

Über Oxydation durch Schimmelpilze.

Vorläufige Mitteilung.

Von

R. O. Herzog und **A. Meier.**

Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem chemischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1908.)

Pasteurs¹⁾ bekannte biologische Methode der Spaltung von Racematen und inaktiven Gemischen optisch aktiver Antipoden in die aktiven Formen mit Hilfe von Schimmelpilzen ist zwar von Fitz,²⁾ Lewkowitsch,³⁾ Bertrand,⁴⁾ Harden⁵⁾ u. a. in verschiedener Weise angewandt worden, aber eine genauere Erkenntnis des Vorganges sowohl nach der chemischen wie nach der physiologischen Seite fehlt noch.⁶⁾ Wohl ist z. B. von Harden⁷⁾ die Vermutung ausgesprochen worden, daß es sich um eine Enzymwirkung handle, auch gewisse tierphysiologische Versuche sprechen dafür, aber der Nachweis ist

¹⁾ Comptes rend. de l'Acad., Bd. XLVI, S. 615; Bd. LI, S. 298.

²⁾ Berl. Ber., Bd. IX, S. 1348; Bd. X, S. 276; Bd. XI, S. 42; Bd. XII, S. 474; Bd. XIII, S. 1309.

³⁾ Berl. Ber., Bd. XV, S. 1505; Bd. XVI, II., S. 1568; Bd. XVI, III., S. 2721.

⁴⁾ Bull. Soc. chim., Bd. XIX, S. 347, 947, 999.

⁵⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. LXXXIII, S. 424.

⁶⁾ Vgl. dazu Werner, Stereochemie, S. 63.

⁷⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. LXXXIII, S. 424.

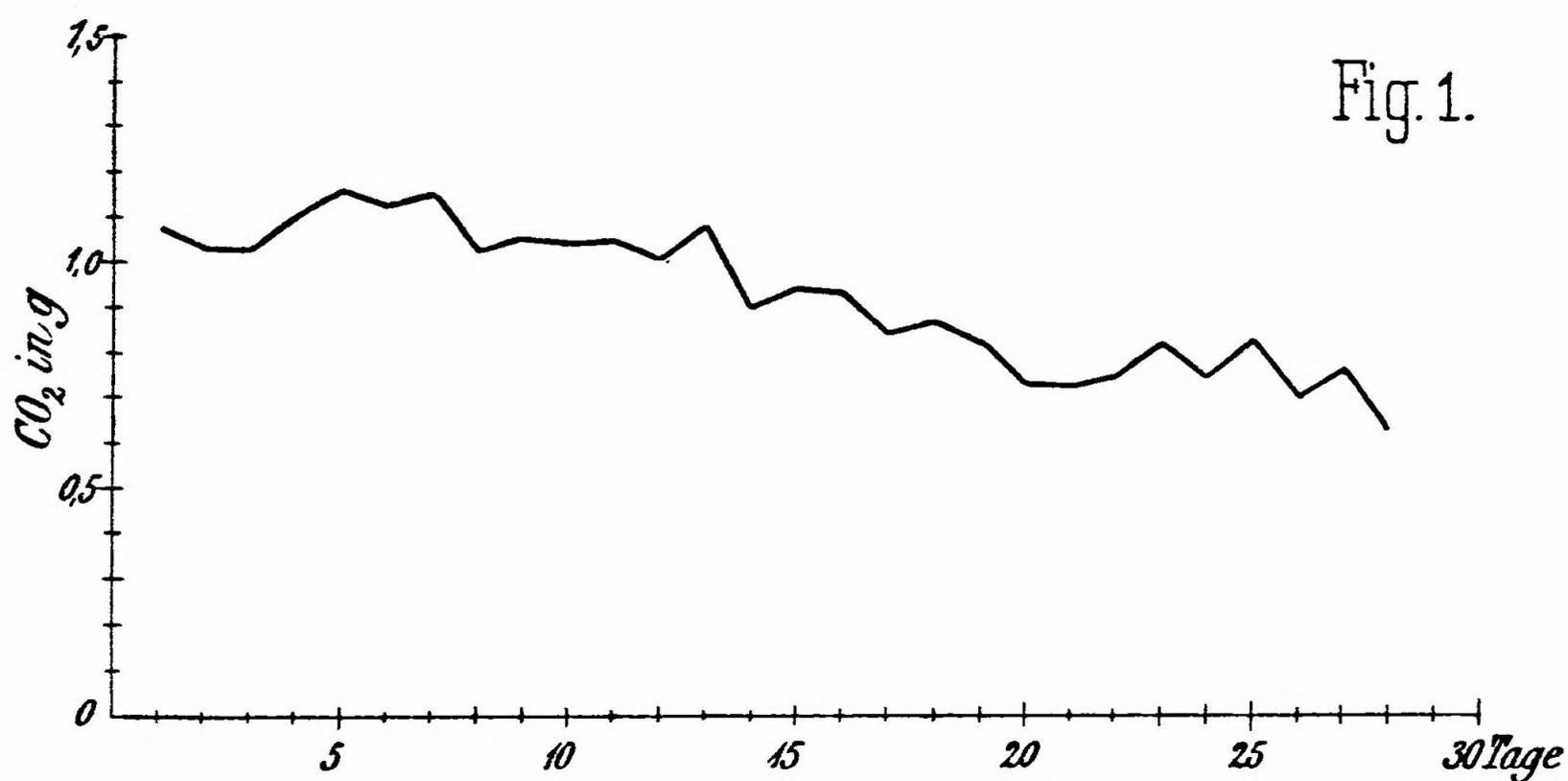
noch nicht erbracht worden. Im folgenden sollen Versuche nach dieser Richtung mitgeteilt werden.¹⁾

Es war die wahrscheinlichste Annahme, daß es sich um eine Oxydation — nicht um Assimilation — des einen Antipoden bei Pasteurs Versuchen handle. Darum gingen wir zunächst zum Unterschied von der bisher gewählten Versuchsanordnung so vor, daß erst zu den ausgewachsenen Pilzkulturen — im folgenden werden zunächst nur Versuche mit *Penicillium glaucum* beschrieben — die zu untersuchenden Stoffe zugesetzt wurden. Schon bevor letzteres geschah, wurde die täglich produzierte Kohlensäure bestimmt, und mit dem Zusatz an Substrat so lange gewartet, bis die tägliche CO_2 -Produktion ziemlich konstant geworden war. Als Nährlösung wurde zu meist verdünnte Bierwürze verwendet, nachdem mit anderen zumal an Kohlenhydraten ärmeren Nährböden schlechte Erfahrungen gemacht worden waren. Nach dem Zusatz von geeigneten Substraten (Ammoniumsalzen von Oxysäuren) stieg in kurzem die Kohlensäureproduktion sehr erheblich an, fiel aber nach einiger Zeit wieder und zwar schließlich bis unter die Menge der Kohlensäure, die vor dem Zusatz an NH_4 -Salz erzeugt worden war. Die folgenden Versuche und Kurven zeigen dies deutlich.

Zunächst sei ein Versuch mitgeteilt, der den normalen Verlauf der Kohlensäureproduktion kennen lehrt. (Da nicht bei konstanter Temperatur, sondern einfach bei Zimmertemperatur gearbeitet wurde und da ferner eine vollständig gleichmäßige Gasdurchleitung sowie entsprechende Rührung und Durchschüttelung nicht zur Anwendung kam, zeigen die Kurven keinen sehr stetigen Verlauf, wohl aber ist ihre Neigung ohne Schwierigkeit zu erkennen.)

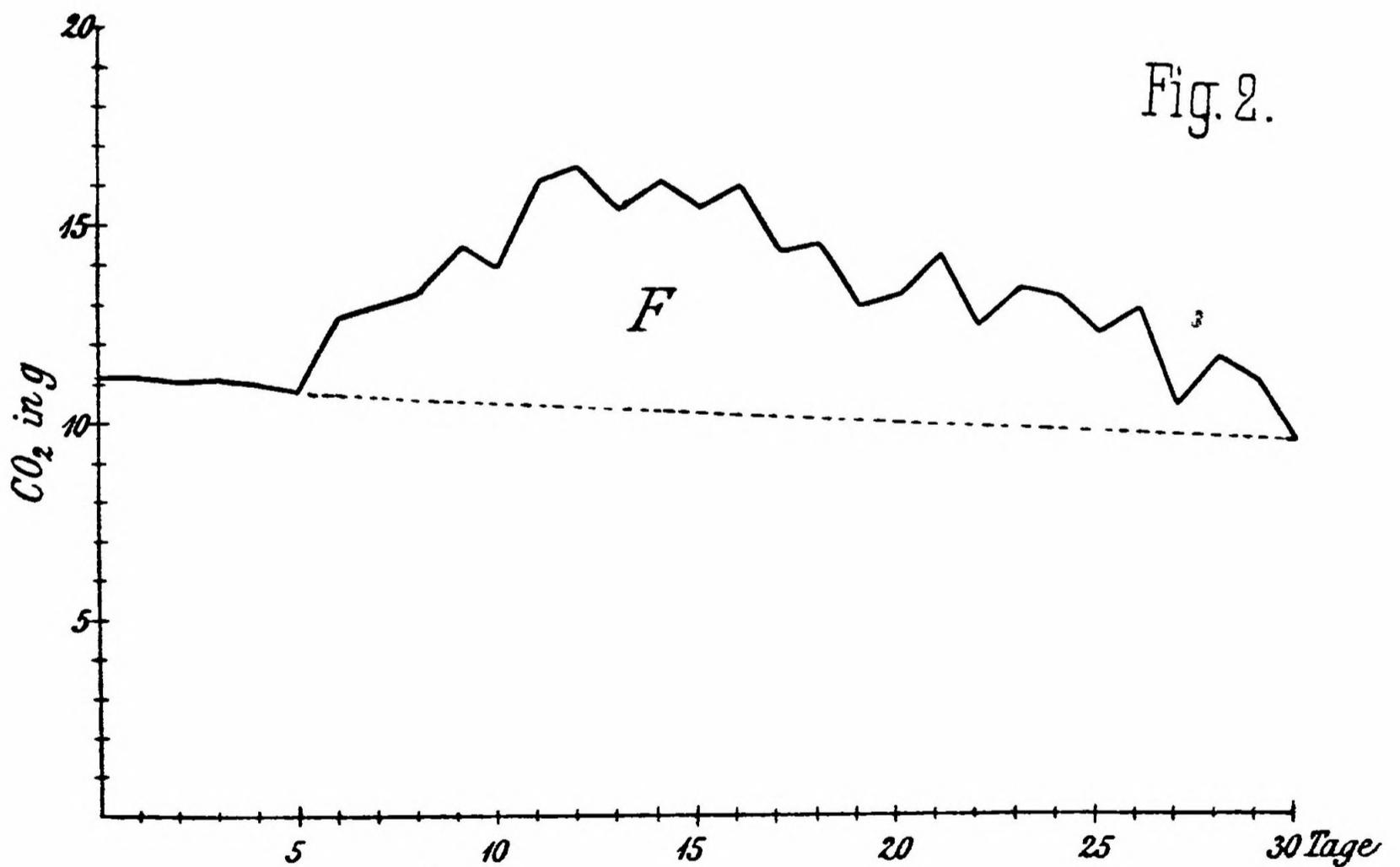
¹⁾ Da außer von Herrn Meier auch noch von anderen Herren in unserem Institute Arbeiten in der angedeuteten Richtung gemacht werden, bitte ich die Herren Fachkollegen, die mit ähnlichen Versuchen beschäftigt sind, freundlichst um Verständigung. H.

Am Tage	CO ₂ in g	Am Tage	CO ₂ in g
1.	1,08	15.	0,96
2.	1,04	16.	0,95
3.	1,03	17.	0,83
4.	1,10	18.	0,87
5.	1,15	19.	0,83
6.	1,12	20.	0,72
7.	1,16	21.	0,72
8.	1,04	22.	0,75
9.	1,06	23.	0,83
10.	1,05	24.	0,76
11.	1,06	25.	0,83
12.	1,03	26.	0,71
13.	1,09	27.	0,74
14.	0,90	28.	0,61

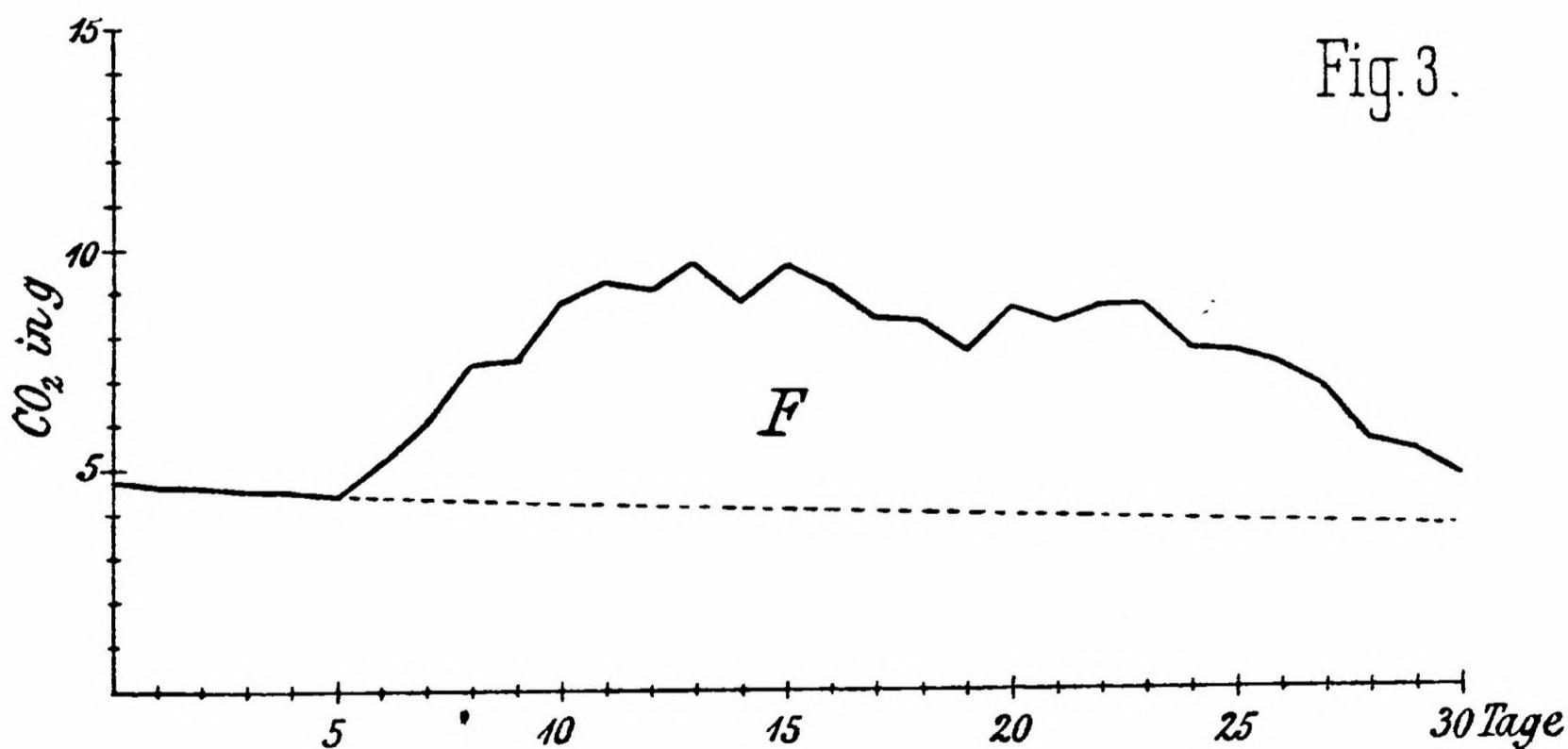


Die beiden folgenden Versuche zeigen den Verlauf nach Zusatz von NH₄-Salzen; beim ersten sind am 6. Tag 10 g β-Oxybuttersäure (als NH₄-Salz) zu 2 l Nährlösung zugesetzt worden, beim zweiten 18 g Mandelsäure (NH₄-Salz) zur selben Zeit und zur gleichen Menge der Nährlösung.

Am Tage	CO ₂ in g	Am Tage	CO ₂ in g
1.	} durchschnittlich 1,10	16.	1,63
2.		17.	1,45
3.		18.	1,45
4.		19.	1,30
5.		20.	1,32
6.	1,28 (Zusatz)	21.	1,44
7.	1,30	22.	1,26
8.	1,33	23.	1,36
9.	1,44	24.	1,33
10.	1,38	25.	1,21
11.	1,62	26.	1,30
12.	1,66	27.	1,01
13.	1,56	28.	1,18
14.	1,63	29.	1,10
15.	1,55	30.	0,92



Am Tage	CO ₂ in g	Am Tage	CO ₂ in g
1.	} durchschnittlich 0,45	16.	0,92
2.		17.	0,86
3.		18.	0,84
4.		19.	0,80
5.		20.	0,87
6.	0,51 (Zusatz)	21.	0,82
7.	0,58	22.	0,87
8.	0,74	23.	0,87
9.	0,73	24.	0,78
10.	0,90	25.	0,76
11.	0,92	26.	0,72
12.	0,90	27.	0,67
13.	1,00	28.	0,53
14.	0,87	29.	0,52
15.	0,98	30.	0,46



Den mitgeteilten Beispielen entspricht in ihren Ergebnissen völlig eine sehr große Anzahl von Versuchen, die mit verschiedenen Oxysäuren angestellt worden sind.

Um nun eine Orientierung darüber zu gewinnen, wieweit

die gebildete Kohlensäure wirklich verbrannter Säure entspräche, wurde erstens die nichtverbrannte Säure durch geeignete Extraktion der Nährlösung zurückbestimmt und zweitens auf folgende Weise versucht, aus der Kohlensäureproduktion selbst zurückzuschließen. Die Kurve der «konstanten CO_2 -Produktion» vor dem Zusatz wurde verlängert (in der Zeichnung punktiert), bis sie auf die Fortsetzung der Kurve der Gesamtproduktion trifft, und angenommen, daß die auf diese Weise abgegrenzte Fläche (F) die CO_2 -Menge veranschaulicht, welche der Säureverbrennung entstammt. Es ergab sich aber durchwegs, daß bedeutend weniger Säure verschwunden war, als dieser CO_2 -Menge entsprach, wie folgende Zahlen zeigen:

0,3% Milchsäurelösung. Versuchsdauer: 30 Tage. 3,4 g Säure verbrannt. Gesamtmenge an CO_2 : 12 g, entsprechend einem Überschuß von 7,05 g CO_2 .

0,33% Milchsäurelösung. Versuchsdauer: 16 Tage. 1,8 g Säure verbrannt. Gesamtmenge an CO_2 : 7 g, entsprechend einem Überschuß von 4,5 g CO_2 .

0,33% Milchsäurelösung. Versuchsdauer: 16 Tage. 1,2 g Säure verbrannt. Gesamtmenge an CO_2 : 6,8 g, entsprechend einem Überschuß von 5,1 g CO_2 .

0,5% Traubensäurelösung. Versuchsdauer: 36 Tage. 2,2 g Säure verbrannt. Gesamtmenge an CO_2 : 8,05 g, entsprechend einem Überschuß von 2,05 g CO_2 .

0,5% Mandelsäurelösung. Versuchsdauer: 15 Tage. 2,5 g Säure verbrannt. Gesamtmenge an CO_2 : 9,02 g, entsprechend einem Überschuß von 3,5 g CO_2 .

Dabei scheint fast bei vergleichbaren Versuchen ein einigermaßen konstantes Verhältnis zwischen verbrannter Säure und CO_2 -Produktion überhaupt zu bestehen. Auf eine Deutung dieser Verhältnisse soll aber vorläufig nicht eingegangen werden; nur sei noch erwähnt, daß die übrig gebliebene Säure nicht stark optisch aktiv war,¹⁾ ferner, daß nach unseren bisherigen Versuchen gut verbrannt werden: Milchsäure, Trauben-

¹⁾ Vgl. auch Harden, l. c. Über die stereochemischen Verhältnisse soll später eingehender berichtet werden.

säure, Äpfelsäure, Mandelsäure, β -Oxybuttersäure; während keine merkbare Oxydation eintrat bei: Glykolsäure, Citronensäure, Brenztraubensäure und Oxyisobuttersäure; ohne Zweifel spielt also das Vorhandensein des asymmetrischen Kohlenstoffes eine wesentliche Rolle.

Die bisher beschriebenen Versuche machen es jedenfalls sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der Pasteurschen Beobachtung um Oxydation handelt, sind aber vielleicht noch nicht beweisend. Infolge dessen wurde versucht, ob man nicht durch Abtötung der Pilze zu einfacheren Bedingung, eventuell zu dem Nachweis gelangen könne, daß es sich um eine fermentative Oxydation handelt. Eine Reihe von vorläufigen Versuchen haben dieses Resultat, wie wir sagen dürfen, mit Bestimmtheit ergeben.

Die Abtötung der Pilzhäute geschah anfangs durch Aceton, später durch Methylalkohol mit möglichster Vorsicht. Geschieht die Trocknung vor allem nicht schnell genug, so wird das Oxydationsferment zerstört und es tritt nur eine gewisse Menge CO_2 auf, die vom Zusatz von Oxysäuren oder ihren Salzen unabhängig ist und vermutlich auf Zymasewirkung oder ähnliches zurückzuführen ist.¹⁾ Die Fermentwirkung dauert nur kurze Zeit an und war in allen positiven Fällen nach 36 Stunden nicht mehr wahrnehmbar. Schon daraus und aus dem Verlauf bei der Gegenwart reichlicher Mengen an Antiseptikum ergibt sich, daß es sich nicht um die Wirkung lebender Zellen handelt. Außerdem zeigt aber eine Überimpfung des «Fermentes» auf Nährlösung, daß die Zahl an vorhandenen lebenden Zellen — einige Sporen, die in der kurzen Zeit, wie sie für die Abtötung nur gebraucht werden darf, durch die verwandten Chemikalien nicht vernichtet werden — auf keinen Fall den beobachteten chemischen Umsatz hervorrufen könnte.

Versuche: Pilzhäute getötet, getrocknet und fein pulverisiert.

¹⁾ Vgl. z. B. Kostytscheff, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., Bd. XXII, S. 207, Bd. XXV, S. 118; Maximow, das., Bd. XXII, S. 225; ferner Palladin und Kostytscheff, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 214; Palladin, das., Bd. XLVII, S. 407, Bd. LV, S. 207, u. a.

I. a) 23 g Pilzsubstanz in 100 ccm Wasser suspendiert, das $\frac{1}{2}$ ‰ FNa enthält, außerdem etwas Thymol zugesetzt.

b) Ebenso wie a, nur 3 g milchsaures Na zugesetzt.

	a	b
CO ₂ nach 12 Stunden:	0,02 g	0,06 g
» » 24 » :	0,01 »	0,01 »
» » 36 » :	0,00 »	0,00 »
Gesamtmenge an CO ₂ :	0,03 g	0,07 g
	Differenz: 0,04 »	

II. a) 23 g Pilzsubstanz, 125 ccm H₂O, $\frac{1}{2}$ ‰ FNa, etwas Thymol, mit NaHCO₃ schwach alkalisch gemacht.

b) Ebenso wie a, nur 3 g milchsaures Na zugesetzt.

	a	b
CO ₂ nach 12 Stunden:	0,02 g	0,045 g
» » 24 » :	0,00 »	0,000 »
Gesamtmenge an CO ₂ :	0,02 g	0,045 »
	Differenz: 0,025 »	

III. a) 18 g Pilzsubstanz, 100 ccm H₂O, $\frac{1}{2}$ ‰ FNa.

b) wie a, nur 0,781 g freie Milchsäure zugesetzt.

CO ₂ nach 12 Stunden:	0,013 g	0,064 g
» » 24 » :	0,005 »	0,015 »
» » 36 » :	0,000 »	0,000 »
Gesamtmenge an CO ₂ :	0,018 »	0,079 g
	Differenz: 0,061 »	

Durch Titration wurde gefunden, daß 0,08 g Milchsäure fehlten, jedenfalls trat in diesem Falle also keine völlige Verbrennung ein.

Faßt man das Ergebnis der bisherigen Versuche zusammen, so folgt jedenfalls mit Sicherheit, daß es sich um eine katalytische Oxydationswirkung handelt, die neben einer anderen, davon wahrscheinlich direkt unabhängigen CO₂-Produktion verläuft.
