

# Über das Verhalten einiger Pilze zu organischen Säuren.

## II. Mitteilung.

Von

R. O. Herzog, O. Ripke und O. Saladin.

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1911.)

Wie früher<sup>1)</sup> gezeigt wurde, vermögen *Penicillium glaucum*, *Oidium lactis* und *Monilia candida* verschiedene organische Säuren unter Kohlensäureentwicklung, also unter Oxydation zum Verschwinden zu bringen. Im folgenden wird ein Beispiel für eine andere Art der Verarbeitung freier Säure und zwar durch *Mycoderma* gegeben.

### 3. Das Verhalten von *Mycoderma cerevisiae* gegenüber Säuren.

Die nachstehend beschriebenen Versuche sind ebenso ausgeführt, wie in der vorangehenden Mitteilung angegeben ist. Die Pilze sind mit Aceton getötet.

#### Versuch 1.

Kölbchen a enthielt 50 ccm destilliertes Wasser, 20 Tropfen Toluol, 9 g Pilzsubstanz.

Kölbchen b enthielt dasselbe wie a, außerdem ca. 0,6 g freie Essigsäure ( $1/2^{0/10}$ ).

Die Kohlensäureproduktion war bei:

	a)	b)
nach 16 Stunden	0,0120	0,0060
„ 24 „	0,0050	0,000
nach 40 Stunden	0,0170	0,0060.

5 ccm der ursprünglichen Essigsäure verbrauchten 20 ccm 0,1-n-NaOH.

5 ccm der Flüssigkeit in a (Wasser) verbrauchten 3,1 ccm 0,1-n-NaOH. 5 ccm der Flüssigkeit in b (Essigsäure) verbrauchten 18,3 ccm 0,1-n-NaOH.

<sup>1)</sup> Vgl. die voranstehende Mitteilung.

### Versuch 2.

Kölbchen a enthielt 100 ccm Wasser (dest.), 30 Tropfen Toluol, 11,5 g Pilzsubstanz.

Kölbchen b enthielt dasselbe wie a, außerdem 0,9 g freie Milchsäure.

Die Kohlensäureproduktion ergab bei:

	a)	b)
nach 18 Stunden	0,0108	0,0020
» 26 »	0,0134	0,000
» 22 »	0,0050	0,000
nach 66 Stunden	0,0292	0,0020 g CO <sub>2</sub> .

10 ccm der ursprünglich angewandten Milchsäurelösung verbrauchten 10 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in a (Wasser) verbrauchten 5,0 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in b (Milchsäure) verbrauchten 9,0 ccm 0,1-n-NaOH.

### Versuch 3.

Kölbchen a enthielt 50 ccm destilliertes Wasser, 20 Tropfen Toluol, 8,5 g Pilzsubstanz.

Kölbchen b enthielt dasselbe wie a, außerdem 0,648 g freie Milchsäure.

Die Kohlensäureproduktion ergab bei:

	a)	b)
nach 20 Stunden	0,0791	0,0125
» 44 »	0,0130	0,0150
nach 64 Stunden	0,0921	0,0150 g CO <sub>2</sub> .

10 ccm der ursprünglich angewandten Milchsäure verbrauchten 14,4 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in a (Wasser) verbrauchten 6,2 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in b (Säure) verbrauchten 10,6 ccm 0,1-n-NaOH.

Alle drei Versuche zeigen dasselbe Ergebnis. Die Kohlensäureproduktion ist in saurer Lösung kleiner, als wenn nur Wasser zur Pilzmasse hinzugefügt wird; die Acidität nimmt

aber in den sauren Versuchen ab, obwohl an reines Wasser nicht unerhebliche Mengen Säure vom Mycel abgegeben werden. (Die an das Wasser abgegebene Säure war mit größter Wahrscheinlichkeit wenigstens der Hauptsache nach Phosphorsäure, wie besondere Versuche gezeigt haben.)

Das Ergebnis ist also, daß die Säure verschwindet, aber nicht oxydiert wird. Die weiteren Versuche gelten der Kontrolle dieses Resultates. Zu diesem Zwecke wurde in folgender Weise vorgegangen.

#### Versuch 4.

Während für die beschriebenen Versuche die Pilze in verdünnter Bierwürze wachsen gelassen worden waren, wurde nunmehr eine Nährlösung von bekannter Zusammensetzung gewählt und zwar enthielt diese:

1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,8%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3%  $\text{MgSO}_4$ , 0,05%  $\text{KCl}$  und 10% Rohrzucker in destilliertem Wasser gelöst.

Die von der Nährlösung getrennten Pilze wurden bis zum Verschwinden der sauren Reaktion mit Wasser gewaschen und mittels Aceton getötet.

#### Versuch 4a.

15 g Pilzsubstanz wurden in 100 ccm einer 1,2825%igen Mandelsäurelösung gebracht (als Antiseptikum wurde wieder Toluol angewandt). Nach 24 Stunden wurde mit verdünnter Schwefelsäure soweit angesäuert, daß die Lösung an ihr 10% enthielt: hierauf wurde filtriert und gut ausgewaschen. Sowohl das Filtrat als die ausgewaschene Pilzmasse wurde mit Äther quantitativ erschöpft. Im Filtrat werden 1,1100 g Mandelsäure wiedergefunden, aus der Pilzmasse lassen sich 0,06 g Säure extrahieren. Es wurden also 1,1700 g Säure wiedergewonnen oder 0,1125 g sind verschwunden.

#### Versuch 4b.

Ein anderer Teil der trockenen Pilzmasse und zwar 7 g wurden in folgender Weise verarbeitet. Sie wurden in 50 ccm reinen Wassers suspendiert (unter Toluolzusatz). Bereits nach 5 Minuten tritt starke Säurereaktion auf. Nach 24 Stunden

wird mit Schwefelsäure angesäuert, hierauf das Filtrat mit Äther erschöpft. Der Extrakt enthält keine Spur Säure. Da sich also aus der Pilzsubstanz, die abgetötet und mit Wasser zusammengebracht jedenfalls durch Autolyse Säure bildet, keine ätherlösliche Säure entziehen läßt, muß man annehmen, daß alle im Versuch 4a extrahierte Säure Mandelsäure war.

Es wurde nun weiter geprüft, ob die Pilzsubstanz die Mandelsäure in einer Bindung enthielt, aus der sie sich eventuell durch Kochen mit Schwefelsäure oder mit Alkali zurückgewinnen ließ. Zu diesem Zwecke wurde die in Versuch 4a mit Äther erschöpfte Pilzmasse 5 Minuten mit verdünnter Schwefelsäure gekocht und hierauf abfiltriert. Da weder die Pilzsubstanz noch das Filtrat Säure an Äther abgab, wurde neuerlich und zwar  $\frac{1}{2}$  Stunde mit Schwefelsäure gekocht. Die Ätherextraktion lieferte nunmehr 0,01 g Substanz, welche aber, wie eine Prüfung mit etwas Kaliumpermanganat und Schwefelsäure (Geruch nach Benzaldehyd) ergab, frei von Mandelsäure war.

Auch die Behandlung mit Natronlauge (20 Minuten langes Kochen) lieferte ein negatives Resultat.

Da die fehlenden 0,1125 g Mandelsäure der Auffindung nicht hätten entgehen können, bleibt nur der Schluß übrig, daß die Säure chemisch umgewandelt worden ist.

Dieses Ergebnis ist in verschiedenen Versuchen immer wieder erhalten worden.

### Versuch 5. Künstliche Nährlösung.

- 12 g Pilzsubstanz in 50 ccm Wasser und etwas Toluol.
- Dasselbe mit 1%iger Mandelsäure.
- 36 g Pilzsubstanz in 150 ccm 1%iger Mandelsäurelösung und etwas Toluol.

20 ccm verbrauchten  $\frac{n}{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Nach dem Versuch	0,00 ccm	34,20 ccm
» 2 Stunden	0,20 »	29,10 »
» 24 »	6,50 »	27,60 »
» 48 »	6,50 »	29,40 »

c) Die Masse filtriert und im Extrakt der Flüssigkeit die Säure bestimmt (Benzaldehyd):	1,403 g
Pilzextrakt (Benzaldehyd):	0,012 »
Pilzmasse mit $H_2SO_4$ gekocht und das Filtrat extrahiert (kein Benzaldehyd):	0,008 »
Die Pilzmasse mit NaOH gekocht und das Filtrat extrahiert (kein Benzaldehyd):	0,019 »
Gefundene Säure:	1,442 g
Zugefügte »	1,560 »
Verschwundene »	0,118 g

### Versuch 6. Künstliche Nährlösung.

- a) 15,4 g Pilzsubstanz in 70 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 1%iger Mandelsäure.  
 c) 26,4 g Pilzsubstanz in 120 ccm 1%iger Mandelsäurelösung und etwas Toluol.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuch	0,00 ccm	33,17 ccm
Nach 2 Stunden	5,00 »	28,68 »
» 24 »	5,52 »	28,80 »
» 48 »	6,64 »	29,16 »

c) Die Masse filtriert und im Extrakt der Flüssigkeit die Säure bestimmt (Benzaldehyd):	1,068 g
Pilzextrakt (kein Benzaldehyd):	0,006 »
Pilzmasse mit $H_2SO_4$ gekocht und das Filtrat extrahiert (kein Benzaldehyd):	0,009 »
Pilzmasse mit NaOH gekocht und das Filtrat extrahiert (kein Benzaldehyd):	0,014 »
Gefundene Säure:	1,097 g
Zugefügte »	1,198 »
Verschwundene »	0,101 g

### Versuch 7. Hefewürze als Nährlösung.

- a) 9 g Pilzmasse in 50 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 1%iger Mandelsäure.

c) 34,2 g Pilzmasse in 190 ccm 1%iger Mandelsäurelösung.

20 ccm verbrauchten  $n/25$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuch	0,00 ccm	32,47 ccm
Nach 2 Stunden	24,80 „	24,80 „
„ 48 „	42,40 „	42,80 „

Die von dem Pilz erzeugte Säure nimmt stark zu und erreicht sogar in beiden Versuchen fast denselben Wert. Daß aber nicht die gesamte Menge Mandelsäure verschwunden war, wie die Titration zu erweisen schien, zeigte die weitere Untersuchung, die den größten Teil der Mandelsäure wieder zutage förderte:

c) Die Masse wurde filtriert und nach dem Extrahieren des Filtrats die Säure bestimmt:	1,088 g
(Eine Probe gab nach dem Erwärmen mit $KMnO_4$ und $H_2SO_4$ deutlich Benzaldehyd.)	
Pilzextrakt:	0,104 „
(Auch hierin wurde die Reaktion auf Mandelsäure gefunden.)	
Die Masse mit Schwefelsäure gekocht und das Filtrat extrahiert:	0,020 „
(Eine Probe entwickelte keinen Benzaldehyd.)	
Die Masse mit NaOH gekocht und das Filtrat extrahiert (kein Benzaldehydgeruch):	0,030 „
Gefundene Säure:	1,242 g
Zugefügte	1,851 „
Verschwundene	0,609 g

Das auf den ersten Blick etwas sonderbare Ergebnis des Versuches läßt sich höchstwahrscheinlich in folgender Weise erklären. Die (fermentative) Säurebildung strebt einem gewissen Maximum zu; ist dieser Säuregehalt durch Zusatz einer fremden Säure erreicht, so tritt keine weitere spontan gebildete Säure hinzu.

Die erhebliche Abnahme an Mandelsäure gegenüber den vorangegangenen Versuchen läßt sich ungewollt mit dem

viel kräftigeren Gedeihen der Pilze auf der Hefewürze erklären, womit auch die viel intensivere Säurebildung zusammenhängt.

#### Versuch 8. Bierwürze als Nährlösung.

- a) 13 g Pilzmasse in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.
- b) Dasselbe mit 1%iger d-Mandelsäure.
- c) Dasselbe wie in a) mit 1%iger l-Mandelsäure.
- d) 19,5 g Pilzmasse in 150 ccm 1%iger i-Mandelsäurelösung.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)	c)
Vor dem Versuch	0,00 ccm	19,93 ccm	19,60 ccm
Nach 2 Stunden	20,00 »	19,92 »	19,60 »
» 48 »	29,60 »	30,30 »	30,00 »

#### Versuch 9.

Gemisch von Bier- und Hefewürze als Nährlösung.

- a) 14 g Pilzmasse in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.
- b) Dasselbe mit 1%iger d-Mandelsäure.
- c) Dasselbe wie in a) mit 1%iger l-Mandelsäure.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)	c)
Vor dem Versuch	0,00 ccm	20,27 ccm	20,84 ccm
Nach 2 Stunden	20,70 »	20,60 »	21,20 »
» 48 »	42,40 »	42,40 »	42,60 »

Beide Versuchsreihen lassen keinen Einfluß der stereochemischen Konfiguration erkennen: sie zeigen aber deutlich die in Versuch 7 besprochene Einwirkung der kräftigen Nährlösung: starke Säurebildung.

#### Versuch 10. Künstliche Nährlösung.

- a) 11,7 g Pilzmasse in 50 ccm Wasser und etwas Toluol.
- b) Dasselbe wie in a), außerdem noch 1,5%ige Milchsäure.
- c) 35,1 g Pilzmasse in 150 ccm 1,5%iger Milchsäurelösung und etwas Toluol.

20 ccm verbrauchten $n/25$ -NaOH:	a)	b)
Vor dem Versuch	0,0 ccm	50,05 ccm
Nach 2 Stunden	5,10 »	47,20 »
» 24 »	5,40 »	46,90 »
c) Die Masse filtriert und das Filtrat extrahiert:		1,245 g
Pilzextrakt:		0,023 »
Pilzmasse mit Schwefelsäure gekocht und das Filtrat extrahiert:		0,011 »
Pilzmasse mit NaOH gekocht und das Filtrat extrahiert:		0,011 »
	Gefundene	Säure: 1,290 g
	Zugefügte	» 1,351 »
	Verschwundene	» 0,061 g

### Versuch 11. Anorganische Salze und Zucker als Nährlösung.

a) 10 g Pilzmasse und 50 ccm Wasser und etwas Toluol.

b) Dasselbe mit 1,5%iger Milchsäure.

c) 30 g Pilzmasse in 150 ccm 1,5%iger Milchsäurelösung.

20 ccm verbrauchten $n/25$ -NaOH:	a)	b)
Vor dem Versuch	0,0	49,88
Nach 2 Stunden	4,03	48,30
» 24 »	4,03	48,22

Hier, wo zur Kultur der Pilze die künstliche Nährlösung angewandt worden war, zeigt sich die geringe von den Pilzen produzierte Säuremenge, und wie sie nach 24 Stunden gerade noch so groß ist wie nach 2 Stunden.

c) Die Masse wurde filtriert, die Flüssigkeit extrahiert, und die Säure bestimmt:		1,268 g
Der Pilzextrakt gab:		0,012 »
Die Pilzmasse mit Schwefelsäure gekocht, und das Filtrat extrahiert gab:		0,016 »
Die Pilzmasse mit NaOH gekocht, und das Filtrat extrahiert, gab:		0,011 g
	Gefundene	Säure: 1,307 g
	Zugefügte	» 1,347 »
	Verschwundene	» 0,040 g

### Versuch 12. Hefewürze als Nährlösung.

- a) 15,2 g Pilzmasse in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 1,5%iger Milchsäure.  
 c) 30,4 g Pilzmasse in 200 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuch	0,00	40,96
Nach 2 Stunden	19,7	30,8
» 24 »	29,6	44,0
» 48 »	30,8	52,00.

Die hier durch die Titration gefundene Abnahme an Milchsäure wurde näher untersucht.

Die Masse von c wurde filtriert, gut ausgewaschen, die Flüssigkeit mit Äther extrahiert und die ausgezogene Säure bestimmt:

Säure bestimmt:	0,980 g
Der Extrakt der Pilzmasse selbst gab:	0,089 »
Die Pilzmasse mit 10%iger $H_2SO_4$ gekocht, filtriert und extrahiert:	0,038 »
Die Pilzmasse mit 10%iger Natronlauge gekocht und das Filtrat extrahiert:	0,020 »
Gefundene Säure:	1,127 g
Zugefügte »	1,475 »
Verschwundene »	0,348 g

Der Versuch liefert wieder — bei Anwendung kräftiger Pilze — erheblich höhere Zahlen als die beiden vorangegangenen.

### Versuch 13. Gemisch von Bier- und Hefewürze als Nährlösung.

- a) 14 g Pilzsubstanz in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 0,7% d-Weinsäure.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuche:	0,00 ccm	42,13 ccm
Nach 2 Stunden	20,7 »	35,2 »
» 48 »	42,4 »	61,4 »

Es findet also ein Verschwinden der zugesetzten Säure statt.

### Versuch 14. Künstliche Nährlösung.

- a) 22 g Pilzmasse in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 1% Weinsäure.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuch	0,00 ccm	68,36 ccm
Nach 2 Stunden	5,00 »	65,96 »
» 24 »	5,52 »	65,80 »
» 48 »	5,64 »	66,52 »

Die Abnahme an Weinsäure ist hier dem vorigen Versuch gegenüber wieder geringer, entsprechend der Aktivität der auf verschiedenen Nährlösungen gezüchteten Pilze.

### Versuch 15. Bierwürze als Nährlösung.

- a) 19 g Pilzsubstanz in 100 ccm 0,5%iger d-Weinsäurelösung und etwas Toluol.  
 b) 19 g Pilzsubstanz in 100 ccm 0,5%iger l-Weinsäurelösung und etwas Toluol.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b)
Vor dem Versuch	33,63 ccm	33,94 ccm
Nach 48 Stunden	42,20 »	42,50 »

### Versuch 16. Bierwürze als Nährlösung.

- a) 17 g Pilzmasse in 100 ccm Wasser und etwas Toluol.  
 b) Dasselbe mit 0,5%iger d-Weinsäure.  
 c) Dasselbe wie in a) mit 0,5%iger l-Weinsäurelösung.

20 ccm verbrauchten  $n_{25}$ -NaOH:

	a)	b	c
Vor dem Versuch	0,00 ccm	33,86 ccm	39,79 ccm
Nach 2 Stunden	— »	31,80 »	31,60 »
» 12 »	27,28 »	— »	— »
» 60 »	35,80 »	28,80 »	28,90 »

Es tritt bei Weinsäure keine merkbare Änderung der Acidität in den Lösungen beider optisch Isomeren ein, wie bei Mandelsäure.

Zur Ergänzung der beschriebenen Versuche muß noch

angefügt werden, daß mit Bernsteinsäure negative Resultate erhalten werden.

### Versuch 17.

Flasche a enthielt 150 ccm destilliertes Wasser, 60 Tropfen Toluol, 8,2 g Pilzsubstanz.

Flasche b enthielt dasselbe wie a + 1,6284 g Bernsteinsäure.

Flasche c enthielt 0,7595 g bernsteinsaures Natrium, sonst dasselbe wie a.

Kohlensäureproduktion bei:

	a)	b)	c)
Nach 14 Stunden	0,0340	0,0106	0,0114
» 70 »	0,1024	0,0300	0,0326 g CO <sub>2</sub> .

10 ccm der ursprünglich angewandten Bernsteinsäure verbrauchten 18,4 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in a (Wasser) verbrauchten 2,4 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in b (Bernsteinsäure) verbrauchten 18,2 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in c (bernsteinsaures Natrium) verbrauchten 2,9 ccm 0,1-n-NaOH.

### Versuch 18.

Flasche a enthielt 150 ccm destilliertes Wasser, 60 Tropfen Toluol, ca. 8 g Pilzsubstanz.

Flasche b enthielt dasselbe wie a + 1,5525 g Bernsteinsäure.

Flasche c enthielt 0,7245 g bernsteinsaures Natrium, sonst dasselbe wie a.

Kohlensäureproduktion bei:

	a)	b)	c)
Nach 15 Stunden	0,0160	0,0046	0,0168
» 71 »	0,0688	0,0306	0,0338 g CO <sub>2</sub> .

10 ccm der ursprünglich angewandten Bernsteinsäure verbrauchten vor dem Versuch 17,55 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in a (Wasser) verbrauchten nach dem Versuch 3,05 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in b (Bernsteinsäure) verbrauchten nach dem Versuch 17,4 ccm 0,1-n-NaOH.

10 ccm der Flüssigkeit in c (bernsteinsaures Natrium) verbrauchten nach dem Versuch 2,9 ccm 0,1-n-NaOH.

In beiden Versuchsreihen nimmt die Kohlensäureproduktion in saurer Lösung ab; dagegen ist die Titerabnahme so gering, daß man nicht von einem merklichen Verschwinden der Säure reden kann.

Endlich sei noch erwähnt, daß verschiedene Versuche mit lebenden Pilzen zu demselben Resultat führten, das oben mit getöteten mehrfach beschrieben ist: die  $\text{CO}_2$ -Produktion nimmt auf Säurezusatz ab, während die Säure, wie ja bereits bekannt ist, verzehrt wird.

Die Versuche lehren, daß in dem vorliegenden Falle die Säureabnahme nicht durch Oxydation zu erklären ist; ebenso ist bewiesen, daß einfache Salzbildung oder Adsorption an die Zellmassen oder dergleichen simple Vorgänge nicht Ursache des Substanzverlustes sind, höchstwahrscheinlich ebensowenig Esterbildung und ähnliche Reaktionen, die durch Verseifung rückgängig gemacht werden können. So bleibt nur die Annahme einer weitergehenden chemischen Umwandlung der Säure. Bei lebenden Zellen würde man keine Scheu tragen, den Prozeß als assimilatorisch zu bezeichnen; nach der Abtötung liegt die Aufgabe offen, die chemische Natur des Umwandlungsprozesses aufzuklären. Hypothetische Gedanken über den Vorgang zu äußern, fällt wohl nicht schwer; man könnte an Amidierung oder ähnliches denken; dagegen ist vorläufig bei der Schwierigkeit, größere Mengen lebenskräftiger Pilze auf einmal zu erhalten, und bei der geringen Quantität der verarbeiteten Substanz die Hoffnung gering, die Aufgabe experimentell zu lösen. Möglicherweise liefert die Mandelsäure das geeignete Versuchsmaterial.

Herrn Dr. A. Meier, der uns bei diesen Versuchen freundlichst unterstützt hat, sei der beste Dank ausgesprochen!