Farbstoffs in der Kulturflüssigkeit von *Aspergillus niger*. Zentralblatt für Bakteriologie, 2. Abt., **103,** 277.

Koschara, W., und Ellinger, P., 1933. Über eine neue Gruppe tierischer Farbstoffe. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **66,** 1933.

Kuhn, R., György, P., und Wagner-Jauregg, T., 1933. Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **66,** 317.

— — — 1933. Über Ovoflavin, den Farbstoff des Eiklars. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **66,** 576.

— — — 1933. Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **66,** 1034.

— und Moruzzi, G., 1934. Über die Dissoziationskonstanten der Flavine. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **67,** 888.

— Desnuelle, P., Weygand, Fr., und Kaltschmitt, 1934. Über die Verbreitung der Flavine im Pflanzenreich. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **67,** 1452.

Lavollay, J., und Laborey, F., 1937. Sur l'expression mathématique du développement d'*Aspergillus niger* en fonction de la concentration en Mg du milieu nutritif. C. R. Hebd. Sci., **204,** 1686.

— — 1938. Sur les circonstances d'apparition de pigments jaunes dans le liquide de culture d'*Aspergillus niger*. C. R. Hebd. Sci., **206,** 1055.

— — 1939. Caractérisation de la lactoflavine produite par *Aspergillus niger* v. Tgh. partiellement carencée en Mg. C. R. Hebd. Sci., **208,** 1055.

Warburg, O., 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Julius Springer, Berlin.

Wenig, K., und Kubista, 1949. The Presence of Vitamin $B_2$ in the Luminous Material of the Earthworm (Determination of the Vitamin). Exper., **5,** Fasc. 2, 73.