

# Über Zuckerbildung aus Nichtzuckerstoffen durch Schimmelpilze.

Von

S. Kostytschew.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität St. Petersburg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1920.)

Als Material der Pflanzenatmung dienen in erster Linie Zuckerarten. Es ist gegenwärtig allgemein anerkannt, daß die Atmung der Samenpflanzen als eine Zuckeroxydation anzusehen ist, und ich halte es für überflüssig, diese Frage ausführlich zu erläutern, um so mehr als eine Übersicht der einschlägigen Literatur in allen Lehrbüchern der Pflanzenphysiologie und Pflanzenchemie zu finden ist.

Das vorrätige Atmungsmaterial der Samenpflanzen besteht entweder aus Kohlenhydraten oder aus Fetten. Letztere werden, wie bekannt, zuerst in Zucker verwandelt und als Zucker veratmet; wir sind also wohl berechtigt, anzunehmen, daß Samenpflanzen über eine beständige „Garnitur“ der für Verarbeitung des Betriebsmaterials dienenden Fermente verfügen. Es sind erstens die Fermente der alkoholischen Gärung, die eine primäre Zuckerspaltung bewirken und labile intermediäre Gärungsprodukte erzeugen, zweitens aber oxydierende Fermente, die eine Oxydation der Gärungsprodukte einleiten. Schon längst habe ich dargetan, daß oxydierende Fermente der Pflanzen nicht imstande sind, Zucker direkt anzugreifen, aber die in angegorenen Zuckerlösungen enthaltenen Stoffe unter  $\text{CO}_2$ -Bildung oxydieren<sup>1)</sup>. Andererseits ist Äthylalkohol, das Endprodukt der alkoholischen Gärung, kein

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschr. Bd. 67, S. 116 (1910).

Material der vitalen Oxydation<sup>1)</sup>). Diese experimentellen Ergebnisse dienen als Grundlage obiger Theorie der Anteilnahme von Zymase am Atmungsvorgange, die sich gegenwärtig einer Anerkennung in weiteren Kreisen erfreut.

In Betreff der omnivoren niederen Pflanzen, speziell der Schimmelpilze, scheint die Frage verwickelter zu sein. Vom theoretischen Standpunkte aus sind die beiden folgenden Voraussetzungen möglich:

1. Sämtliche verschiedenartige Nährstoffe werden über die Zwischenstufe von Zucker durch eine und dieselbe „Garitur“ der Fermente veratmet. Der relative Nährwert verschiedener Stoffe wäre also, dieser Ansicht zufolge, nur davon abhängig, inwiefern sie als Material für den physiologischen Zuckeraufbau dienen können.

2. Eine jede Nährsubstanz wird nach eigener Art durch jeweilige Fermente verarbeitet. Das Plasma der omnivoren Pilze muß also die Fähigkeit besitzen, sehr verschiedenartige Fermente aufbauen zu können.

Auch intermediäre Arten der Ernährung sind wohl denkbar: es könnten z. B. einige Stoffe direkt, andere aber durch die Zwischenstufe von Zucker assimiliert bzw. veratmet werden. Nur experimentelle Untersuchungen können darüber Aufschluß geben, welche Annahme die richtige ist.

In der vorliegenden Mitteilung will ich nur die wichtige Frage der intermediären Zuckerbildung durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger* erläutern. Ausführliche physiologische Untersuchungen über die Veratmung verschiedenartiger Nährstoffe durch Schimmelpilze sollen in einer an anderer Stelle zu publizierenden Abhandlung von S. Kostytschew und M. Afanassjewa zusammengefaßt werden.

Der Nachweis einer Zuckerbildung aus verschiedenen Nährstoffen kann entweder direkt oder durch eine indirekte Methode erbracht werden. Im letzteren Falle dient die Einleitung einer Alkoholbildung bei Sauerstoffmangel als Hinweis darauf, daß namentlich Zucker verarbeitet wird, da nur Zucker-

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Biochem. Zeitschr. Bd. 15, S. 164 (1908); Bot. Ber. Bd. 26a, S. 565 (1908).

arten als Material der Zymasegärung dienen. Hierbei wird zwar nicht erkannt, welche Zuckerart entstanden war, doch können wir andererseits mit sehr großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Atmung namentlich auf Kosten von Zucker vor sich geht, indem das Vorhandensein der Zymase mit dem allgemein üblichen Mechanismus der „Zuckeratmung“ zusammenhängt. Außerdem bietet die indirekte Methode den Vorteil, daß sie einen Zuckernachweis auch in dem Falle gestattet, wo Zuckerverarbeitung mit größerer Geschwindigkeit, als Zuckerbildung stattfindet und also gar keine Zuckeranhäufung zustande kommt. Ich habe beide Methoden benutzt.

*Aspergillus niger* wurde kultiviert in flachen, breiten zylindrisch-konischen, 400 ccm fassenden Kolben (Fläche der Pilzdecke 167 qcm). Ein jeder Kolben wurde versetzt mit 250 ccm Nährlösung, welche pro Liter 3 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,01 g  $\text{ZnSO}_4$ , Spur  $\text{FeSO}_4$  und außerdem wechselnde Mengen von verschiedenen organischen Stoffen, die als Kohlenstoffquelle dienten, enthielt. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven bei  $120^\circ$ ; zur Impfung diente immer eine an die zu untersuchende Nährsubstanz vollkommen gewöhnte Kultur. Sämtliche Kulturen wurden bei  $34^\circ$  gezogen.

Der Nachweis der Zucker- bzw. Alkoholbildung erwies sich als eine feine und schwierige Aufgabe. Nur auf Mannitlösungen erfolgte unter gewöhnlichen Kulturverhältnissen eine Zuckeranhäufung. Für Kulturen auf anderen Nährstoffen erwiesen sich besondere Kunstgriffe als durchaus notwendig.

Vor allem habe ich die streng aerobe Natur des Pilzes dazu benutzt, die vitalen Dissimilationsvorgänge durch Sauerstoffabschluß herabzudrücken. In einigen Fällen führte dieses Verfahren zum Ziele, in anderen Fällen war es aber an und für sich noch ungenügend; hierdurch wird die experimentelle Schwierigkeit der Arbeit gut illustriert. Besonders lehrreich ist der Umstand, daß die Alkoholbildung von *Aspergillus niger* bei Sauerstoffabschluß auf einigen Substraten durch Gegenwart minimaler Mengen von freien Säuren vollkommen eingestellt wird, indes der genannte Pilz bei Sauerstoffzutritt stark saure Reaktion der Lösung ganz gut aushält.

Gute Dienste leistete hier die Methode der frischen Lösungen, die auch in der gleichzeitig zu publizierenden Arbeit von S. Kostytschew und E. Tswetkowa über Nitratverarbeitung durch Pilze von großem Nutzen war. Die ursprüngliche Nährlösung wurde entfernt, die untere Fläche der Pilzdecke mit sterilisiertem Wasser wiederholt abgespült und eine frische Lösung desselben Nährstoffes hineingetan, wobei durch Zusatz von suspendiertem Calciumcarbonat, oder durch andere Maßnahmen die neutrale Reaktion gesichert war. Sämtliche hierzu gehörigen Manipulationen konnten unter aseptischen Kautelen bewerkstelligt werden. Methodische Hinweise werden in der vorstehend erwähnten Abhandlung von S. Kostytschew und M. Afanassjewa angegeben werden.

### 1. Kohlenstoffquelle d-Weinsäure.

Die Nährlösung enthielt pro Liter außer mineralischen Bestandteilen 30 g freie d-Weinsäure. Bei Sauerstoffzutritt waren zuckerartige Stoffe in der Lösung auch spurenweise nicht nachweisbar. Größere Mengen der Lösungen wurden mit NaOH neutral gemacht, bei vermindertem Druck eingengt, die Weinsäure mit Bleiacetat gefällt, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und mit Fehlingscher Lösung geprüft. Niemals wurde eine Reduktion von CuO wahrgenommen; auch Osazonproben fielen immer negativ aus. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß unter gewöhnlichen Kulturverhältnissen Zuckerveratmung mit größerer Geschwindigkeit als Zuckerbildung erfolgt. Die in frische Weinsäurelösung total versenkten Pilzdecken erzeugen dagegen Alkohol und Zucker. Bei vollkommenem Sauerstoffabschluß (im Wasserstoffe) findet Alkoholbildung nur in neutralen Lösungen der Tartrate statt. Sämtliche Alkoholbestimmungen wurden von Frl. M. Afanassjewa nach der bequemen und zuverlässigen Methode von M. Nicloux<sup>1)</sup> ausgeführt und in einzelnen Fällen durch pyknometrische Methode bestätigt.

<sup>1)</sup> M. Nicloux, Bull. de la soc. chim. Bd 35, S. 330 (1906).

Eine Kultur in Lösung von freier Weinsäure versenkt hat gebildet in 48 Stunden . . . . . 71 mg Alkohol.

Eine Kultur in Lösung von Weinsäure versenkt im Wasserstoff hat gebildet in 48 Stunden . . . . . 0 mg „

Eine Kultur bei neutraler Reaktion im Wasserstoffe hat gebildet in 48 Stunden 103 mg „

Mit Zuckerlösungen versetzt, erzeugten Weinsäurekulturen immer bedeutende Alkoholmengen.

Die Substrate von mehreren, auf Weinsäurelösungen bei Sauerstoffabschluß belassenen Kulturen zeigten nach der vorstehend beschriebenen Behandlung eine energische Reduktion der Fehlingschen Lösung. Nach Bearbeitung mit Phenylhydrazin in essigsauer Lösung auf dem Wasserbade bildete sich der kristallinische Niederschlag von Glukosazon. Er wurde abgesaugt, mit wenig Benzol gekocht, abfiltriert und schließlich aus 50%igem Alkohol unter tropfenweisem Zusatz von Pyridin umkristallisiert. Die Substanz schmolz scharf bei 205° unter Zersetzung.

#### Stickstoffbestimmung:

0,1324 g gaben 18,4 ccm N bei 18° und 733 mm.

$C_{18}H_{22}N_4O_4$ : Berechnet N = 15,64%, Gefunden N = 15,81%.

Diese Resultate zeigen, daß Glukosazon vorliegt. Der gebildete Zucker kann also entweder Glukose oder Fruktose sein. Durch Ermittlung der spezifischen Drehung wurde der Zucker als Glukose identifiziert:

1. Eine Zuckerbestimmung in 20 ccm Lösung nach G. Bertrand<sup>1)</sup> ergab: 20 ccm Lösung wurden mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und davon 20 ccm für die Analyse verwendet.  $C_u = 117,8$  mg; also Zucker als Glukose berechnet 63 mg oder 0,315%. Glukose in 20 ccm ursprünglicher Lösung 0,787%.

2. 20 ccm Zuckerlösung (Zuckergehalt 0,787%) drehte im 20 cm-Rohr 0,82° nach rechts.

$$(\alpha)_D = 52,1^\circ$$

$$\text{Glukose: } (\alpha)_D = 52,5^\circ$$

<sup>1)</sup> G. Bertrand, Bull. de la soc. chim. Bd. 35, S. 1285 (1906).

Die auf Weinsäure gezüchteten Pilzkulturen erzeugen also Traubenzucker. Der Mechanismus der Zuckerbildung bleibt einstweilen unbekannt, doch scheint die Möglichkeit der Auffindung der Zwischenprodukte auf Grund einiger Beobachtungen nicht ausgeschlossen zu sein.

## 2. Kohlenstoffquelle Glycerin.

Die Nährlösung enthielt pro Liter außer mineralischen Bestandteilen 30 g Glycerin.

Ebenso wie in der Weinsäureserie wurde keine Zuckerbildung bei normalen Verhältnissen wahrgenommen, die in Lösung versenkten Mycelien erzeugten aber Zucker und Alkohol, so z. B.:

Eine Kultur bei Luftmangel mit $\text{CaCO}_3$	Alkohol	135 mg.
Eine Kultur im Wasserstoffe	" "	104 "
" " " " ohne $\text{CaCO}_3$	" "	0 "
Id., aber Stickstoffquelle — Pepton	" "	155 "

Eine größere Menge der vereinigten Glycerinsubstrate wurde unter Zusatz von  $\text{CaCO}_3$  vorsichtig eingedampft, mit Bleiessig gereinigt und durch Schwefelwasserstoff entbleit. Das Filtrat vom Schwefelblei reduzierte stark  $\text{CuO}$ ; nach Bearbeitung mit Phenylhydrazin bei Siedehitze in essigsaurer Lösung bildete sich ein Osazon, welches nach der vorstehend beschriebenen Reinigung bei  $205^\circ$  unter Zersetzung schmolz.

### Stickstoffbestimmung:

0,1445 g gaben 20,0 ccm N bei  $17^\circ$  und 739 mm.

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ :	Berechnet	Gefunden
	N = 15,64%	N = 15,84%

Die Bestimmung der spezifischen Drehung ergab folgendes Resultat:

#### 1. Zuckerbestimmung nach G. Bertrand:

20 ccm Lösung gaben 98 mg Cu; Zucker als Glukose berechnet = 51,5 mg, oder 0,257%.

2. 20 ccm Zuckerlösung (Gehalt 0,257%) drehte im 20 cm - Rohr  $0,27^\circ$  nach rechts.

$$(\alpha)_D = 52,5^\circ.$$

$$\text{Glukose } (\alpha)_D = 52,5^\circ.$$

Auch auf Glycerinlösungen wird also Glukose gebildet. Es ist ziemlich wahrscheinlich, daß als intermediäres Produkt der Glukosebildung eine Triose entsteht, doch sind die Bedingungen der Triosebildung noch nicht in befriedigender Weise aufgeklärt. Die Arbeit von S. Kostytschew und E. Tswetkowa über die intermediären Produkte der Nitratassimilation durch Schimmelpilze zeigt, wie groß die Bedeutung der Versuchsdauer bei derartigen Forschungen ist. Nur einmal erhielt ich geringe Menge von einem Osazon, das in heißem Benzol gut löslich war. Aus Benzol umkristallisiert, zeigte die Substanz den Schmelzpunkt  $132^{\circ}$  und besaß die Kristallform des Trioseosazons. Die Zersetzung der Substanz erfolgte erst bei  $170^{\circ}$ , was ebenfalls den Eigenschaften des Trioseosazons entspricht. Für eine ausführlichere Untersuchung war die Menge der Substanz unzureichend.

### 3. Kohlenstoffquelle Chinasäure.

Die Nährlösung enthielt pro Liter außer mineralischen Bestandteilen 50 g freie Chinasäure.

Chinasäure ist eine ganz ausgezeichnete Nahrung für *Aspergillus niger*, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß sie ein sehr geeignetes Material für physiologische Zuckerbildung vorstellt. Bei tadellosem Luftzutritt wird zwar auch auf Chinasäure keine Spur von Zucker erzeugt, doch entsteht immer Zucker bei Luftmangel bzw. Luftabschluß. Unter anaeroben Verhältnissen wird auch Alkohol reichlich produziert, und zwar nicht nur bei neutraler, sondern auch bei saurer Reaktion:

Eine Kultur bei Luftmangel ohne  $\text{CaCO}_3$ , Alkohol 175 mg  
 Eine Kultur im Wasserstoffe ohne  $\text{CaCO}_3$ , „ 155 „

Durch die vorstehend beschriebene Behandlung der Substrate von den bei Luftabschluß belassenen Kulturen erhielt ich ein Osazon, das nach Abkochen mit Benzol und Umkristallisieren aus verdünntem, pyridinhaltigem Alkohol bei  $205^{\circ}$  schmolz.

Stickstoffbestimmung:

0,1227 g gaben 16,3 ccm N bei 16° und 748 mm.	
$C_{18}H_{22}N_4O_4$ : Berechnet	Gefunden
N = 15,64%.	N = 15,44%.

Die Veratmung von Chinasäure erfolgt also, allem Anschein nach, über die Zwischenstufe von Zucker. Schon längst habe ich darauf hingewiesen, daß *Aspergillus niger*, auf Chinasäure gezogen, eine CuO-reduzierende Substanz bei Sauerstoffabschluß erzeugt<sup>1)</sup>.

4. Kohlenstoffquelle Mannit.

Die Nährlösung enthielt außer mineralischen Bestandteilen pro Liter 50 g Mannit.

Auf Mannitlösungen entsteht Zucker nicht nur bei Sauerstoffabschluß, sondern auch bei Sauerstoffzutritt. Auch Alkohol wird bei Sauerstoffabschluß, allerdings in Gegenwart von  $CaCO_3$ , reichlich produziert. In einer bereits vor Jahren veröffentlichten Mitteilung habe ich darauf hingewiesen, daß Mannitkulturen von *Aspergillus niger* bei Sauerstoffabschluß zwar  $CO_2$  abscheiden, aber keine Alkoholbildung bewirken<sup>2)</sup>. Dies ist tatsächlich der Fall bei schwach saurer Reaktion der Lösung, die aber in Mannitkulturen von *Aspergillus niger* immer spontan entsteht. Auf diese Weise muß man ein Ausbleiben der Alkoholproduktion bei Luftabschluß immer mit Vorsicht beurteilen.

Eine Kultur im Wasserstoffe mit  $CaCO_3$  hat gebildet 222 mg Alkohol.

Das auf vorstehend beschriebene Weise erhaltene Osazon schmolz unter Zersetzung bei 204°—205°.

Stickstoffbestimmung:

0,1558 g gaben 21,2 ccm N bei 18° und 748 mm.	
$C_{18}H_{22}N_4O_4$ : Berechnet	Gefunden
N = 15,64%.	N = 15,71%.

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 40, S. 563 (1904).

<sup>2)</sup> S. Kostytschew, Bot. Ber. Bd. 25, S. 178 (1907).

Die Natur des Zuckers ist noch nicht festgestellt. Qualitative Proben sprechen dafür, daß Fruktose vorliegt, was auch vom chemischen Standpunkte aus das wahrscheinlichste wäre.

### 5. Kohlenstoffquelle Gärungsmilchsäure.

Die Nährlösung enthielt pro Liter außer mineralischen Bestandteilen 30 g freie Gärungsmilchsäure.

Milchsäurekulturen bildeten Zucker und Alkohol bei anaeroben Verhältnissen ebenfalls nur in Gegenwart von  $\text{CaCO}_3$ . Das Wachstum von *Aspergillus niger* auf Milchsäure war schwächer als auf vorstehend untersuchten Stoffen; die Zucker- und Alkoholproduktion waren daher auch unbedeutend.

Eine Kultur im Wasserstoffe mit  $\text{CaCO}_3$  ergab: Alkohol 39 mg  
 " " " " ohne  $\text{CaCO}_3$  " " " 0 "

Mit Zuckerlösungen versetzt, bewirkten Milchsäurekulturen immer eine lebhafte Alkoholbildung.

Das auf übliche Weise erhaltene und gereinigte Osazon schmolz bei  $205^\circ$ . Mit reinem Glukosazon gemischt, schmolz die Substanz ebenfalls bei  $205^\circ$ . Von einer ausführlicheren Untersuchung wurde wegen Mangel an Material Abstand genommen; soviel scheint aber deutlich zu sein, daß Milchsäure über die Zwischenstufe von Zucker veratmet wird. Dies steht wohl nicht im Einklange mit den Bestrebungen, die „Milchsäuretheorie“ der alkoholischen Gärung wieder zu beleben.

### 6. Kohlenstoffquelle Pepton.

Die Nährlösung enthielt pro Liter außer mineralischen Bestandteilen 30 g Witte-Pepton. Ammoniumnitrat wurde von den Mineralsalzen ausgeschlossen.

Es gelang mir nicht, eine Zuckerbildung in Peptonkulturen nachzuweisen; auch wurde keine Alkoholbildung bei Sauerstoffabschluß wahrgenommen, obgleich die Reaktion der Substrate immer neutral, oder schwach alkalisch war. Die alkalische Reaktion ist wohl auf eine sekundäre Ammoniakbildung zurückzuführen. Auch in Gegenwart von  $\text{CaCO}_3$  entstand keine Spur von Alkohol. Besonders beachtenswert scheint der Umstand zu sein, daß auch nach reichlicher Zuckergabe

(in Form von Traubenzucker) keine Alkoholbildung bei Sauerstoffabschluß zu verzeichnen war; erst nach kurzdauerndem Verweilen auf Zuckerlösungen bei vollem Luftzutritt haben Peptonkulturen im Wasserstoffe eine ausgiebige Alkoholproduktion bewirkt. Es ist also ersichtlich, daß Peptonkulturen an und für sich zymasefrei sind.

Vorstehend beschriebene Versuche zeigen also, daß mit verschiedenartigen stickstofffreien Stoffen ernährte Kulturen bei Sauerstoffmangel Zucker und Alkohol erzeugen. Es liegt also die Annahme nahe, daß in allen derartigen Fällen „Zuckeratmung“ vorliegt. Dagegen scheint es, daß stickstoffhaltige Stoffe aus der Gruppe der eiweißähnlichen Verbindungen auf eine eigentümliche Weise, und zwar nicht über die Zwischenstufe von Zucker, veratmet werden. Bereits früher habe ich darauf hingewiesen, daß die anaerobe Atmung der Pflanzen in manchen Fällen nicht als alkoholische Gärung anzusehen ist. Diesen Vorgang belegte ich mit dem Namen „anaerobe Atmung sensu stricto“; ein wohl nicht glücklich gewählter und unbestimmter Ausdruck! Besser scheint es mir jetzt, den betreffenden Vorgang als „Eiweißatmung“ zu bezeichnen. In der angekündigten Mitteilung von S. Kostytschew und M. Afanassjewa sollen sowohl „Zuckeratmung“ als „Eiweißatmung“ vom physiologischen Gesichtspunkte aus besprochen werden.

---