

Die Zusammensetzung des «Eiweiß» von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle.

Von

Emil Abderhalden und Peter Rona.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. August 1905.)

Es ist schon wiederholt die Frage aufgeworfen worden, ob das «Körpereiß» durch äußere Einflüsse, wie Hunger etc., so beeinflusst werden könne, daß es seine Zusammensetzung ändert, d. h. mit anderen Worten, es ist die Möglichkeit erwogen worden, ob das Eiweißmolekül unter bestimmten Bedingungen gewisse Gruppen oder auch einzelne seiner Bausteine abgeben kann, ohne daß das gesamte Molekül völlig zerfällt. Die Möglichkeit eines derartigen partiellen Abbaues ist a priori besonders im Hinblick auf die von dem einen von uns in Gemeinschaft mit Béla Reinbold¹⁾ ausgeführten Untersuchungen wohl zuzugeben. Andererseits muß hervorgehoben werden, daß ein einwandfreier Beweis eines solchen nur einzelne Aminosäuren betreffenden Abbaues bis jetzt nicht erbracht ist. Gegen alle Schlußfolgerungen dieser Art ist stets einzuwerfen, daß eine Verarmung eines Organes an bestimmten Aminosäuren ihre Erklärung darin findet, daß von den verschiedenen Eiweißarten eines Organes gerade diejenigen abgebaut worden sind, welche die betreffenden Aminosäuren in besonders reichlichem Maße enthalten hatten. Erst wenn es gelingt, aus bestimmten Organen wohl charakterisierte Eiweißarten zu isolieren und dann deren Verhalten unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen, wird man die Frage, ob tatsächlich ein partieller Eiweißabbau in den Geweben statthat, einwandfrei entscheiden können.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 284, 1905, und Bd. LXVI, S. 159, 1905.

Bei der vorliegenden Untersuchung hat uns die Frage beschäftigt, ob es möglich ist, die Eiweißbildung von Pilzen dadurch zu beeinflussen, daß die Stickstoffquelle verschieden gewählt wird. Bestimmte Aminosäuren lassen sich quantitativ bestimmen, so das Tyrosin und die Glutaminsäure. Diese beiden hatten wir auch gewählt, um in die Zusammensetzung der Eiweißsubstanzen einen Einblick zu erhalten. Leider stellten sich der Bestimmung dieser Aminosäuren unüberwindliche Schwierigkeiten entgegen. Tyrosin bildete der zur Kultur verwendete Pilz *Aspergillus niger* überhaupt nicht. Die Abscheidung der Glutaminsäure als Chlorhydrat aus der Hydrolysenflüssigkeit war wegen der kleinen Mengen gegenüber den großen Salzmassen und den übrigen organischen Substanzen unmöglich. Wir mußten uns deshalb begnügen, mit Hilfe der Estermethode mehr qualitativ die einzelnen Aminosäuren zu bestimmen. Die auffallende Übereinstimmung der Mengen der einzelnen isolierten Aminosäuren bei den drei verschiedenen Kulturen macht es sehr wahrscheinlich, daß *Aspergillus niger* stets dieselben Eiweißsubstanzen gebildet hat, und somit die Eiweißbildung durch die Art der Stickstoffquelle sich nicht beeinflussen läßt.

Die nachfolgenden Versuche sind mit *Aspergillus niger* ausgeführt worden. Als allgemeine Nährlösung verwandten wir die von F. Czapek¹⁾ angegebene: 1000 g destilliertes Wasser, 0,5 g Magnesiumsulfat, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g Kaliumchlorid, 0,01 g Ferrosulfat und 3% Rohrzucker. Zu dieser Lösung kam nun als Stickstoffquelle: 1. 1% Kaliumnitrat. 2. 1% Glycocoll. 3. 1% Glutaminsäure. Das verwendete Glycocoll war teils von Kahlbaum bezogen, teils aus Seide und Leim gewonnen. Die Glutaminsäure isolierten wir als Chlorhydrat aus dem Gliadin. Zur Darstellung der freien Säure wurde das Chlorhydrat in Wasser gelöst, die Lösung durch Kochen mit Tierkohle entfärbt, dann die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht, und nun in einem aliquoten Teil der Gehalt an Salzsäure titrimetrisch bestimmt. Nun wurde zur gesamten

¹⁾ F. Czapek, Untersuchungen über Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 542, 1902.

Flüssigkeit die berechnete Menge von zehnfach Normalnatronlauge gesetzt und durch fraktionierte Kristallisation die freie Glutaminsäure gewonnen.

Die Kulturen setzten wir in mit Wattepfropfen abgeschlossenen Erlenmeyer-Kolben an, nachdem die Nährlösung durch wiederholtes langes Aufkochen zuvor sterilisiert worden war. Nach 2 – 3 tägigem Verweilen im Brutraum erschienen bei allen drei Kulturen die ersten zarten Rasen, die innerhalb einer Woche zu einer die ganze Oberfläche bedeckenden dichten Decke zusammenflossen. In einzelnen Fällen erfolgte kein Wachstum. Es ist uns nicht gelungen, die Ursache dieses Mißerfolges genügend exakt aufzuklären. Wir vermuten, daß in diesen Fällen die Sterilisation keine genügende war. In einigen Fällen genügte eine Erneuerung der Pilzkulturen, um das Wachstum anzuregen.

Zeigten sich somit alle drei Nährböden für geeignet, so ergaben sich doch, je nach der Art der Stickstoffquelle, bestimmte Unterschiede im Wachstum. Auf dem Glycocoll wuchs der Pilz am besten. Auf 1 g Glycocoll kam etwa 1 g Pilztrockensubstanz. Das Mycel war dick, hornartig, oft gelblich gefärbt und stark gewulstet, während auf der Glutaminsäure- und dem Kaliumnitrat-Nährboden das Mycel dünner und glatt blieb. Die Ausbeuten an Pilz waren auch geringer (etwa $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ g Pilztrockenrückstand auf 1 g Glutaminsäure resp. 1 g Kaliumnitrat). Genauere Bestimmungen haben wir nicht ausgeführt, weil verschiedene Umstände diese Unterschiede bedingen konnten. Vor allem hätte auch der verschiedene Stickstoffgehalt der einzelnen Nährlösungen in Betracht gezogen werden müssen.

Nach 7—10 Tagen wurden jeweils die Pilzrasen entfernt, sehr gründlich mit destilliertem Wasser abgewaschen, im Trockenschrank bei 100° getrocknet, dann zerkleinert und je einen Tag mit Alkohol und dann im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die so vorbereitete Pilzmasse wurde nun an der Luft und dann zwei Stunden bei 100° getrocknet und nach genauer Wägung in einem aliquoten Teil der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die mehrfach ausgeführten Bestimmungen gaben wenig abweichende Zahlen:

1. Nitratpilz:	3,68% N
2. Glycocollpilz:	3,85% ..
3. Glutaminsäurepilz:	3,52% ...

1. Hydrolyse der Nitratpilze.

500 g *Aspergillus niger* wurden mit der 10fachen Menge 25%iger Schwefelsäure 16 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann unter Zusatz von Tierkohle noch eine Stunde weiter erhitzt, filtriert und im Filtrat nach wiederholtem Auskochen der ungelösten Massen und der Tierkohle und Vereinigung dieser Auszüge mit diesem die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt gefällt. Der scharf abgepreßte Niederschlag wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht, die vereinigten Flüssigkeiten auf dem Wasserbade stark eingeeengt, dann genau das Volumen bestimmt, und nun in einem aliquoten Teile der Trockenrückstand und der Aschegehalt bestimmt. Ersterer betrug 222,6 g, letzterer 7,2%. Die Flüssigkeit gab keine Millonsche Reaktion. Während des Einengens schieden sich fortwährend aus der zuerst ganz hellgelben Flüssigkeit dunkelbraune Massen aus. Die Flüssigkeit selbst färbte sich mehr und mehr dunkel. Eine kristallinische Ausscheidung erfolgte nicht. Auch die im Vacuum auf 200 ccm konzentrierte Lösung gab keine Spur einer Millonschen Reaktion. Zur Abscheidung der Glutaminsäure wurde in die stark eingeeengte Lösung, die schon sehr zähflüssig war, gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Es erfolgte Abscheidung anorganischer Salze. Glutaminsäurechlorhydrat so zu gewinnen, war bei dem reichlichen Gehalt der Flüssigkeit an Salzen und organischer Substanz ganz aussichtslos. Wir beschlossen deshalb nach vielen vergeblichen Versuchen, die Veresterungsmethode anzuwenden. Die Ausführung war die übliche. Um die Ester in Freiheit zu setzen, standen uns zwei Methoden zur Verfügung. Wir wählten die alte, d. h. die Befreiung der Ester mit Alkali und Kaliumcarbonat. Die andere Methode, die Ester durch die berechnete Menge Natriumäthylat zu befreien, war hier nicht angebracht, weil wir sonst einen großen Teil der Salze und der gesamten organischen Substanz der Pilze mit in Lösung

bekommen hätten. Mit Hilfe der ersteren Methode hingegen erhielten wir durch Ausschütteln mit Äther außer den Aminosäureestern nur wenig andere Verbindungen. Der Äther wurde wie üblich abdestilliert, und die Ester fraktioniert destilliert.

I. Fraktion	bis 100°	des Wasserbades	und 15 mm Druck	= 35 g
II. »	» 105°	» Ölbad	» 0,3 »	= 20 »
III. »	105 » 180°	» »	» 0,3 »	= 10 »

Die Verarbeitung der einzelnen Fraktionen erfolgte in der bekannten Weise.

Aus Fraktion I konnte neben Alanin Glycocoll als Esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° (korr.) abgeschieden werden.

Das Alanin gab folgende Analysenzahlen:

0,1771 g Substanz gaben	0,2612 g CO ₂	und	0,1231 g H ₂ O
Berechnet für C ₃ H ₇ NO ₂ :		Gefunden:	
40,45% C und 7,87% H.		40,23% C und 7,72% H.	

Aus Fraktion II wurde Leucin gewonnen. Es zersetzte sich gegen 297° (korr.).

0,1650 g Substanz gaben	0,3313 g CO ₂	und	0,1500 g H ₂ O
Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :		Gefunden:	
54,96% C und 9,92% H.		54,76% C und 10,1% H.	

α-Pyrrolidincarbonensäure schien nicht vorhanden zu sein, wenigstens gelang es nicht, durch Auskochen der 2. Fraktion mit absolutem Alkohol etwas in Lösung zu bringen. Auch wurde der so charakteristische Pyrrolidingeruch nicht wahrgenommen.

In der 3. Fraktion wurde zunächst auf Phenylalanin gefahndet, jedoch ohne Erfolg, dagegen konnten Glutaminsäure und Asparaginsäure nachgewiesen werden. Estere war als Chlorhydrat isoliert worden. Die freie Säure wurde durch Kochen mit Bleioxyd dargestellt.

0,1741 g Substanz gaben	0,1030 g H ₂ O	und	0,2595 g CO ₂
Berechnet für C ₅ H ₉ NO ₄ :		Gefunden:	
40,81% C und 6,12% H.		40,65% C und 6,57% H.	

Die beiden niederen Fraktionen enthielten Spuren von intensiv riechenden Produkten, die sich leicht durch Kristallisieren aus Wasser entfernen ließen. Was die Mengen der isolierten Produkte anbetrifft, so wurden von Glycocoll nur

Spuren aufgefunden, von Alanin 0,5 g, von Leucin 1,0 g, von Glutaminsäure 0,5 g und von Asparaginsäure 0,08 g.

2. Hydrolyse der Glycocollpilze.

Verwendet wurden 550 g Pilze. Die Verarbeitung war ganz genau dieselbe, wie bei den vorigen Pilzen. Der gesamte Trockenrückstand nach der Hydrolyse und Entfernung der unlöslichen Produkte betrug 237,2 g, der Aschegehalt 6,9%. Die von der Schwefelsäure befreite Flüssigkeit gab deutliche Rotfärbung mit Millons Reagens. Beim Einengen der Lösung färbte sie sich mehr und mehr dunkel unter Ausscheidung brauner Krusten. Zu gleicher Zeit nahm die Millonsche Reaktion mehr und mehr ab und schließlich verschwand sie ganz. Wir versuchten auf mannigfache Art, etwa vorhandenes Tyrosin zu isolieren. Wir konnten jedoch keine Spur auffinden. Auch hier gelang es nicht, Glutaminsäure als Chlorhydrat zur Abscheidung zu bringen. Wir veresterten deshalb auch hier. Die einzelnen Fraktionen wurden wie folgt abgegrenzt.

Fraktion I	bis 100° des Wasserbades und 15 mm Druck	= 38,0 g
II	105° Ölbad	= 19,0
III	105° 180°	= 13,0

Aus Fraktion I wurden gewonnen: 0,8 g Glycocoll-esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144°, ferner 0,25 g Alanin.

0.2012 g Substanz gaben 0.2973 g CO ₂ und 0.1411 g H ₂ O	
Berechnet für C ₃ H ₇ NO ₂ :	Gefunden:
40,45% C und 7,87% H.	40,29% C und 7,79% H.

Fraktion II enthielt 0,26 g Alanin und 1,2 g Leucin.

0.1727 g Substanz gaben 0.3471 g CO ₂ und 0.1580 g H ₂ O	
Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H.	54,81% C und 10,16% H.

α -Prolin war nicht vorhanden.

α -Aminovaleriansäure dürfte höchst wahrscheinlich vorhanden gewesen sein, wenigstens stimmen die Analysenzahlen einiger Kristallfraktionen mit Werten der Aminovaleriansäure überein, andererseits müssen wir immer wieder darauf hinweisen, daß Analysenzahlen allein zur Identifizierung von

in geringer Menge vorhanden sind. Quantitative Bestimmungen konnten leider bei keinem einzigen Abbauprodukte aus den schon oben erörterten Gründen durchgeführt werden. Die Hauptfrage, ob der Pilz sein Eiweiß ganz unabhängig von der Art der Stickstoffquelle bildet, ist nicht exakt entschieden. Die vorliegenden Beobachtungen sprechen allerdings sehr dafür. Eine exakte Entscheidung wäre auch nur dann möglich, wenn es gelänge, aus den Pilzen eine bestimmte Eiweißart zu isolieren. Ungleichheiten in der Zusammensetzung des gesamten Pilzeiweißes könnten auch durch verschiedene Mengenverhältnisse der verschiedenen Eiweißarten bedingt sein, denn vorläufig haben wir kein Recht zu der Annahme, daß die Pilze nur einen einzigen Eiweißkörper besitzen. An diese Versuche knüpfen sich noch mancherlei Fragestellungen in bezug auf die Kohlehydrat- und Fettbildung. Wir hoffen in Bälde unsere Beobachtungen nach dieser Richtung erweitern zu können.
