

**Zeitschrift:** Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse  
**Herausgeber:** Schweizerische Botanische Gesellschaft  
**Band:** 56 (1946)  
  
**Artikel:** Über die Bildung der Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*  
**Autor:** Galli, Adelheid  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-39756>

### **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:** 14.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Über die Bildung der Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*

Von *Adelheid Galli*.

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel.)

Eingegangen am 29. Januar 1946.

## Inhaltsübersicht.

Einleitung . . . . .	113
Kultivierung von <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	115
Bildung und Nachweis der Stoffwechselprodukte . . . . .	118
Abhängigkeit des Ascorbinsäuregehaltes von äußeren und inneren Bedingungen . . . . .	126
A. Einfluß äußerer Bedingungen auf den Gehalt an Ascorbinsäure . . . . .	127
1. Kohlenstoffquellen . . . . .	127
Ascorbinsäure als Nährstoff für <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	131
2. Nährsalze . . . . .	134
3. Wasserstoffionenkonzentration . . . . .	138
4. Temperatur . . . . .	139
5. Sauerstoffversorgung . . . . .	140
B. Einfluß innerer Bedingungen auf den Gehalt an Ascorbinsäure . . . . .	141
1. Verhalten einzelner <i>Aspergillus</i> -Rassen . . . . .	141
2. Abnahme und Regeneration des Bildungsvermögens . . . . .	142
3. Steigerung des Bildungsvermögens . . . . .	146
4. Bedeutung des Mycelwachstums . . . . .	148
C. Bildung eines Ascorbinsäureschutzstoffes durch <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	150
Diskussion der Ergebnisse . . . . .	157
A. Physiologische Bedingungen der Ascorbinsäurebildung . . . . .	160
1. Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung . . . . .	160
2. Bildungsort der Ascorbinsäure . . . . .	161
3. Abhängigkeit der Ascorbinsäureproduktion von den Lebens- bedingungen des Pilzes . . . . .	162
B. Über die Synthese der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> . . . . .	163
C. Stellung der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	168
Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse . . . . .	169
Zitierte Literatur . . . . .	171

## Einleitung.

Die Bedeutung der l-Ascorbinsäure als Vitamin für den Menschen hat zu einer sehr raschen Entwicklung ihrer technischen Synthesen geführt und den Anstoß zu überaus zahlreichen Untersuchungen über die Verbreitung und physiologische Funktion in Tieren und auch Pflanzen gegeben. Viele Organismen vermögen die für ihre Ernährung notwendige l-Ascorbinsäure in ihrem Stoffwechsel selbst zu bilden;



unter den Säugetieren z. B. gehören nur Reh, Meerschweinchen und Menschenaffe zu den wenigen Ausnahmen, die ebenso wie der Mensch auf Zufuhr von außen angewiesen sind, für die also l-Ascorbinsäure *Vitamin*-Charakter besitzt (Zeller, 1944).

In der Literatur sind viele Angaben über das Vorkommen meist geringer Mengen von Ascorbinsäure in den Organen höherer Pflanzen zu finden (z. B. Strohecker, 1935, Daniel und Munsell, 1937, Glick, 1937, Hörmann, 1941); es ist jedoch fraglich, ob die angewandten Untersuchungsmethoden immer spezifisch genug waren, um einen sicheren Nachweis von l-Ascorbinsäure zu erlauben. Über die Abhängigkeit des Ascorbinsäuregehaltes von verschiedenen Bedingungen berichten die Arbeiten von Virtanen und Mitarbeiter (1933), von Hausen (1936), Bonner (1937, 1938) und von Mirimanoff (1941). Die meisten Untersuchungen wurden an *grünen* Pflanzen durchgeführt: Giroud und seine Mitarbeiter (1934, 1935) und Bukatsch (1939, 1940) befaßten sich mit den Funktionen der Ascorbinsäure im Protoplasma und mit ihrem Einfluß auf die Photosynthese. Von Hausen (1936), Havas (1935) und Bonner J. und D. (1938) fanden, daß die Ascorbinsäure das Wachstum und die Zellteilung fördert. Im allgemeinen wurde festgestellt, daß hohe Ascorbinsäurekonzentrationen in Organen großer biologischer Aktivität häufig anzutreffen sind, während ruhende Teile meistens keine oder nur Spuren Ascorbinsäure enthalten.

Die spezielle Bedeutung der l-Ascorbinsäure im Zelleben ist bis heute noch ungeklärt; auch zu einer Theorie ihrer Bildung in der Pflanze sind nur Ansätze vorhanden. Nach Moldtmann (1939) enthält eine Pflanze um so mehr Ascorbinsäure, je größer die in ihr gebildete Menge an Glucose ist. Sugawara (1939, 1941) und Reid (1942) stellten ebenfalls eine Beziehung zwischen Assimilation und Ascorbinsäuregehalt fest: Die Konzentration an Ascorbinsäure nimmt zu, wenn die Assimilation durch Änderung der Licht-Intensität oder -Wellenlänge gesteigert wird. Über die Bildung von Ascorbinsäure in auf Nährlösungen wachsenden Keimlingen und in abgeschnittenen Blättern bei Zugabe verschiedener Kohlehydrate (Mannose, Glucose, Sorbose usw.) liegen widersprechende Literaturangaben vor (Sah, 1933, Ray, 1934, Guha und Ghosh, 1935, Tadokoro und Ito, 1938, Reid und Weintraub, 1939, Rubin und Mitarbeiter, 1939, und Sugawara, 1941).

Während nach den bisherigen Untersuchungen grüne Pflanzen wohl allgemein zur Bildung von Ascorbinsäure befähigt scheinen, soll die Fähigkeit zur Synthese bei den heterotrophen Pflanzen nicht vorhanden sein.

Die Gewinnung einer Anzahl Stoffwechselprodukte von *Penicillium*-Arten, die strukturelle Analogien zur Ascorbinsäure aufweisen (Birkinshaw, Clutterbeck, Raistrick und Mitarbeiter, 1933 bis 1936, und Kashevnik, 1937, in seinen Arbeiten über den japanischen

Teepilz), deutet jedoch darauf hin, daß wohl auch das Auftreten von Ascorbinsäure in Kulturlösungen von Pilzen eine gewisse Wahrscheinlichkeit besitzt. In einer Arbeit von Bernhauer (1936b) über die Bildung stark reduzierender Substanzen durch *Aspergillus*-Arten wird denn auch vermutet, daß es sich dabei um Ascorbinsäure handeln könnte.

Über die tatsächliche *Isolierung* von Ascorbinsäure aus Pilzgärlösungen ist dagegen bis jetzt noch nicht berichtet worden. Sollte die genauere Analyse solcher Verbindungen ergeben, daß Schimmelpilze tatsächlich Ascorbinsäure zu bilden vermögen, dann wäre ein Versuchsobjekt gefunden, an dem *die pflanzliche Synthese dieses Stoffes relativ leicht* zu verfolgen wäre. Denn erstens können die Ausgangsbedingungen eindeutig festgelegt werden, da die Schimmelpilze auf chemisch wohl definierten Nährlösungen wachsen und keine durch Photosynthese entstandenen Kohlehydrate als zusätzliches Ausgangsmaterial für die Ascorbinsäurebildung auftreten; zweitens wird die Ascorbinsäure in relativ kurzer Zeit gebildet; drittens stellt die Ascorbinsäuremenge in der Kulturlösung als Summe der Ascorbinsäureproduktion einer großen Zahl *einzelner* Pilzhyphen bereits einen Mittelwert dar. Deshalb stimmen auch die Ascorbinsäurewerte verschiedener Parallelversuche gut überein (s. S. 127); und schließlich beeinflußt nach Steinberg (1939), Robbins und Kavanagh (1942) und Schopfer (1943) die Ascorbinsäure im Gegensatz zu andern Wirkstoffen (s. z. B. Fries, 1938) normalerweise das Wachstum der Pilze nicht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist darum zu untersuchen, ob sich unter den von den Schimmelpilzen produzierten stark reduzierenden Stoffen auch *l-Ascorbinsäure* findet, diese gegebenenfalls zu isolieren und die *Bedingungen ihrer Bildung* im Stoffwechsel von *Aspergillus niger* zu studieren<sup>1</sup>.

### Kultivierung von *Aspergillus niger*.

Nach den Beobachtungen Bernhauers (1936b) bildet *Aspergillus niger*, wenn er auf stark sauren Rohrzuckerlösungen wächst, reduzierende, mit 2,6-Dichlorphenolindophenol (Tillmans Reagens) titrierbare Substanzen. In Anlehnung an diese Arbeit wurde als Versuchsobjekt ebenfalls *Aspergillus niger* verwendet. Seine Aufzucht erfolgte nach den üblichen Methoden (s. z. B. Bernhauer, 1936a, 1939a, 1941).

Von *Aspergillus niger* standen mehrere Stämme zur Verfügung, die aus Luft isoliert und teilweise schon längere Zeit im hiesigen Botanischen Institut bei Zimmertemperatur in Kultur gehalten worden waren. Von diesen Stämmen wurden Konidiosporen auf Bierwürzeagar (ungehopfte Bierwürze mit Wasser verdünnt bis zu einem Zuckergehalt von

<sup>1</sup> Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit ist bereits erschienen (s. Geiger-Huber und Galli, 1944, 1945).



ca. 5 % und mit 1,5 % Agar versetzt; pH 5) übertragen, und zwar in Verdünnungsreihen (s. Janke und Zickes, 1928), so daß zuletzt *reine* Stammkulturen resultierten; die einzelnen Stämme wurden mit A<sub>1</sub> bis A<sub>8</sub> bezeichnet. Die Sporenbildung erfolgte im Thermostaten bei 29° bis 30° C in drei Tagen. Danach wurden die Agarkulturen im Dunkeln und bei tieferer Temperatur teils bei 10—15° C, teils im Kühlschrank bei 5° C, aufbewahrt. Alle 6—8 Wochen, wenn nötig schon vorher, wurden sämtliche Kulturen auf frischen Bierwürzeagar übergeimpft.

Beim *Impfen* der verschiedenen Pilz-Nährlösungen für die *Versuche* ist besonders auf eine *genaue* Dosierung des Impfgutes zu achten; denn ungleiche Mycelbildung würde jeden Vergleich der Mengen gebildeter Stoffwechselprodukte von vornherein unsicher machen. Es wurde darum mit einer geeichten Platinöse (1 Öse ca. 5 Mill. Sporen) oder noch besser mit einer homogenen Sporenaufschwemmung geimpft. Diese wurde durch Ausspülen eines Agarröhrchens mit 15 bis 20 cc sterilen Wassers gewonnen; 1 cc dieser Suspension wurde jeweils zu 100 cc Kulturlösung pipettiert. Diese Dosierung erwies sich als die günstigste für eine schnelle Entwicklung der Mycelien, was für eine gute Säurebildung ja von Bedeutung sein soll (Bernhauer und Mitarb., 1936 a, 1941, Perquin, 1938). Das Alter der Sporen hatte auch nach unseren Erfahrungen wenig Einfluß auf die « oxydative Gärung »; immerhin verwendet man am besten zwei bis drei Wochen alte Stammkulturen.

Als *Kulturflüssigkeit* für die Pilze diente die von Bernhauer (1936 b) für die Bildung von Säuren (Zitronensäure, Gluconsäure usw.) als besonders geeignet angegebene Nährlösung folgender Zusammensetzung:

20	%	Rohrzucker <sup>1</sup>
0,2	%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
0,1	%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,025	%	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O

Rohrzucker und Nährsalze wurden getrennt in frisch destilliertem oder auch zweimal (in Glas) destilliertem Wasser<sup>2</sup> gelöst, die Lösungen vereinigt und eine Stunde lang in strömendem Dampf sterilisiert und dann mit 2n-HCl auf ein pH von 2,0—2,3 eingestellt.

Pro Fernbachkolben zu 300 cc wurden 100 cc Nährlösung verwendet<sup>3</sup> und das Kulturgefäß mit Watte verschlossen. Während des Ver-

<sup>1</sup> Rohrzucker des Handels (auf Cu-Freiheit geprüft); Nährsalze: Kahlbaumpräparate pro analysi.

<sup>2</sup> Schwermetallionen, vor allem Cu-Ionen beschleunigen bekanntlich die Oxydation der Ascorbinsäure; zweimal destilliertes Wasser enthält praktisch keine Cu-Ionen mehr.

<sup>3</sup> Für alle Versuche wurden stets dieselben schon oftmals gebrauchten Kolben (gleicher Herkunft, gleichen Alters, gleicher Vorbehandlung) aus FZ-Glas verwendet, da Glas Wachstum und Säurebildung beträchtlich beeinflussen kann (s. z. B. Lappalainen, 1919).

Vor jedem Versuch wurden die Kulturgefäße mit einem Gemisch von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und HNO<sub>3</sub> gereinigt (s. a. Würzler, 1942, S. 240).

suches befanden sich die Kolben im Thermostaten bei einer Temperatur von 28° bis 30° C.

Einen Tag nach Aussaat der Sporen begann sich, von den Sporen ausgehend, ein dünner, spinnwebartiger Mycelüberzug auf der Flüssigkeitsoberfläche auszubreiten (s. Fig. 1). Nach zwei bis drei Tagen war

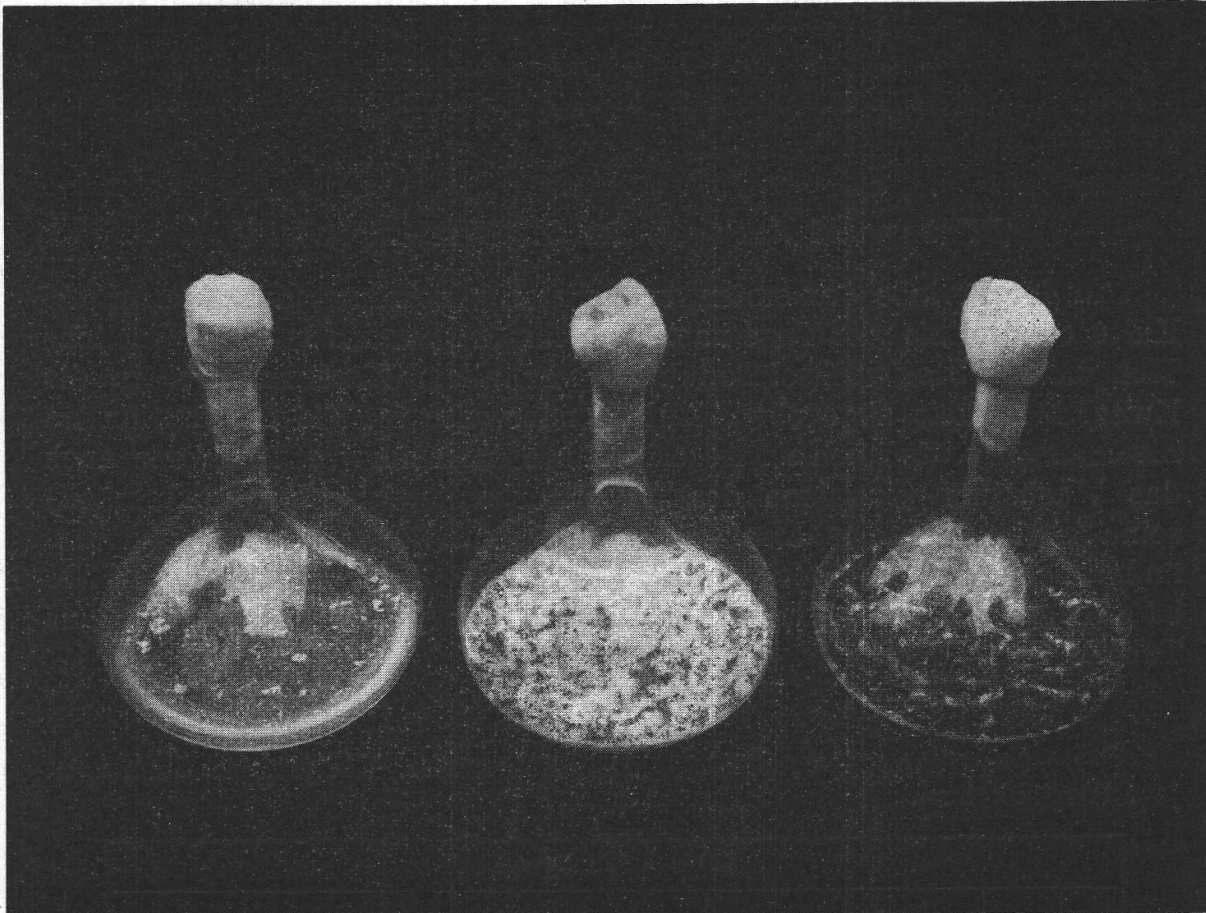


Fig. 1.

Wachstum von *Aspergillus niger* A<sub>7</sub> unter den Bedingungen der Ascorbinsäure-Bildung.

Vers. 65 : von links nach rechts : 1, 7, 10 Tage alt. Temp. 30° C, pH 2,25, 15 % Rohrzucker, Mineralsalze.

die ganze Oberfläche bedeckt; gleichzeitig wurde das Mycel dicker und stark gefaltet. Die obere Seite der Myceldecke war samtglatt und rein weiß, die Unterseite mit scharfkantigen Falten versehen, bei den Stämmen A<sub>1</sub> bis A<sub>6</sub> und A<sub>8</sub> weiß und schleimig, bei A<sub>7</sub> schwach gelblich und nicht schleimig. Die Sporen entstanden bei A<sub>7</sub> im allgemeinen erst nach sieben bis zehn Tagen und nur in geringer Menge, während die andern Stämme schon nach zwei bis drei Tagen starke Sporenbildung zeigten. Die im Aussehen der Pilzdecken stark voneinander abweichenden Stämme unterschieden sich auch durch das Mycel-Trockengewicht, das



bei A<sub>7</sub> bedeutend größer war als bei den anderen Stämmen. Die Pilzdecke von Stamm A<sub>8</sub> glich mehr derjenigen von Stamm A<sub>7</sub>. Unter dem Mikroskop waren die Mycelien und Sporen der einzelnen Stämme kaum zu unterscheiden.

Die Entnahme von Proben der Kulturflüssigkeit erfolgte mit steriler Pipette ( $\frac{1}{2}$  Stunde auf 180° C erhitzt) unter möglicher *Schonung* der Pilzdecke. Nach Abbruch der Versuche wurden die Pilzdecken durch Hitzesterilisation abgetötet, dann abgepreßt, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz bei 100 bis 105° C getrocknet.

### Bildung und Nachweis der Stoffwechselprodukte.

In der Periode des ersten, schnellsten Wachstums der *Aspergillus*-Kulturen, drei bis vier Tage nach dem Impfen, werden bereits erhebliche Mengen an Stoffwechselprodukten, vor allem Zitronensäure, in die Kulturflüssigkeit abgegeben. Auffallenderweise ist die Produktion an Zitronensäure wie auch an Ascorbinsäure dann am größten, wenn auch das Wachstum (Zunahme des Myceltrockengewichts pro Zeiteinheit) seine höchsten Werte erreicht. Das Gesamtbild der Konzentrationsänderungen der Stoffwechselprodukte in der Kulturflüssigkeit in Abhängigkeit von Zeit, Zuckerverbrauch und Wachstum ergibt sich aus Tabelle 1:

Tabelle 1.

Vers. 34: Temp. 30° C, pH 2,20, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>, je 4 Parallelkolben.

In 100 cc Kulturlösung						
Zeit Tage	Mycel- trocken- gewicht g	Zucker- verbrauch <sup>1</sup> g	pH <sup>2</sup>	Zitronensäure <sup>3</sup> g (ohne H <sub>2</sub> O)	Ascorbin- säure <sup>4</sup> mg	CO <sub>2</sub> <sup>5</sup> g
2	0,50	4,0	1,80	0	0	—
4	—	—	—	—	—	2,30
5	—	6,2	1,70	0,28	2,45	—
8	2,20	8,8	1,90	0,35	3,42	6,11
10	2,30	9,2	2,25	0,40	3,40	8,00
13	2,50	10,8	2,35	0,35	1,80	—
18	2,60	11,4	2,40	0,40	1,10	—
23	3,00	13,9	2,40	0,35	0,44	—

<sup>1</sup> Bestimmt nach *Fehling* oder *Bertrand*.

<sup>2</sup> Kolorimetrisch bestimmt (im *Bjerrum*-Keil mit Indikatoren nach *Clark* und *Lubs*).

In der letzten Kolonne ist noch die Menge  $\text{CO}_2$  aufgeführt, die von den Pilzen in die Umgebung abgegeben wird. Stellen wir z. B. für den zehnten Tag eine *Kohlenstoff-Bilanz* auf, so sieht man, daß von den

3,87 g in Form von Rohrzucker aufgenommenen *Kohlenstoffs*

1,15 g (30 %) C zum Mycelaufbau (Mycel: ca. 50 % C, experimentell bestimmt)

0,15 g (4 %) C zur Bildung von Zitronensäure und

2,20 g (57 %) C zur Bildung von 8,00 g  $\text{CO}_2$

verwendet worden sind. Die Menge des aufgenommenen Kohlenstoffs stimmt, unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen der einzelnen Bestimmungen (die C-Menge der gebildeten Ascorbinsäure kann vernachlässigt werden), mit der Summe der C-Gehalte der Stoffwechselprodukte und des Mycels annähernd überein. Es sind somit sicher keine in wesentlichen Mengen auftretende Stoffwechselprodukte der Analyse entgangen.

Neben *Rohrzucker* oder ähnlichen Kohlehydraten (s. S. 128), die also laut C-Bilanz einerseits als Rohstoffquellen für den Mycelaufbau, andererseits zur Säurebildung und in ihrer Hauptmenge durch Verbrennen zu  $\text{CO}_2$  als Energielieferanten für sämtliche Lebensvorgänge dienen, werden noch geringe Mengen von *Nährsalzen*, vor allem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aufgenommen. Mit der Nährsalzaufnahme hängt die pH-Verschiebung zusammen; denn es läßt sich leicht zeigen (mit Neßlers- und Diphenylamin-Reagens), daß von den beiden Ionen  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_3^-$  das Kation schneller aufgenommen wird und die zurückbleibende Salpetersäure in den ersten Tagen des Wachstums eine Erniedrigung des pH verursacht (s. S. 136).

Über die *Säurebildung* von Schimmelpilzen liegen sehr viele Literaturangaben vor: Außer Zitronensäure, deren Bildung am häufigsten untersucht worden ist (Literaturzusammenstellung s. Bernhauer, 1939 b), werden Ameisen-, Essig- und Milchsäure, Oxal-, Fumar- und Weinsäure, Glyoxyl-, Bernstein-, Äpfel-, Malon- und Gluconsäure als Stoffwechselprodukte von unter verschiedensten Bedingungen wachsenden *Aspergillus*-Arten erwähnt.

Zum *qualitativen* Nachweis dieser Säuren in den Kulturlösungen von *Aspergillus niger* wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Bernhauer (1932) und nach Angaben aus Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse (1932 a) folgender Trennungsgang zusammengestellt:

---

<sup>3</sup> Titration mit n/10 NaOH (Thymolphthalein als Indikator).

<sup>4</sup> Titration mit *Tillmans* Reagens (1 cc m/1000 = 0,088 mg Ascorbinsäure).

<sup>5</sup>  $\text{CO}_2$ -freier Luftstrom durch Versuchskolben passieren lassen und  $\text{CO}_2$  in titrierter  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (0,5n) in Pettenkofer'schen Absorptionsröhren aufzufangen und nach *Treadwell* (1930) titriert.



Mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und mit Wasserdampf destilliert ( $40^\circ \text{C}$ , im Vakuum)

*Destillat*

1. Ameisensäure
2. Essigsäure
3. Milchsäure

*Rückstand*

auf 1/20 Mol Säure (mit 5n-KOH titrimetrisch bestimmt) werden bei  $70^\circ \text{C}$  35 cc  $\text{CaCl}_2$  (10 % ig) und Na-acetat zugegeben:

Der Niederschlag enthält die Ca-Salze von:

**Oxal-, Fumar- und Weinsäure.**

Aus dem *Filtrat* wird mit Ammoniak folgender Niederschlag gefällt:

Ca-Salz von **Glyoxylsäure**: Eine Probe mit verd.  $\text{HNO}_3$  oxydiert, gibt Oxalsäure.

Ca-Salz von **Zitronensäure**: Mit Äthylalkohol und wenig  $\text{H}_2\text{SO}_4$  verestert: Sdp. des Zitronensäure-äthylesters  $170^\circ \text{C}$  (15 mm). Mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zersetzt und anhydriert: Zitronensäureanhydrid, sublimiert bei 15 mm bei  $170\text{—}180^\circ \text{C}$ .

Ca-Salz der **Bernsteinsäure**: Äthylester der Bernsteinsäure: Sdp.  $104\text{—}105^\circ/15 \text{ mm}$ . Bernsteinsäureanhydrid sublimiert bei  $130^\circ/15 \text{ mm}$ .

Das *Filtrat* kann enthalten:

**Milchsäure**: Mit wenig  $\text{KMnO}_4$  zu Acetaldehyd oxydiert: (Geruch; Dinitrophenylhydrazon).

**Äpfelsäure**: Mit Überschuß an  $\text{KMnO}_4$  zu Acetaldehyd oxydiert: (s. oben).

**Gluconsäure**: Fällt beim Versetzen mit 96 % igem Alkohol aus und kann als Phenylhydrazid, Smp.  $194\text{—}196^\circ$  identifiziert werden<sup>1</sup>.

**Malonsäure**: Zu deren Nachweis wird die ursprüngliche Lösung verwendet. Eine Probe mit Essigsäureanhydrid erwärmt, ergibt grünliche Fluoreszenz.

Von all diesen Säuren werden von *Aspergillus niger* unter den für die Ascorbinsäurebildung günstigsten Bedingungen nur **Zitronensäure** und **Gluconsäure** gebildet, und zwar von den Stämmen  $A_1$  bis  $A_6$  und  $A_8$  beide Säuren nebeneinander, von  $A_7$  nur Zitronensäure.

Zur *quantitativen* Bestimmung von Zitronensäure und Gluconsäure nebeneinander kann der Löslichkeitsunterschied ihrer Ca-Salze in Alkohol (s. Bernhauer, 1939 a), von Zitronensäure allein die Pentabromaceton-Methode (modifizierte Methode von Kunz nach Frey; Titration nach Kometiani, s. Bernhauer, 1939 a) oder eben-

<sup>1</sup> E. Fischer (1890).

falls eine Ca-Salzmethode (s. Bernhauer, 1939a) benützt werden. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt:

Tabelle 2.

In 100 cc Kulturlösung				
Pilzstamm	g Zitronensäure <sup>1</sup>			g Gluconsäure <sup>1</sup>
	bestimmt als		berechnet aus	bestimmt als
	Ca-Salz	Pentabrom- aceton	Titration	Ca-Salz
A <sub>2</sub>	8,78 ± 0,18	9,20 ± 0,27	10,36 ± 0,06	0,54
A <sub>5</sub>	8,65 ± 0,18	8,70 ± 0,27	9,73 ± 0,06	0,45
A <sub>7</sub>	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,48 ± 0,005	0,0

Da die Ca-Salzmethode die genauesten Werte lieferte (Fehler der Bestimmung 2 %, experimentell aus Vergleichsversuchen erhalten), wurde sie im folgenden fast ausschließlich verwendet. Nur wo ein rascher Überblick genügte, wurden die Säuren gesamthaft acidimetrisch titriert.

Es bleibt nun noch übrig, die in geringer Menge vorhandene Ascorbinsäure in den *stark reduzierenden* Substanzen, die bei den Versuchskulturen von *Aspergillus niger*, ähnlich wie bei denjenigen Bernhauers (1936 b), nur in etwas kleinerer Konzentration, auftreten, zu isolieren und zu identifizieren.

Vorversuche hatten ergeben, daß Kulturen vom Stamm A<sub>7</sub> auf den oben beschriebenen Nährlösungen bei 28—29° C ungefähr zwischen dem achten und zehnten Tag nach dem Impfen die größte Konzentration reduzierender Substanzen enthalten.

4 cc dieser Kulturlösung mit 1,5 cc 80prozentiger Essigsäure versetzt (pH 1,5—2,0), verbrauchen 1,90 cc 0,001 molarer 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung (Tillmans Reagens). Das würde einem Gehalt von  $4,18 \pm 0,024$  mg Ascorbinsäure pro 100 cc Kulturlösung entsprechen<sup>2</sup>.

Die Isolierung so kleiner Anteile von Ascorbinsäure neben relativ großen Mengen von ähnlich reagierenden Stoffen, wie Rohrzucker und Zitronensäure, schien zunächst fast unmöglich. Die bekannte Methode von Reichstein (1934) zur Trennung der Ascorbinsäure von verschiedenen Zuckern mit Hilfe ihrer verschiedenen Löslichkeit in absolu-

<sup>1</sup> Mittelwerte  $\pm m$  von 5—8 Bestimmungen.

<sup>2</sup> Kontrollversuche mit eingewogenen Ascorbinsäuremengen ergaben eine Genauigkeit der Bestimmung von 5—0,5 % bei 0,25—50 mg Ascorbinsäure pro 100 cc Lösung und Titration mit 0,001 molarer Farbstofflösung. Dabei wurde immer solange Farbstoff zugegeben, bis die Farbe 30 sec bestehen blieb. Mit dieser Methode konnten noch 0,008 mg Ascorbinsäure in 4 cc Kulturlösung erfaßt werden.



tem Äther und Alkohol zeigte sich in einem Modellversuch für den vorliegenden Fall als unbrauchbar. Der Löslichkeitsunterschied von Fructose (der Restzucker in der Kulturlösung besteht zur Hauptsache aus *Fructose*) und Ascorbinsäure in absolutem Alkohol und Äther ist so klein, daß bei diesen Mengenverhältnissen mehrmals gefällt und wieder aufgelöst werden müßte. Bei einmaliger Fällung gehen aber schon fast drei Viertel der eingewogenen Ascorbinsäuremenge durch Oxydation an der Luft verloren.

Eine Möglichkeit zur *Abtrennung* der *Ascorbinsäure* von dem großen Überschuß an Kohlehydraten gibt in unserem Falle die für analytische Zwecke sonst lästige Erscheinung der leichten *Adsorbierbarkeit* von Ascorbinsäure an voluminösen Niederschlägen<sup>1</sup>. Man kann nämlich einfach die Zitronensäure mit Bleiacetat in den Kulturlösungen bei einem pH von 2 ausfällen, wobei *die Ascorbinsäure an dem Niederschlag adsorbiert* wird und die weniger leicht adsorbierbaren Zucker ausgewaschen werden können. Die Adsorption ist natürlich stark abhängig von der Körnigkeit des Niederschlages und damit von den Versuchsbedingungen, unter denen die Fällung erzeugt wird. Die Bleisalze fallen auch bei scheinbar genauestem Einhalten der Fällungsbedingungen nicht immer in der gleichen Feinkörnigkeit aus, so daß die Ascorbinsäure manchmal nur ungenügend adsorbiert wird. Der Niederschlag mit der adsorbierten Ascorbinsäure muß sehr *rasch* weiter verarbeitet werden; denn die adsorbierte und damit fein verteilte Ascorbinsäure wird an dem fast trockenen Niederschlag vom Luftsauerstoff schnell oxydiert und zerstört. Folgende Arbeitsweise ergibt für den Nachweis als Dinitrophenylosazon ausreichende Mengen Ascorbinsäure:

Die Kulturlösungen einer Versuchsreihe mit 15 Kolben werden filtriert und vereinigt:

Volumen . . . . .	1500 cc
Zuckergehalt in g . . .	4,5 %
Zitronensäure in g . . .	7,0 %
Gluconsäure in g . . .	0,4 %
Ascorbinsäure . . . . .	40—50 mg (titr.!)
pH . . . . .	1,9

Diese Lösung wird im Vakuum bei max. 40° unter Durchleiten von CO<sub>2</sub> in ca. zwei Stunden auf 800 cc eingedampft<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Über die Adsorption von Ascorbinsäure an Stoffen als Trennungsmethode liegen in der Literatur nur Angaben von *Kuhn* und *Gerhard* (1943) vor, die Versuche anstellten über Adsorption von Ascorbinsäure an vorbehandelter Kohle, ohne jedoch zu befriedigenden Resultaten zu gelangen.

<sup>2</sup> Statt CO<sub>2</sub> kann auch einfach Luft durch die Lösung gesaugt werden, ohne daß merkliche Mengen Ascorbinsäure oxydiert werden. (Infolge der vom Pilz gebildeten Schutzstoffe s. S. 150.)

Die eingeeengte Lösung wird mit Pb-Acetat versetzt, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr erzeugt (ca. 160 g), der sehr voluminöse, feinkörnige Niederschlag abgesaugt und mit wenig H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. (Im Filtrat befinden sich noch ca. 10 mg Ascorbinsäure.) Der Niederschlag, an dem die Hauptmenge Ascorbinsäure adsorbiert ist, wird in H<sub>2</sub>O dest. aufgeschlämmt und mit H<sub>2</sub>S zersetzt. (Zimmertemperatur, Schütteln.) Vom neuen Niederschlag von PbS wird abgesaugt und sehr gut mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen; denn diesmal soll die Adsorption von Ascorbinsäure *verhindert* werden. Die 500 cc Filtrat plus Waschwasser müssen noch auf die Hälfte eingeeengt (bei 40° im Vakuum) und der zurückgebliebene H<sub>2</sub>S durch CO<sub>2</sub> verdrängt werden, dann kann die Ascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach A m m o n (1936 a, b) gefällt werden.

Zu den 250 cc Lösung wird 40 cc 2n-HCl und eine Lösung von 0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 cc 2n-HCl zugegeben und drei Tage im Thermostaten bei 30° C stehengelassen: Voluminöser roter Niederschlag mit H<sub>2</sub>O dest. (bis säurefrei) und mit eiskaltem Alkohol (96 %) gewaschen, Smp. 230—270° C (40 mg). Niederschlag aus Alkohol-Aceton umkristallisieren (für 10 mg Ascorbinsäure ca. 30 cc Alkohol): Smp. 276—279° C (unkorr., unter Zersetzung), Ausbeute 20 mg:  $[\alpha]_D^{16} = +166^\circ \pm 20^\circ$  ( $c = 0,090$  in Pyridin-Eisessig) 1,800 mg Substanz zu 2,000 cc;  $l = 1$  dm;  $[\alpha]_D^{16} = +0,15^\circ \pm 0,02^\circ$  (nach A m m o n [1936]  $[\alpha]_D = +170$ — $250^\circ$  je nach Fällung, und für d-Araboascorbinsäure  $[\alpha]_D = -284^\circ$ ).

Das Osazon bildet feine, ineinandergreifende Nadelchen und zeigt keine Schmelzpunktsdepression mit dem Osazon der synthetischen Ascorbinsäure.

Zur Analyse wurde nochmals aus Alkohol umkristallisiert, Smp. 290° C (auf dem K o f l e r - Block bestimmt und korrigiert) und im Hochvakuum bei 90° C eine Stunde getrocknet<sup>1</sup>.

3,294 mg Subst. gaben 4,884 mg CO<sub>2</sub> und 0,785 mg H<sub>2</sub>O

2,195 » » » 0,408 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 727 mm)

C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>12</sub>N<sub>8</sub> (534) Ber. C 40,44 H 2,64 N 20,97 %

Gef. C 40,46 H 2,67 N 20,86 %

Wäre *Aspergillus niger* befähigt, außer aus Rohrzucker auch aus anderen C-Körpern, wie z. B. aus Zuckeralkoholen oder aus Glyzerin Ascorbinsäure zu bilden, so könnte die Schwierigkeit einer Trennung dieser Säure von den chemisch nahe verwandten Hexosen umgangen und die Aufarbeitung wesentlich vereinfacht werden. Die Versuche B e r n h a u e r s (1936 b), der auf Glyzerinlösungen eine Ausbeute an reduzierenden Substanzen bis zu 13 mg % erhielt, konnten jedoch bei

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. T. Reichstein sei an dieser Stelle für die Unterstützung bei der Reinigung des Osazons und für die Vermittlung der Mikroanalyse bestens gedankt.



unsern Pilzstämmen nicht reproduziert werden — es entstanden nur ca. 2 mg%. Trotz der geringen Ascorbinsäurekonzentration gelang es aber dennoch, die Ascorbinsäure als 2,4-Dinitrophenylosazon in folgender Weise zu isolieren:

1500 cc Kulturlösung mit 1,4 g% Zitronensäure und 27 mg Ascorbinsäure wurden auf ein geringes Volumen (280 cc) im Vakuum eingedampft, mit 25 cc 2n-HCl und 0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 50 cc 2n-HCl versetzt. Nach zweitägigem Stehen im Thermostaten bei 30° C entstand ein braunroter Niederschlag; 35 mg; Smp. unscharf 130—230° C; keine einheitliche Substanz. Zur Reinigung wurde der Niederschlag zuerst mit eiskaltem Alkohol, dann mit Alkohol von 18° (je 5 cc), danach mit Oxalsäureäthylester von 20° (5 cc) geschüttelt und einmal aus 10 cc Oxalsäureäthylester umkristallisiert und mit eiskaltem Alkohol gewaschen. Der braunrote Niederschlag wurde nochmals als Alkohol umkristallisiert. Feine, kurze Nadelchen 6,8 mg Smp. 278—280° C (Zersetzung). Keine Schmelzpunktdepression mit reinem Ascorbinsäure-Osazon.

Eine genaue *quantitative* Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes der Kulturlösungen ist sehr schwierig. Alle Aufarbeitungsmethoden, die längere Zeit beanspruchen, ergeben zu kleine Werte, weil die Ascorbinsäure durch Oxydation an der Luft sehr rasch zerstört wird. Bei der Adsorptionsmethode geht zudem noch ein Teil der Ascorbinsäure wegen der unvollständigen Adsorption verloren. In Modellversuchen mit eingewogener Ascorbinsäure wird weniger Ascorbinsäure adsorbiert, wahrscheinlich weil das Fehlen kolloidaler, von den Pilzen ausgeschiedener Stoffe den Bleicitrat-Niederschlag zu grobkörnig werden läßt. Es ist darum nicht möglich, durch Vergleich der in diesen Modellversuchen erhaltenen Ascorbinsäurewerte mit den aus Pilzversuchen gewonnenen, die Ascorbinsäure quantitativ zu bestimmen.

Die Titration mit Dichlorphenolindophenol, vorausgesetzt daß sie bei niedrigem pH und sehr schnell durchgeführt wird (Devjatnin und Doroschenko, 1935, Gstirner, 1939), liefert annähernd genaue Resultate, in manchen Fällen jedoch sicher zu große Werte; denn sie erfaßt außer der Ascorbinsäure alle Stoffe, die ein gleiches oder noch größeres Reduktionsvermögen als diese besitzen<sup>1</sup>. Solche Stoffe

<sup>1</sup> Wenn ein Teil der Ascorbinsäure als *Dehydroascorbinsäure* in der Kulturlösung vorhanden wäre, so würde der Titrationswert mit Tillmans Reagens wieder zu klein ausfallen. Zur Prüfung auf Dehydroascorbinsäure wurde eine zehntägige Kulturlösung in zwei Teile geteilt, der eine Teil mit H<sub>2</sub>S behandelt (wodurch allfällig vorhandene Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure reduziert würde) und beide Teile getrennt titriert. Sie lieferten die gleichen Titer-Werte; es befinden sich also keine *wesentlichen* Mengen Dehydroascorbinsäure in der Kulturlösung.

Im gleichen Sinn, aber noch stärker als die Tillman-Titration wird die Jodtitration verfälscht. Jod hat ja ein bedeutend größeres Oxydationsvermögen als Dichlorphenolindophenol.

(z. B. Sulfhydrylkomponenten, Reduktone, Reduktinsäure und Melanoide) gibt es zwar nur wenige, doch ist ihr Vorkommen gerade in Pilzgärlösungen nicht unwahrscheinlich (H e r m a n n u. Mitarb., 1935, F u k u m u t o u. Mitarb., 1937, M a n c e a u u. Mitarb., 1938, E n d e r s, 1943). Aus der Tatsache, daß diese stark reduzierenden Substanzen sich mit Formaldehyd kondensieren lassen, und zwar die Gruppe der Sulfhydrylkomponenten bei pH 0,6, die Ascorbinsäure bei pH 2,0 und die Reduktone bei noch höherem pH, ergibt sich die Möglichkeit, auch in einem solchen Gemisch die Ascorbinsäure für sich zu titrieren. Diese Methode wurde von L u g g (1942), M a p s o n (1943) und W o k e s u. Mitarb. (1943) ausgearbeitet; sie ergibt für unsere Versuche, daß von den mit Tillmans Reagens bestimmten Mengen reduzierender Substanzen zwischen 50 bis 90 % voraussichtlich Ascorbinsäure sind.

Eine weitere Methode zur quantitativen Bestimmung und *Identifizierung* der Ascorbinsäure neben Reduktonen usw. stellt der *Tierversuch* dar. Mit Hilfe des Skorbut-Testes am Meerschweinchen konnte festgestellt werden, daß die wahre Ascorbinsäurekonzentration in den Kulturlösungen etwa 40 % bis 60 % der durch Tillmans Titration erhaltenen Konzentration entspricht.

Konzentrate von Kulturlösungen, die pro 100 cc ca. 62—64 mg Ascorbinsäure (titr.), ca. 45 g Zucker, etwa 9 g Zitronensäure enthielten, wurden speziell vorbereiteten Meerschweinchen per os verabreicht, und zwar täglich 0,5—2 cc der dick sirupösen Lösung. Zur Kontrolle dienten Meerschweinchen, denen man die gleiche Lösung, in der aber die Ascorbinsäure durch Durchleiten von Luft zerstört worden war, verfütterte. Die Kontrolltiere starben alle nach starker Gewichtsabnahme an akutem Skorbut. Die Lösung mit Ascorbinsäure dagegen vermochte in Dosen von 2,0 cc maximales Wachstum hervorzurufen, Dosen von 1,0 cc verursachten Gewichtsstillstand und solche von 0,5 cc Gewichtsabnahme.<sup>1</sup>

Ob dieses Verhältnis von Ascorbinsäure zu anderen, stark reduzierenden Substanzen immer dasselbe war, wurde nicht untersucht. Da es im folgenden nur auf die Relativkonzentrationen in verschiedenen Kulturlösungen und zu verschiedenen Zeiten ankommt, sind stets die aus der einfach und rasch durchführbaren Tillman-Titration berechneten Werte angegeben. Für die Beurteilung der *absoluten* Menge vorhandener Ascorbinsäure ist jeweils zu berücksichtigen, daß diese Werte bis zu 50 % zu hoch sein können.

Nachdem das Auftreten von l-Ascorbinsäure in der Kulturlösung von *Aspergillus niger* eindeutig *bewiesen* ist, können die Bedingungen der Ascorbinsäurebildung im Pilzstoffwechsel näher untersucht werden.

<sup>1</sup> Der Chemischen Fabrik *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel*, sei auch hier für die Durchführung der Tierversuche bestens gedankt.



### Abhängigkeit des Ascorbinsäuregehaltes in der Kulturlösung von äußeren und inneren Bedingungen.

Wie schon aus der Tabelle 1 hervorgeht, steigt der Gehalt an Ascorbinsäure in der Kulturlösung mit fortschreitendem Wachstum der Pilzdecke bis zu einem Maximalwert, der in sieben bis zehn Tagen erreicht wird, und nimmt dann wieder ab (Fig. 2). Es wäre unrichtig, diese Kurve der Bildungskurve gleichzusetzen; denn die auftretenden Ascorbinsäurekonzentrationen werden nicht nur durch die *Bildung*, sondern auch durch den eventuellen *Verbrauch* und durch die unbiologische

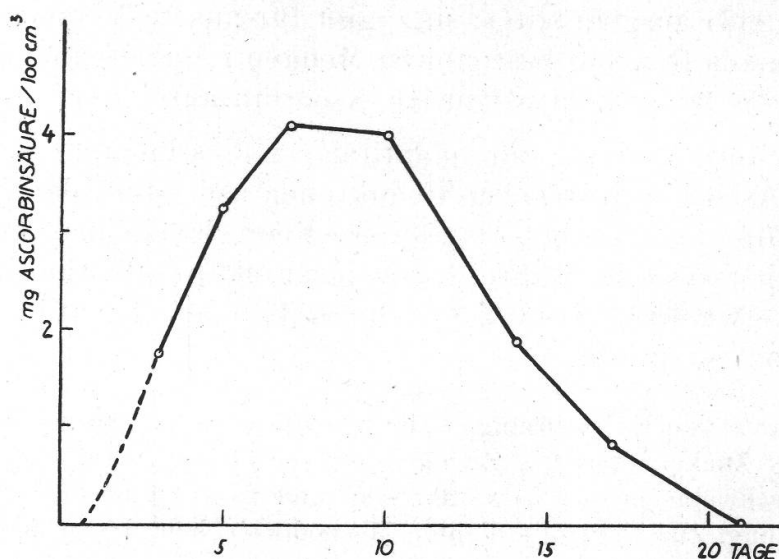


Fig. 2.

Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung von *Aspergillus niger*.  
Temp. 28—29° C, pH 2,4, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>, 4 Parallelkolben.

*Luftoxydation* bestimmt. Wie festgestellt wurde, (s. S. 160), nimmt *Aspergillus niger* die Ascorbinsäure nicht auf, solange noch eine andere, geeignetere C-Quelle vorhanden ist, so daß sich der zeitliche Kurvenverlauf des Ascorbinsäuregehaltes aus der Bildung und Oxydation zusammensetzt. Eine Trennung dieser beiden Vorgänge in die Einzelreaktionen ist nicht einfach (s. a. S. 157 ff.), da die Beständigkeit der Ascorbinsäure in den Kulturlösungen (worauf später zurückgekommen wird) gegenüber derjenigen einer wässrigen Ascorbinsäurelösung stark verändert ist. Daher sind alle späteren Angaben über die *Bildung* der Ascorbinsäure mit einer gewissen Einschränkung zu interpretieren.

Im folgenden soll der Einfluß der *äußeren* und der *inneren* Bedingungen auf den Gehalt an Ascorbinsäure in der Kulturlösung untersucht werden. Als äußere Bedingungen werden wohl definierte Außenfaktoren wie Nährlösung, Temperatur, pH- und O<sub>2</sub>-Druck bezeichnet, im Gegensatz

zu den inneren Bedingungen, die sich aus der Rassenzugehörigkeit und dem verschiedenen physiologischen Verhalten von *Aspergillus* ergeben.

Ein Vergleich von z. B. zwei Ascorbinsäurewerten, die unter verschiedenen Bedingungen zustande gekommen sind, wird erst sinnvoll, wenn die *Streuung* der Einzelwerte bedeutend kleiner als die Differenz der beiden Werte ist (s. z. B. Fisher, 1938). Wir können nicht von vornherein sagen, ob diese Bedingung erfüllt ist; denn auch eine qualitativ und quantitativ gleichmäßige Aussaat von Sporen in die Nährlösung sichert noch keine statistische Einheitlichkeit, weil nicht alle Sporen keimen und die entstehenden Myceldecken sich unter ausgesprochen heterogenen (untergetauchtes, absterbendes Mycel usw.) Bedingungen befinden und daher individuelle Eigenschaften aufweisen. Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, ist jedoch die mittlere Abweichung der Ascorbinsäure- und Zitronensäurewerte gering (ca. 4 %, und wenn man den experimentellen Fehler der Titrationen berücksichtigt, sogar nur ca. 3 %), und die Einzelwerte verteilen sich zudem entsprechend einer Binominalkurve um den Mittelwert, so daß im allgemeinen drei bis vier Parallelkolben bei vergleichenden Messungen den statistischen Anforderungen genügen<sup>1</sup>. Die im folgenden angegebenen Zahlenwerte sind daher Mittelwerte aus an drei bis vier Kulturlösungen gewonnenen Einzelbestimmungen.

Tabelle 3.

Titrationswerte aus 20 parallel geführten 7 Tage alten Kulturlösungen	
NaOH n/10 1 cc Kulturlösung	Tillmans Reagens n/1000 4 cc Lösung
max. Wert = 1,00 min. Wert = 0,60 $M \pm m = 0,92 \pm 0,038$	max. Wert = 1,27 min. Wert = 0,78 $M \pm m = 1,05 \pm 0,042^*$

$$* m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}; \sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}};$$

d = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert M;

n = Anzahl der Einzelwerte.

#### A. Einfluß äußerer Bedingungen auf den Gehalt an Ascorbinsäure.

1. *Kohlenstoffquellen*: Die Eignung verschiedener C-Quellen zur Bildung von Ascorbinsäure durch *Aspergillus niger* ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

<sup>1</sup> Aus diesem Grunde wurde davon abgesehen, die Schüttelmethode nach Kluyver (1933) zu verwenden, da diese trotz der Homogenität der Pilzkulturen für meine Versuche auch beträchtliche Nachteile aufweist; z. B. ist die O<sub>2</sub>-Versorgung mangelhaft.



Tabelle 4.

Vers. 79: Temp. 30° C, pH 2,25, Mineralsalze, C-Quelle. Stamm A<sub>7</sub>

mg Ascorbinsäure/100 cc <sup>1</sup>							
C-Quelle	Tage						Myceltrocken- gewicht (g) <sup>2</sup>
Qualität <sup>3</sup>	3	7	11	14	26	32	
Stärke . . . . . 5%	0	0	0	0			1,50
Rohrzucker (a) . . . 15%	1,10	2,20	2,64	0,88			2,70
Rohrzucker (b) . . . 15%	0,99	2,30	2,76	0,65			2,65
Maltose . . . . . 15%	0,80	0,80	0,88	0,66			1,80
Lactose . . . . . 15%	0	0	0	0			0,72
d-Glucose . . . . . 15%	0,95	1,60	2,10	0,90			2,00
d-Fructose . . . . . 15%	0,45	1,80	2,00	1,20			2,05
d-Galactose . . . . . 15%	—	0,75	1,00	0,64			1,83
d-Mannose . . . . . 15%	0,70	0,70	0,44	0			1,50
l-Sorbose . . . . . 15%	0	1,44	1,77	1,48			1,10
d-Sorbit . . . . . 15%	0	0,30	0	0			2,30
d-Mannit . . . . . 15%	0	0,45	0,45	0			3,00
d-Xylose . . . . . 15%	0	0,40	0,55	0,35			2,00
Glycerin . . . . . 15%	0	0	0	0,72	1,64	1,44	2,60
d, l-Glycerin- aldehyd . . . . . 15%	0	1,02	1,82	1,64	0,84	—	2,20
Zitronensäure . . . . 5%	0	0	0	0	0	0	0,02
Oxalsäure . . . . . 5%	0	0	0	0	0	0	0

Die vergleichenden Versuche mit verschiedenen Zuckerarten ergaben eine wesentliche Überlegenheit des Rohrzuckers; dann folgten Glucose, Fructose und l-Sorbose (von den Inversionsprodukten des Rohrzuckers wurde zuerst die Glucose aufgenommen, so daß der Restzucker am Ende des Versuches zu 90 % aus Fructose bestand [bestimmt nach Ost-Nyin, Klein, 1932] b). Auf Lactose und Stärke fand zwar Wachstum statt; aber es zeigte sich weder eine Ascorbinsäure- noch eine Zitronensäurebildung. Bei Verwendung von andern Zuckern und Zuckeralkoholen war trotz des relativ guten Wachstums die Ascorbinsäureausbeute sehr gering. Zitronensäure entstand bei allen Versuchen mit den verschiedensten C-Quellen; jedoch meist nur in Spuren. Mehr (0,2 bis 0,4 g/100 cc) bildete *Aspergillus niger* A<sub>7</sub> aus Rohrzucker, Glucose, Fructose und l-Sorbose, die sich auch als Ausgangsstoffe für die Ascorbinsäureproduktion am günstigsten erwiesen. In Kulturlösun-

<sup>1</sup> 1 cc m/1000 2,6-Dichlorphenolindophenol = 0,088 mg Ascorbinsäure.

<sup>2</sup> Bestimmt nach 14 bzw. 32 Tagen.

<sup>3</sup> F.-Hoffmann-La-Roche-Präparat: l-Sorbose; Handelspräparat: Rohrzucker (a); die anderen Substanzen sind entweder Siegfried- oder Kahlbaum-Präparate.

gen mit Xylose als C-Quelle wurde *keine* Zitronensäure, dagegen geringe Mengen von *Oxalsäure* ausgeschieden<sup>1</sup>.

Aus Glycerinaldehyd entstand Ascorbinsäure in derselben Größenordnung wie aus l-Sorbose. Glycerin dagegen konnte von *Aspergillus niger* weniger gut zur Ascorbinsäurebildung ausgenützt werden, auch nicht in Konzentrationen von 4 bis 10 %, die osmotisch den 15 % Rohrzucker besser entsprechen würden (s. Tabelle 5).

Tabelle 5.

Vers. 6/13 : Temp. 29° C, pH 2,35, Mineralsalze, Glycerin 4—15 %, Stamm A7.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc			
	Anfangskonzentration an Glycerin			
	4 %	7 %	10 %	15 %
14	0	0	0	0,60
18	0	0	0	1,23
26	0	0,88	0,88	1,80
32	0,60	0,97	1,58	—

Im Parallelversuch mit 20 % Rohrzucker (isotonisch mit 7 %igem Glycerin) fand sich folgender Gehalt an Ascorbinsäure : am 3. Tage : 0,94, am 7. : 2,45, am 10. : 3,00, am 16. : 2,80.

Der Gehalt an Ascorbinsäure vergrößerte sich auch nicht, wenn der Versuch bis zu ca. 50 Tagen ausgedehnt und dabei 70 bis 90 % des Glycerins verbraucht wurde. Das Mycel entwickelte sich zu einer dicken und warzig aufgeblähten Pilzdecke (Trockengewicht 2,6 g bei 15 % Glycerin). Zitronensäure fand sich in einer Menge von 1,4 % vor.

Von den beiden Säuren konnte die Oxalsäure überhaupt nicht, die Zitronensäure nur in einem sehr geringen Maße zum Mycelaufbau verwertet werden.

Neben der Struktur der C-Quelle ist auch ihre Konzentration für die Höhe des Ascorbinsäuregehaltes ausschlaggebend. Mit steigenden Rohrzuckermengen z. B. nimmt die Ascorbinsäurekonzentration folgendermaßen zu<sup>2</sup> (s. Tabelle 6).

Im Gegensatz zu sämtlichen untersuchten Kohlenstoffquellen stand die 2-Keto-l-gulonsäure: Obwohl das Wachstum nur mäßig war (0,9 bis 1,3 g Myceltrockengewicht), vermochte der Pilz aus ihr ein *Vielfaches* der üblichen Ascorbinsäuremenge zu bilden (s. Tabelle 7).

<sup>1</sup> Die verschiedenen Rassen von *Aspergillus niger* bilden verschieden viel Zitronensäure wie auch Ascorbinsäure (s. S. 142).

<sup>2</sup> S. auch Geiger-Huber und Galli, 1944, S. 41, Vers. 19.



Tabelle 6.

Vers. 68 : Temp. 29° C, pH 2,25, Mineralsalze, Rohrzucker 5—25 %, Stamm A<sub>7</sub>.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc				
	Anfangskonzentration an Rohrzucker				
	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
3	0	0,20	0,70	0,64	1,10
5	0,25	0,77	1,42	1,70	1,50
8	0,30	1,10	2,64	2,64	2,75
10	0,30	0,89	2,75	2,85	1,84
15	0	0,68	0,79	0,55	1,10

Tabelle 7.

Vers. 80 : Temp. 30° C, pH 2,25, resp. 1,40, Mineralsalze, 15 % Ketogulonsäure, 3 Parallelkolben, m = ± 0,5—4,5.

Ketogulonsäure nach dem Sterilisieren der Kulturlösung zugesetzt. Die unter den Versuchsbedingungen auch ohne Anwesenheit des Pilzes entstehende Ascorbinsäuremenge (bis zu ca. 50 mg/100 cc) wurde im Blindversuch ermittelt und berücksichtigt.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc	
	pH	
	2,25	1,40
4	2,5	—
6	11,7	2,7
8	22,3	—
10	31,7	30,4
13	35,2	61,4
15	45,7	78,8
17	52,0	95,9
21	63,8	97,0
27	55,5	47,5

Der zeitliche Verlauf, der durch Fig. 3 veranschaulicht wird, ergibt wie bei Rohrzucker-Nährlösungen eine Optimumkurve; der Anstieg erfolgt jedoch langsamer; das Maximum wird erst in zwanzig Tagen erreicht.

Zitronensäure trat in der Kulturlösung nur in Spuren auf.

*Ascorbinsäure als Nährstoff für Aspergillus niger:*

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß auch die Ascorbinsäure dem Pilz als *Kohlenstoffquelle* dienen kann, wenn sie als *einzig*e C-Quelle vorhanden ist. Sie tritt hier als *Nährstoff* auf, eine physiologische Funktion, die im allgemeinen den Vitaminen abge-

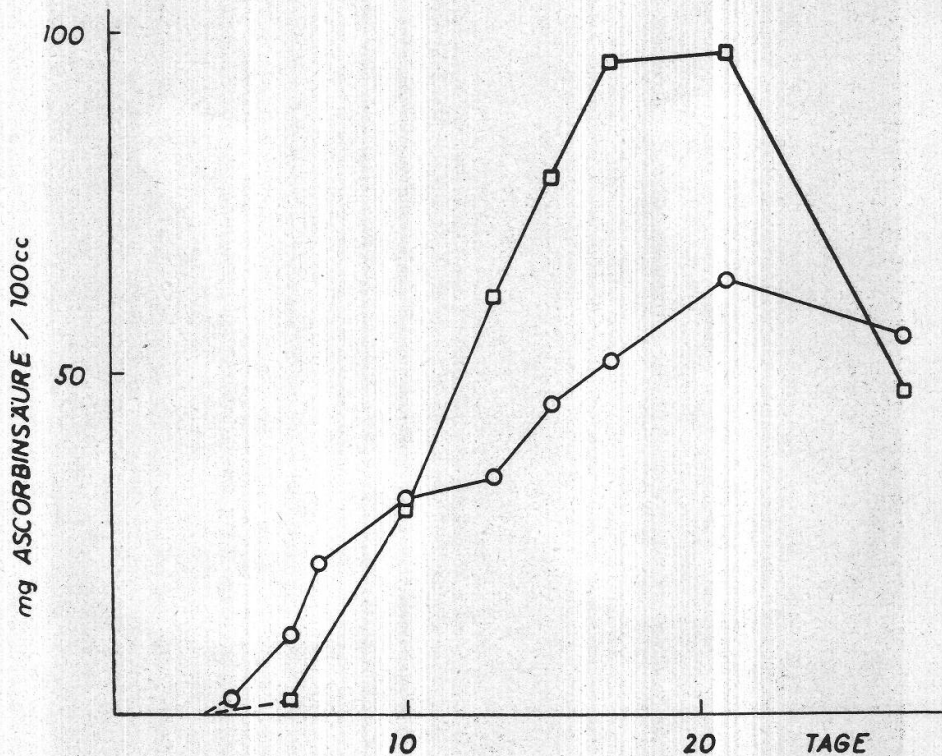


Fig. 3.

Der Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung mit 2-Keto-l-gulonsäure als C-Quelle.

- Ascorbinsäuregehalt bei pH 2,25.
- Ascorbinsäuregehalt bei pH 1,40.

Vers. 80 : Versuchsanordnung s. S. 130.

sprochen wird. Die nahe chemische Verwandtschaft der Ascorbinsäure mit den Hexosen macht dieses Ergebnis jedoch durchaus verständlich.

Nach Aussaat der Sporen von *Aspergillus niger* auf Nährlösungen, die als *einzig*e Kohlenstoffquelle Ascorbinsäure in verschiedenen Konzentrationen (0,25 bis 7,0 %) enthielten, begann sich nach ca. vier Tagen eine sehr dünne, schleimige und durchsichtige Myceldecke zu bilden (Fig. 4)<sup>1</sup>.

Nach ca. zwei bis drei Wochen Kulturdauer erreichte das Mycel das größte Trockengewicht (0,03 bis 0,06 g), das auch durch länger fortge-

<sup>1</sup> S. auch Geiger-Huber und Galli, 1944, Abb. 2.



setzte Versuche nicht mehr anstieg, und bei allen Ascorbinsäurekonzentrationen die gleiche Größenordnung aufwies. Die Sporenbildung war sehr gering. Über die Ascorbinsäureabnahme orientiert folgendes Beispiel (s. Tabelle 8).

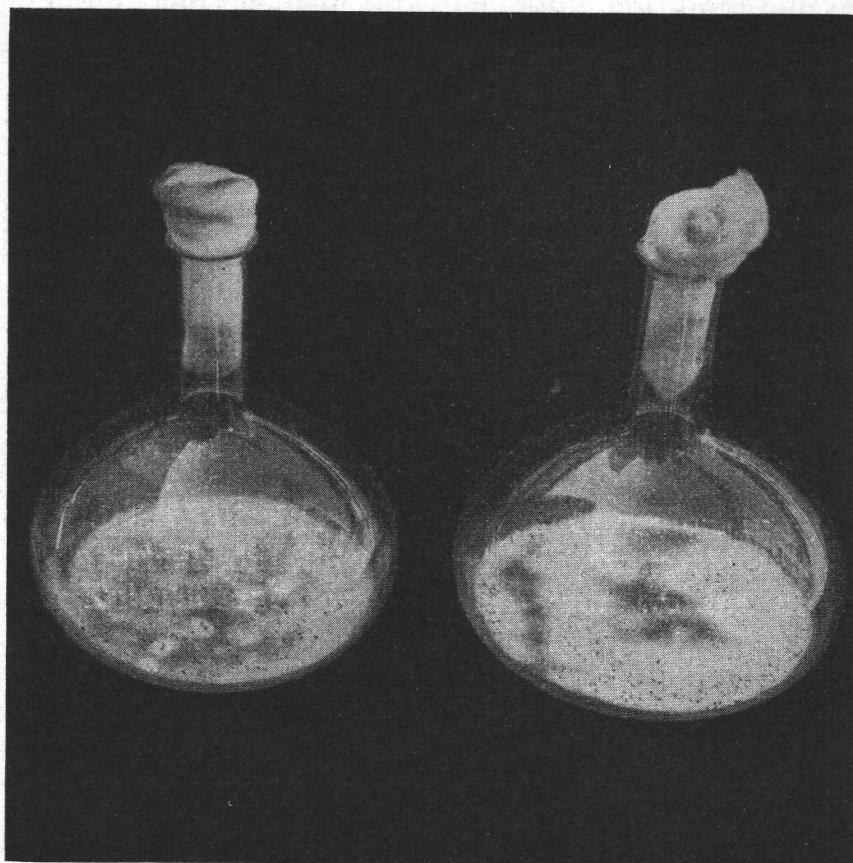


Fig. 4.

Wachstum von *Aspergillus niger* auf Ascorbinsäure.

Vers. 46 : 5% Ascorbinsäure, Temp. 30° C, pH 2,25, Stamm A<sub>7</sub>,  
phot. am 17. Versuchstage.

Mineralsalze, links : 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,25% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O;  
1,0% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Mineralsalze, rechts : 0,8% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O;  
1,6% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen zeigte der Ascorbinsäuregehalt stets eine Abnahme zwischen 180 bis 300 mg (im Versuch V), gleichgültig in welcher Konzentration die Ascorbinsäure als C-Quelle geboten und gleichgültig, ob der Versuch auf 14 oder 45 Tage ausgedehnt wurde.

Die 180 bis 300 mg Ascorbinsäure werden zum Aufbau der 0,03 bis 0,06 g Mycel in annähernd gleichem Prozentsatz ausgenutzt wie Rohrzucker oder Glycerin in entsprechenden Versuchen; d. h. der ökonomi-

Tabelle 8.

Vers. 5: Temp. 29° C, pH 2,0—2,2, Mineralsalze, Ascorbinsäure 0,25%, 0,5%, 1,0%, Stamm A<sub>7</sub>. Neben den Versuchen mit *Aspergillus niger* (V) wurde je ein Kontrollversuch (K) unbeimpft gelassen. Die Sterilisation geschah durch Bakterienfilter.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc					
	Konzentration an Ascorbinsäure					
	0,25 %		0,5 %		1,0 %	
	K	V	K	V	K	V
0	255	255	493	493	968	968
7	176	208	317	352	707	933
9	57	110	158	282	457	827
14	9	75	53	237	176	784

Die Beständigkeit der Ascorbinsäure ist im Kontrollversuch (K) viel geringer als beim Versuch mit Pilzmycel (V), was mit der Bildung von Schutzstoffen zusammenhängt (s. S. 150).

*sche Koeffizient* (Trockengewicht des gebildeten Mycels durch Menge der verbrauchten Kohlenstoffquelle) ist für die Ernährung mit Rohrzucker, Glycerin oder Ascorbinsäure in allen Fällen ungefähr gleich:

Tabelle 9.

Ökonomische Koeffizienten		
Rohrzucker	Glycerin	Ascorbinsäure
0,21 (20% A <sub>7</sub> )	0,20 (15% A <sub>7</sub> )	0,13 (2% A <sub>7</sub> )
0,14 (20% A <sub>5</sub> )	0,14 (15% A <sub>7</sub> )	0,15 (5% A <sub>7</sub> )
0,13 (20% A <sub>2</sub> )		0,15 (7% A <sub>7</sub> )
0,08 (20% A <sub>5</sub> )		

Die in Klammern gesetzten Werte geben die Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle und den verwendeten Stamm von *Aspergillus niger* an. Die Werte für die ökonomischen Koeffizienten der Ascorbinsäure stellen ein Minimum dar, da im Verbrauch auch die durch unbiologische Luftoxydation zerstörte Ascorbinsäuremenge enthalten ist.

Für die Beurteilung der Eignung einer Substanz als Nährstoff für *Aspergillus niger* kann der ökonomische Koeffizient *allein* natürlich nicht maßgebend sein, da er nur angibt, in welchem Verhältnis die Kohlenstoffquelle für den Mycelaufbau und für andere Reaktionen (Energiegewinnung durch CO<sub>2</sub>-Bildung, Säurebildung usw.) verbraucht wird, aber nicht den *absoluten Umsatz der C-Quelle* berücksichtigt. Von der gesamten dem Pilz zur Verfügung gestellten Ascorbinsäuremenge wird nämlich nur ein *kleiner Bruchteil* (ca.  $\frac{1}{20}$ ) aufgenommen, so daß



das Gesamtgewicht des gebildeten Mycels weit unter dem bei Rohrzuckerversuchen erreichten liegt. Wählt man für das Wachstum günstigere Bedingungen, z. B. achtfache Nährsalzkonzentration und pH 4,0, dann ändert sich weder die Mycelbildung noch der Ascorbinsäureverbrauch; nur die Sporenbildung ist bei pH 4,0 viel stärker. Die Ascorbinsäure ist also für die Ernährung von *Aspergillus niger*, besonders für die Erzielung einer hohen Stoffproduktion, bedeutend weniger geeignet als Rohrzucker und Glycerin.

Die Kulturlösung am Ende des Versuches enthielt neben kleinen Mengen Zitronensäure noch größere Mengen an Oxalsäure, die aber, wie sich später herausstellte, kein Produkt des Pilzstoffwechsels darstellt, sondern beim Stehenlassen der ascorbinsäurehaltigen Kulturlösung oder bei ihrer chemischen Aufarbeitung entstand. Da nach dem ökonomischen Koeffizienten die Ascorbinsäure im gleichen Mengenverhältnis wie Rohrzucker und Glycerin zum Aufbau der Mycelsubstanz dient, der Zitronensäuregehalt aber geringer ist wie der aus der entsprechenden Menge Rohrzucker gebildete, verwendet der Pilz offenbar die übrige Ascorbinsäure für seinen Energiehaushalt, wobei als Endprodukt  $\text{CO}_2$  entsteht.

2. Nährsalze: Die für starke Zitronensäurebildung günstige Nährlösung (s. Bernhauer, 1936 a) enthält die Nährsalze in geringer Konzentration (s. S. 116). Um die für die Ascorbinsäureproduktion günstigsten Mengenverhältnisse der Nährsalze festzustellen, wurden die einzelnen Ionenkonzentrationen systematisch variiert. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 10 ersichtlich.

Die Ascorbinsäuremenge in der Kulturlösung bleibt bei Erhöhung der Konzentrationen der  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -Ionen auf das Vier- bis Sechsfache ziemlich konstant, während die optimale Wirkung der  $\text{Mg}^{++}$ - und  $\text{SO}_4^{--}$ -Ionen in einem engeren Konzentrationsbereich liegt.

Die Stickstoff-Quelle nimmt unter den Nährsalzen eine Sonderstellung ein; ihre Bedeutung für die Ascorbinsäurebildung übertrifft die der anderen Nährsalze bei weitem. Es wird nämlich überhaupt nur Ascorbinsäure gebildet, solange die Nährlösung Stickstoffverbindungen enthält, die vom Pilz aufgenommen werden können. Wenn beispielsweise alles  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  der Normalkulturlösung aufgebraucht ist, dann hört die Ascorbinsäureproduktion auf, der Ascorbinsäuregehalt der Kulturlösung sinkt vom achten bis zum zehnten Tag an langsam ab, entsprechend der Oxydation durch die Luft (s. z. B. Fig. 2). Erneuert man die N-Quelle in diesem Zeitpunkt, dann steigt der Ascorbinsäuregehalt nochmals an, wie folgende Kurve veranschaulicht (Fig. 5).

Ein Verfielfachen der Anfangskonzentration von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in der Nährlösung bewirkt ebenfalls eine Erhöhung und zugleich eine zeitliche Verschiebung des Maximums der Ascorbinsäuremenge. Die folgende Tabelle 11 soll als Beispiel mehrerer Versuchsreihen, deren Resultate

Tabelle 10.

Vers. 97: Versuchsobjekt: ausgewachsene Pilzdecke von A<sub>7</sub> (10 Tage alt, Mycel-trockengewicht zirka 1,9 g), unterschichtet mit 20% Rohrzucker, Mineralsalzen in 100 cc H<sub>2</sub>O; pH 2,25, Temp. 30° C. Bei Änderung der Konzentration eines Ions wurde das fehlende Ion durch äquivalente Zugabe eines anderen Ions bis zu dem Gehalt der Grundlösung ergänzt. Eine Verminderung von K<sup>+</sup>- und Mg<sup>++</sup>-Ionen wurde durch Na<sup>+</sup>-Ionen, von H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Ionen durch Cl<sup>-</sup>-Ionen ausgeglichen.

mg Ascorbinsäure/100 cc					
Konzentration an Mg, S, K, P	Tage				
	4	7	9	12	14
Mg 0,0010 %	1,43	2,86	—	1,98	0,88
0,0025 %	1,43	3,41	—	1,98	1,10
0,010 %	1,54	3,96	—	2,42	1,54
0,020 %	1,54	3,96	—	4,62	4,40
S 0,0011 %	2,64	5,61	—	5,50	4,84
0,0033 %	1,43	3,41	—	1,98	1,10
0,013 %	1,54	2,20	—	1,10	0,66
0,026 %	0,88	1,32	—	0,55	0,44
K 0,015 %	1,21	2,20	3,40	3,40	2,40
0,028 %	1,43	2,20	2,00	1,32	0,66
0,060 %	1,32	2,20	3,00	2,60	2,09
0,100 %	1,10	1,32	1,10	0,88	0,44
P 0,010 %	1,10	2,20	1,87	1,65	0,44
0,023 %	1,43	2,20	2,00	1,32	0,66
0,050 %	0,88	1,54	1,54	0,88	0,88
0,100 %	1,21	2,09	2,46	1,43	0,44
0,140 %	0,66	0,99	1,23	0,44	0,45

Die Schwankungen der Ascorbinsäurewerte bei der K<sup>+</sup>-Ionen-Zugabe zwischen 0,015 und 0,060% K ließen sich in anderen Versuchsreihen nicht reproduzieren.

Der Pilzdeckenzuwachs betrug bei allen Versuchen zirka 3,0 g. Lediglich bei der höchsten SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration nahm das Mycel nur um zirka 1,5 g zu. Die Zitronensäurebildung blieb durch diese Versuchsänderung unbeeinflusst.

zwar gleichsinnig sind, deren Werte jedoch bis zu 75 % voneinander abweichen, über den Ascorbinsäuregehalt in Abhängigkeit von den NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Konzentrationen orientieren.

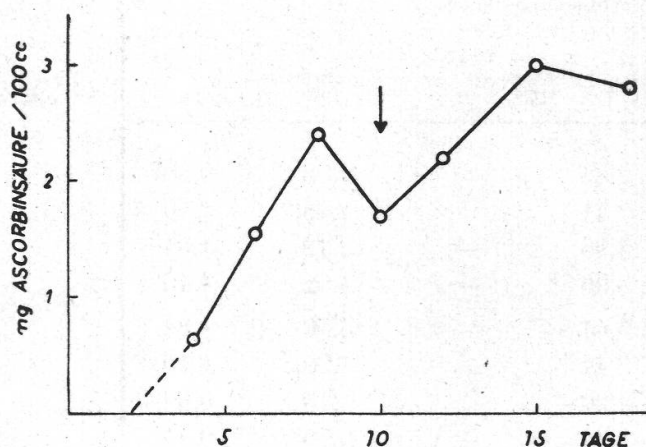
Eine Steigerung der Ionenkonzentrationen auf das Vierfache förderte die Ascorbinsäurebildung, noch höhere Konzentrationen ließen sie dagegen unbeeinflusst, beeinträchtigten aber die Mycelbildung: Die Pilzdecken wurden schleimig, ihr Trockengewicht geringer. Die Zitronensäurebildung blieb bis zu einer Erhöhung der NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Konzentration auf das Vierfache konstant (0,64 g/100 cc), bei noch größeren NH<sub>4</sub>-NO<sub>3</sub>-Gaben nahm sie ab (bis zu 0,27 g/100 cc), dafür traten geringe Mengen von Gluconsäure in der Kulturlösung auf.



Ein Teil des Anstiegs der Ascorbinsäureproduktion und die zeitliche Verschiebung des Optimums bei den vier- bis zwölffachen Ionenkonzentrationen entstand durch die pH-Verschiebung nach unten. Durch Kon-

Fig. 5.

Einfluß des  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  auf den Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung.



*Vers. 39a* : Zu einer 10tägigen Kulturlösung (Zuckerverbrauch 9,8%, Pilzdecke 2,3 g, pH 2,20, Temp. 30° Celsius, Ascorbinsäuregehalt 1,70 mg [im Abnehmen]) wurden nochmals 0,2%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  zugesetzt. Zucker- verbrauch vom 10. bis zum 18. Tage : 3,6 g ; Pilzdeckenzuwachs 1,3 g.

stanthalten des pH auf 2,0 konnte dieser Einfluß ausgeschaltet werden<sup>1</sup>. Die Erhöhung der Ascorbinsäurebildung betrug nur 5/6 derjenigen ohne pH-Ausgleich.

Tabelle 11.

*Vers. 59a bis 59c* : Temp. 30° C, pH 2,25, 20% Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A7, 5 Parallelkolben,  $m = \pm 0,08-0,11$ .

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc			
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Konzentrationen			
	0,2 %	0,8 %	1,6 %	2,4 %
5	2,00	2,10	1,60	1,10
9	3,30	4,40	3,40	3,20
13	1,80	8,80	5,50	5,40
17	0,70	12,10	10,10	10,10
22	0,35	7,90	12,90	12,30
24	0,35	1,90	12,50	12,65
28	0,35	—	1,30	0,90

Das Absinken des pH bis zu 1,20 bei den vier- bis zwölffachen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Konzentrationen wird durch die verschieden schnelle Aufnahme von Anion und Kation des  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  verursacht.

<sup>1</sup> Durch Zugabe von kleinen Volumina NaOH ; Pufferlösungen wurden nicht verwendet, da diese Wachstum und Säurebildung unkontrollierbar beeinflussen.

Das Auftreten freier  $\text{HNO}_3$  hatte eine teilweise Oxydation der Ascorbinsäure zur Folge. Diese Ascorbinsäureabnahme trat besonders nach 24 Tagen am deutlichsten hervor, wenn der Pilz den Zucker vollständig aufgenommen hatte.

Gibt man statt  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  andere N-Verbindungen wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Asparagin oder  $\text{NaNO}_3$  in die Nährlösung, dann wird die Ascorbinsäurebildung und das Wachstum in folgender Weise (Tabelle 12) beeinflusst:

Tabelle 12.

Vers. 74: Temp.  $30^\circ \text{C}$ , pH 2,25, 15% Rohrzucker, N-Quelle (Gehalt an N bei allen N-Quellen 0,07%), Versuchsobjekt: Pilzdecke von A7. Die anderen Nährsalze waren bei dieser Versuchsanstellung nicht nötig (s. auch S. 147 ff.).

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc			
	N-Quelle			
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{NaNO}_3$	Asparagin
	0,2 %	0,27 %	0,42 %	0,32 %
3	1,54	1,21	0,88	1,21
7	5,32	2,97	1,65	3,41
10	7,40	7,92	0,88	7,25
12	6,82	10,40	0,88	8,25
14	5,54	15,62	0,88	8,25
18	0,55	12,87	0,88	6,38
23	—	9,90	—	2,86
26		7,92		1,54

Der Versuch mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{NaNO}_3$  wurde nach 18, die andern Versuche nach 26 Tagen abgebrochen. Der Zuckerverbrauch (g/100 cc) und der Pilzdeckenzuwachs (g) betrugen:

Tabelle 13.

N-Quelle	Zucker- verbrauch	Pilz- decken- zuwachs	Ökono- mischer Koeffizient
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ . .	13,9	2,15	0,15
$\text{NH}_4\text{Cl}$ . . .	15,0	1,80	0,12
$\text{NaNO}_3$ . . .	14,8	2,35	0,16
Asparagin .	15,0	2,20	0,15

Die Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration beim Verabreichen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  statt  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ist möglicherweise auf das Fehlen der oxydierenden Säure zurückzuführen. Auf diese Weise ließe sich auch die



langsamere Ascorbinsäureabnahme bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gegenüber  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nach 14 Tagen erklären, wenn der Pilz den Zucker vollständig aufgenommen hat (vgl. Tabelle 11, S. 136)<sup>1</sup>.

Zitronensäure bildete sich bei Asparagin als N-Quelle nur in Spuren, bei den andern N-Quellen in geringer Menge (0,2 bis 0,4 g). Bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als N-Verbindung wurde zudem noch Oxalsäure nachgewiesen.

Nach R u d r a (1939) läßt sich die Ascorbinsäuresynthese bei der höheren Pflanze durch geringe Mengen von *Mn-Ionen* steigern. Er nimmt an, daß die Ascorbinsäure aus einer Vorstufe durch ein Oxydase-System gebildet werde; das Mangan könne dann die Rolle eines Co-Enzyms in diesem System spielen. Unsere Untersuchungen an *Aspergillus niger* ergaben jedoch andere Resultate: Bei Zugaben von 0,1 bis 0,001 % Mn (als  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  und als  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) blieb der Ascorbinsäuregehalt unbeeinflußt. (Um die unspezifische Salzwirkung auszuschalten, wurden Parallelversuche mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und mit  $\text{NaCl}$  durchgeführt.) Die Mn-Zugabe wirkte sich jedoch günstig auf die Zitronensäurebildung aus, die sich auf das *Doppelte* erhöhte (ca. 1 g/100 cc). Die Sporen waren in diesen Versuchen, wahrscheinlich durch  $\text{MnO}_2$ -Bildung, braun gefärbt.

3. *Wasserstoffionenkonzentration*: Die Ascorbinsäurebildung zeigte eine Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration in der Weise, daß die höchsten Ascorbinsäurewerte bei einem pH von 1,25 erreicht wurden. Mit steigendem pH nahm der Ascorbinsäuregehalt stetig ab (Fig. 6).

Für das Wachstum lagen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Die Versuche bei pH 2,25 bis pH 4,60 wurden am 21. Tage, der bei pH 1,25 am 25. Tage abgebrochen. Der Zuckerverbrauch (in g/100 cc) und das Mycelgewicht (in g) während dieser Zeitspanne sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Die Abnahme der Ascorbinsäure mit steigendem pH könnte möglicherweise auch auf die leichtere Oxydierbarkeit der Ascorbinsäure zurückzuführen sein, jedoch erwies sich, wie aus späteren Versuchen hervorgehen wird (s. S. 154), die Beständigkeit der Ascorbinsäure in der *Kulturlösung* bis zu einem pH von 3,60 unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Es besteht auch die Möglichkeit, daß bei höherem pH die Ascorbinsäure im Mycel vorhanden ist und bei den gegebenen Außenbedingungen nicht in die Kulturlösung ausgeschieden wird (s. S. 162).

Das Maximum der Zitronensäurebildung lag bei pH 2,25, bei pH 1,25 und pH 3,0 bis 4,6 traten überhaupt nur Spuren Zitronensäure auf, dagegen fanden sich bei pH 3,0 bis 4,6 geringe Mengen von Oxalsäure in der Kulturlösung. Die Gesamtsäurebildung war jedoch im allgemeinen

<sup>1</sup> Für die folgenden Versuche wurde trotz der eben beschriebenen Ergebnisse stets die ursprüngliche Nährlösung (S. 116) beibehalten, um dieselbe Vergleichsbasis zu haben.

gering, so daß das pH während des Versuches wenig variierte. Die ungleiche Aufnahme der Ionen von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wirkte sich am deutlichsten bei pH 2,25 aus, wodurch das pH bis 1,90 sank, bei den anderen Wasserstoffionenkonzentrationen betrug der Abfall ca. 0,1 bis 0,2.

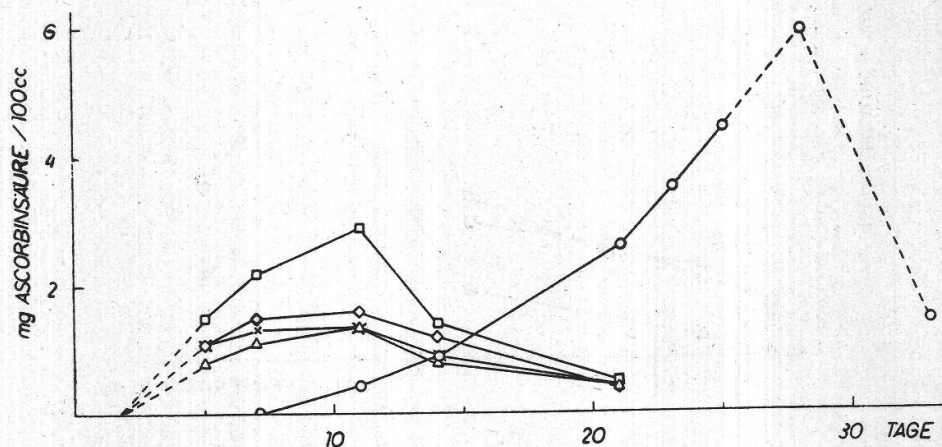


Fig. 6.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung.

○—○ pH 1,25      ◇—◇ pH 3,0—3,5  
 □—□ pH 2,25      x—x pH 4,60  
 △—△ pH 2,60

Die gestrichelte Kurve bei pH 1,25 gibt den weiteren Verlauf an, wie er als Mittelwert aus anderen Versuchsreihen erhalten worden ist.

Vers. 26: Temp. 29° C, 20% Rohrzucker, Mineralsalze, pH eingestellt mit HCl n/1 und mit NaOH n/1, Pilzstamm A<sub>7</sub>.

4. *Temperatur*: Zeichnet man den Ascorbinsäuregehalt zu einer bestimmten Zeit in Abhängigkeit von den Versuchstemperaturen auf, so erhält man eine Optimumkurve (Fig. 7). Eine Temperaturerhöhung bis

Tabelle 14.

pH	Zucker- verbrauch	Mycel- gewicht	Ökonomischer Koeffizient
1,25	11,0	1,40	0,13
2,25	12,0	1,30	0,13
2,60	13,0	1,90	0,15
3,00	11,0	1,90	0,17
3,50	12,0	(1,50) <sup>1</sup>	(0,13) <sup>1</sup>
4,60	13,0	2,50	0,19

<sup>1</sup> Andere Versuche ergaben Werte, die hier *kein* zweites Minimum erkennen ließen.



zu 32° C fördert die Ascorbinsäurebildung, gleichsinnig damit nimmt auch das Wachstum des Mycels zu, dessen Temperaturoptimum jedoch noch höher liegt (35—37° C).

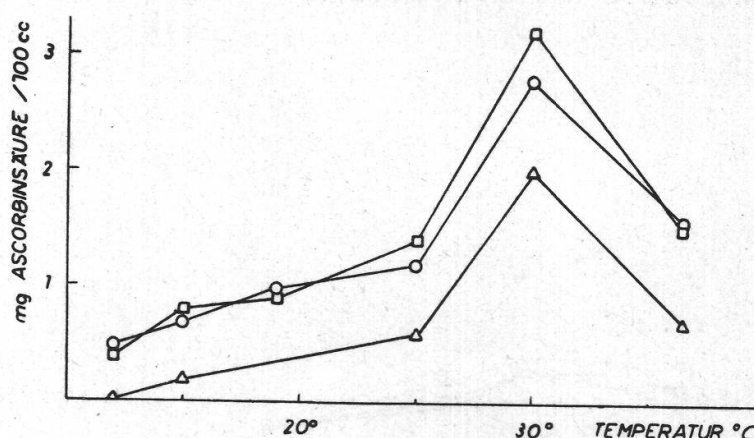


Fig. 7.

Einfluß der Temperatur auf den Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung.

△—△ 7 Tage      □—□ 9 Tage      ○—○ 12 Tage

Vers. 110 : pH 2,25, 20% Rohrzucker, Mineralsalze, Temp. 12—37° C, Stamm A<sub>7</sub>. Da *Aspergillus niger* sich bei verschiedenen Temperaturen nicht gleichmäßig entwickelt, wurde er nach der Impfung zuerst drei Tage bei 30° C gehalten, bis sich eine dünne Myceldecke gebildet hatte (0,45 g), aber noch keine Ascorbinsäure in der Kulturlösung auftrat und erst dann auf die angegebenen Versuchstemperaturen gebracht. Trockengewicht des Mycels nach 18 Tagen : Temp. 12° C : 0,65 g ; 15° C : 0,70 g ; 19° C : 1,0 g ; 25° C : 1,40 g ; 30° C : 2,5 g ; 37° C : 3,2 g ; 40° C : 2,4 g.

5. *Sauerstoffversorgung* : Der Sauerstoff ist für die Entwicklung und das Wachstum von *Aspergillus niger* unbedingt nötig; um dennoch den Einfluß von O<sub>2</sub>-Mangel auf die Ascorbinsäurebildung kennenzulernen, wurden die Kulturen bis zur Bildung einer dünnen Myceldecke (Trockengewicht ca. 0,4 g) und dem ersten Auftreten von Ascorbinsäure aerob gehalten und erst *dann* die Luftzufuhr unterbunden. Das Wachstum der Pilzdecke hörte auf, offenbar sobald der letzte Sauerstoff verbraucht war, ebenfalls wurde die Ascorbinsäurebildung gehemmt; führte man nach einigen Tagen erneut wieder Luft zu, so stieg der Ascorbinsäuregehalt wieder an, und ebenso verhielt sich auch das Wachstum. Die Hemmung war also nur *vorübergehend*. Die Ascorbinsäurekonzentration blieb ebenfalls konstant, wenn die Luft im Zeitpunkt des maximalen oder absinkenden Ascorbinsäuregehaltes abgeschnitten wurde, während in den aeroben Kontrollversuchen die Ascorbinsäure sich verringerte. Zur Veranschaulichung mag die graphische Darstellung Figur 8 dienen.

Aus Figur 8 geht hervor, daß der Pilz unter anaeroben ebenso wie unter aeroben Bedingungen (s. S. 160) *keine Ascorbinsäure* verbraucht.

Der Zitronensäuregehalt wies unter den aeroben und anaeroben Verhältnissen auch Unterschiede auf, die bei den stärker Zitronensäure

bildenden Stämmen besonders deutlich hervortraten, wie Tabelle 15 zeigt :

Tabelle 15.

Vers. 20 : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>5</sub>.

Nach dem 6. Tage wurde die Luftzufuhr beim « Versuch » unterbrochen. Die « Kontrolle » blieb dauernd aerob. Der Zuckerverbrauch betrug nach 15 Tagen beim « Versuch » 8,55 g und bei der « Kontrolle » 14,15 g; das Myceltrockengewicht beim « Versuch » 1,20, bei der « Kontrolle » 1,90 g.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc		g Zitronensäure/100 cc	
	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
6	1,10	1,10	1,90	1,90
9	1,32	1,76	2,10	3,50
12	1,32	2,20	2,20	4,75
15	1,32	2,64	2,20	7,00

## B. Einfluß innerer Bedingungen auf den Gehalt an Ascorbinsäure

1. Verhalten einzelner *Aspergillus*-Rassen: Von den acht Stämmen *Aspergillus niger*, die auf ihr Vermögen, Ascorbinsäure zu bilden, untersucht wurden, ließen sich drei prinzipiell verschiedene Gruppen (je nach ihrer Herkunft) feststellen: A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub>; A<sub>7</sub> und A<sub>8</sub>. Neben morphologischen

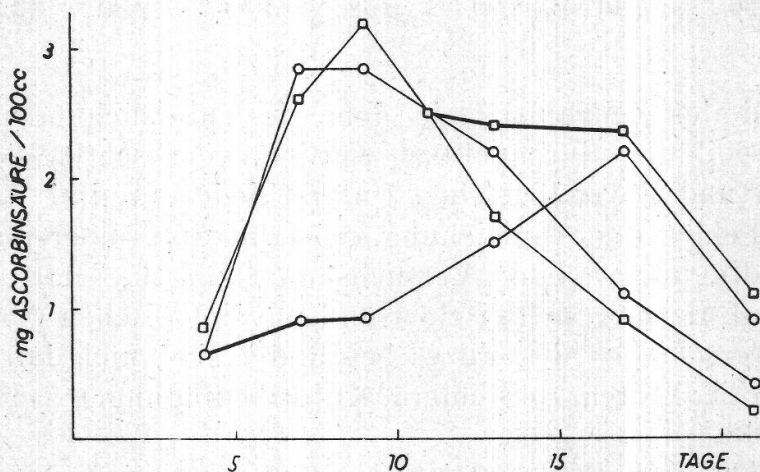


Fig. 8.

Einfluß des O<sub>2</sub> auf den Ascorbinsäuregehalt einer Kulturlösung.

○—○ Versuch 1 a      □—□ Versuch 2 a  
○—○ Versuch 1 b      □—□ Versuch 2 b

Vers. 31/33 : Temp. 29—30° C, pH 2,25, Mineralsalze, 20 % Rohrzucker, Stamm A<sub>7</sub>. Die Versuchskolben wurden zur Unterbindung des Luftsauerstoffes mit Gummistopfen geschlossen. Im Versuch 1 a wurde die Luftzufuhr zwischen dem 4. bis 9. Tage, bei 2 a zwischen dem 11. bis 17. Tage unterbunden. Die Kontrollversuche 1 b und 2 b blieben *dauernd* aerob.



Unterschieden im Wachstum der Kulturen (s. S. 117) zeigten sich auch physiologische; die Stoffwechselprodukte traten in verschiedenen Mengen auf.

Der Stamm A<sub>7</sub> wies neben einer sehr geringen Zitronensäurebildung die *höchste* Ascorbinsäureproduktion auf; A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub> bildeten etwa die Hälfte an Ascorbinsäure, aber etwa das Fünf- bis Achtfache an Zitronensäure. Der Stamm A<sub>8</sub> hielt sich in dieser Hinsicht in der Mitte. Als Beispiel seien die Resultate vergleichbarer Versuche über die Säurebildung in einem Zeitraum von vierzehn Tagen angeführt (Tabelle 16).

Tabelle 16.

Vers. 1: Temp. 30° C (28—32° C), pH 2,40, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze.

Pilz- stamm	mg Ascorbinsäure/100 cc				g Zitronensäure/100 cc			
	Versuchstage				Versuchstage			
	5	8	11	14	5	8	11	14
A <sub>1</sub>	0,53	2,46	2,46	2,64	1,99	4,58	6,23	7,09
A <sub>2</sub>	1,06	1,85	2,37	2,46	2,21	4,83	7,49	8,23
A <sub>3</sub>	0,88	1,58	2,37	1,85	2,66	3,95	6,30	7,17
A <sub>4</sub>	0,88	2,02	2,37	2,64	1,57	5,67	7,17	8,12
A <sub>5</sub>	1,41	1,85	2,37	2,64	2,66	5,53	6,44	7,35
A <sub>6</sub>	1,85	2,02	2,02	2,46	2,59	4,06	5,39	5,88
A <sub>7</sub>	3,08	3,34	3,70	3,34	1,21	1,21	1,30	1,20
A <sub>8</sub>	1,50	2,46	2,90	3,52	1,89	2,80	3,99	5,18

Während des Zeitraumes, in dem die Untersuchungen über die Ascorbinsäurebildung durchgeführt wurden, verwischten sich die morphologischen und physiologischen Unterschiede der drei Rassen *nicht*. Aus diesem Fehlen der Angleichung, trotz der stets übereinstimmenden Züchtungsbedingungen und Versuchsanordnungen, darf man wohl schließen, daß die morphologischen und physiologischen Abweichungen in *Rassenunterschieden* des Pilzes begründet sind und daß nicht etwa durch äußere Faktoren (besondere Kulturbedingungen) eine Auswahl erreicht wurde.

2. *Abnahme und Regeneration des Bildungsvermögens*: Wenn auch die Unterschiede in den Eigenschaften der *einzelnen Stämme* sich durch die Kultur unter den besonderen Versuchsbedingungen nicht verringerten, so konnte doch festgestellt werden, daß, je *länger* die Versuche und Züchtungen fortgesetzt wurden, die *physiologischen Eigenschaften*<sup>1</sup> der untersuchten Stämme sich allgemein und gleichsinnig *änderten*: Das

<sup>1</sup>Die morphologischen Eigenschaften (Aussehen im Mikroskop) wurden nicht feststellbar geändert. Bei A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub> Pilzdicke etwas schleimiger und infolge geringeren Wachstums öfters unzusammenhängend.

Bildungsvermögen für Zitronensäure und Ascorbinsäure begann, auch bei *Einhaltung der ursprünglichen Bedingungen*, mit der Zeit zu sinken, und zwar stärker bei den Stämmen A<sub>1</sub> bis A<sub>6</sub> als bei A<sub>7</sub>. Nach sechs bis acht Wochen vermochten die Subkulturen der Stämme A<sub>1</sub> bis A<sub>6</sub> nur 60—70 % der in den ursprünglichen Kulturen gemessenen Maximalmengen Ascorbinsäure und Zitronensäure zu bilden, nach weiteren sechs Wochen noch 30—40 %, und nach achtzehn bis zwanzig Wochen waren nur noch Spuren von Zitronensäure und *keine* Ascorbinsäure mehr in den Kulturlösungen nachzuweisen. Gleichzeitig zeigten diese Subkulturen ein schlechteres Wachstum. Bei *Stamm A<sub>7</sub>* dagegen nahm die Zitronensäure- und Ascorbinsäureproduktion erst nach zwölf bis fünfzehn Wochen auf ca. 70 % ab; das Wachstum blieb unverändert. Nach weiteren zehn Wochen sank die Zitronensäurebildung auf wenige Prozent herab, die Ascorbinsäurebildung jedoch nicht unter 50 %.

Diese überraschende Änderung des physiologischen Verhaltens der Pilze trat *immer* ein, gleichgültig ob die Pilzsporen in die synthetische Nährlösung oder zuerst auf natürlichem Nährboden (Würzeagar) geimpft wurden. Ferner hing der Rückgang des Säuregehaltes nicht von der Zahl der Subkulturen ab, sondern von der *Zeitdauer*, während der die Pilze zur Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung gezwungen wurden.

Viele Forscher, die *Aspergillus niger* untersuchten, hatten diese rätselhafte Erscheinung bei der Zitronensäurebildung auch beobachtet und sprachen dann von einer « Degeneration » der Pilzkulturen (z. B. Bernhauer, 1939 b, Chrzaszcz, 1937, und Wassiljew, 1935). Diese Bezeichnung ist jedoch irreführend, da man durch sie verleitet wird, diesen Vorgang nur vom Gesichtspunkt der maximalen Säurebildung aus zu betrachten und nicht, wie es gerechtfertigter erscheint, von der Lebensweise des Pilzes aus. Man sollte nämlich bedenken, daß *Aspergillus niger* bei der Versuchsanstellung, die zu maximaler Zitronensäurebildung und zum Auftreten von Ascorbinsäure führt, *nie* unter *optimalen* Lebens- und Wachstumsbedingungen gehalten wird, so daß das Absinken der Säurebildung auch als eine Anpassung des Pilzstoffwechsels an die biologisch ungünstigen Verhältnisse interpretiert werden könnte. Dabei ist allerdings zu erwähnen, daß auch bei ständigem Weiterimpfen auf Würzeagar das Bildungsvermögen für Ascorbinsäure und Zitronensäure teilweise verlorenging, aber langsamer als beim Weiterimpfen von synthetischer zu synthetischer Nährlösung.

Wurden Sporen von *Aspergillus niger*, die ein beeinträchtigtes physiologisches Verhalten in bezug auf die Säurebildung zeigten, mehrmals rasch hintereinander auf Würzeagar übergeimpft (alle 1 bis 2 Wochen), also auf einen natürlichen Nährboden mit « normalen » Lebensbedingungen, so konnte bei nachheriger, *mehrmaliger* Züchtung auf stark



sauren Medien die übliche Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung wieder erhalten werden. Zur Veranschaulichung mag Tabelle 17 dienen.

Tabelle 17.

Vers. 12 : Temp. 29° C, pH 2,0, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>2</sub>.

Pilz zwischen a) und b) mehrfach auf Würzeagar übergeimpft. Kulturdauer jeweils nur bis Sporenbildung.

	Versuchstage			
	5	8	12	15
a) ursprüngliche Kulturlösung . . .	0 0,7	0 1,96	0,53 2,24	0,66 2,80
b) nach 1. Überimpfung in Nährlösung	0,44 2,80	1,10 3,15	1,28 3,75	1,10 4,06
c) nach 3. Überimpfung in Nährlösung	0,88 4,20	1,76 5,67	2,20 7,28	2,15 8,12

Die obere Zahlenreihe bezieht sich auf den Gehalt der Kulturlösung an Ascorbinsäure (mg/100 cc), die untere auf jenen an Zitronensäure (g/100 cc).

Dieses wiedergewonnene Bildungsvermögen blieb für die Stämme A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub> jedoch auch nur *vorübergehend* bestehen (für etwa 6 Wochen), und es konnte dann zum zweiten Male durch die oben beschriebene Versuchsanstellung nur in *geringem Maße* regeneriert werden. Bei Stamm A<sub>7</sub> waren die Verhältnisse ähnlich; die Abnahme jedoch etwas geringer. Nach der Regeneration hielt zudem das Bildungsvermögen viel länger an, so daß im Laufe der Untersuchung nur eine zweimalige Regeneration nötig wurde.

Außer den biologisch ungünstigen Verhältnissen in der Kulturlösung könnte für das Abnehmen des Säurebildungsvermögens der Mangel an bestimmten Stoffen, Stimulatoren und Wirkstoffen, in der synthetischen Nährlösung, wie auch in den mehrfach sterilisierten Würzeagarkulturen, verantwortlich sein. Alte Kulturlösung, die eventuell solche Wirkstoffe enthalten könnte, blieb jedoch ohne Einfluß<sup>1</sup>. Dagegen erwiesen sich *Zugaben von Ascorbinsäure* zu den Nährlösungen als wirksam, wie aus Figur 9 hervorgeht. Man erkennt, daß mit 4 und 6 mg Ascorbinsäurezusatz nahezu die gleiche Aktivierung erreicht wird; dies gilt auch für den Stamm A<sub>2</sub>. Ascorbinsäurezugabe beeinflusste auch manchmal die Zitronensäurebildung günstig. Ebenso steigt das Wachstum an (s. Tab. 18).

Die zugesetzte Ascorbinsäure war schon am zweiten Versuchstag fast, am dritten vollständig verschwunden. In diesem Zeitpunkt trat aber

<sup>1</sup>Zugaben von geringen Mengen Cystein ließen die Ascorbinsäurekonzentration unbeeinflusst, obwohl Cystein die Oxydation der Ascorbinsäure verlangsamt und so die Beständigkeit kleiner gebildeter Mengen an Ascorbinsäure erhöhen müßte.

erst ein dünner Mycelschleier auf. Folglich muß die Einwirkung der Ascorbinsäure auf das physiologische Verhalten des Pilzes in den *frühesten Wachstumsstadien gleich nach der Keimung* erfolgen<sup>1</sup>.

Tabelle 18.

Vers. 75 a: Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze; nach der Sterilisation im Dampftopf Zugabe von mit Bakterienfilter sterilisierter Ascorbinsäurelösung. Stamm A<sub>2</sub>. Nach 15 Tagen Bestimmung des Myceltrockengewichts (g) und des Zuckerverbrauchs (g/100 cc).

	Ascorbinsäurezugabe mg/100 cc			
	0	2	4	6
Verbrauchter Zucker . . . . .	12,5	14,8	16,9	16,5
Myceltrockengewicht . . . . .	1,8	2,0	2,2	2,2
Ökonomischer Koeffizient . . . . .	0,15	0,14	0,13	0,13

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, die erhaltenen Resultate so zu interpretieren, als ob die nach anfänglicher Ascorbinsäurezugabe später in der Kulturlösung auftretende Ascorbinsäure nicht, wie sonst, aus der C-Quelle der Nährlösung entstehe, sondern aus *Oxydationsprodukten* der zugegebenen Ascorbinsäure *rückgebildet* werde. Zur Klärung dieser Frage wurden vergleichende Versuche mit der Zugabe von *oxydierter* Ascorbinsäure zur Nährlösung ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

Der Pilz *baut* tatsächlich aus den Oxydationsprodukten die Ascorbinsäure *wieder auf*. Daß es sich hierbei nicht um eine tiefergreifende Stoffwechseländerung handeln kann, geht daraus hervor, daß das Wachstum und die Zitronensäurebildung *unbeeinflußt* blieben, und daß beim Überimpfen von Sporen *solcher* Kulturen (Vers. 75 c) auf neue Nähr-

<sup>1</sup> Es sei auch darauf hingewiesen, daß die Ascorbinsäure den Stoffwechsel von *Aspergillus niger* nur dann in der oben beschriebenen Weise beeinflusst, wenn die Einwirkung der Ascorbinsäure bei der *Keimung* der Sporen erfolgen kann. Setzt man nämlich die Ascorbinsäure (8 mg/100 cc) erst nach neun Tagen zu der Kulturlösung zu, nachdem sich also die Myceldecke schon zu ca.  $\frac{3}{4}$  gebildet hat, so wird der Stoffwechsel in der Weise verändert, daß zwar der Zuckerverbrauch ebenfalls ansteigt, das Mycelwachstum (Trockengewicht) aber unbeeinflußt bleibt und die Säurebildung stark zurückgeht oder sogar *verschwindet*. Nach Nowoteknow und Wadowa (1938), die ebenfalls eine Hemmung der Zitronensäurebildung bei einer Ascorbinsäurezugabe zu den Nährböden von *Aspergillus niger* feststellten, soll die Ascorbinsäure die Atmung steigern. Der vermehrte Zuckerverbrauch könnte auch in unseren Versuchen so gedeutet werden. Um aber über die Funktion der Ascorbinsäure unter diesen Verhältnissen eindeutig entscheiden zu können, müßten zuerst Untersuchungen über die Atmungsgeschwindigkeit vor und nach Ascorbinsäurezugabe angestellt werden.



lösung der Ascorbinsäuregehalt wieder die *ursprünglichen, niedrigen* Werte aufwies. Demgegenüber hielt das durch *l-Ascorbinsäurezusatz* wieder aufgefrischte Bildungsvermögen auch *nach* dem Überimpfen bei *weiteren* Versuchen an, wenn auch nur für ca. 4 Wochen.

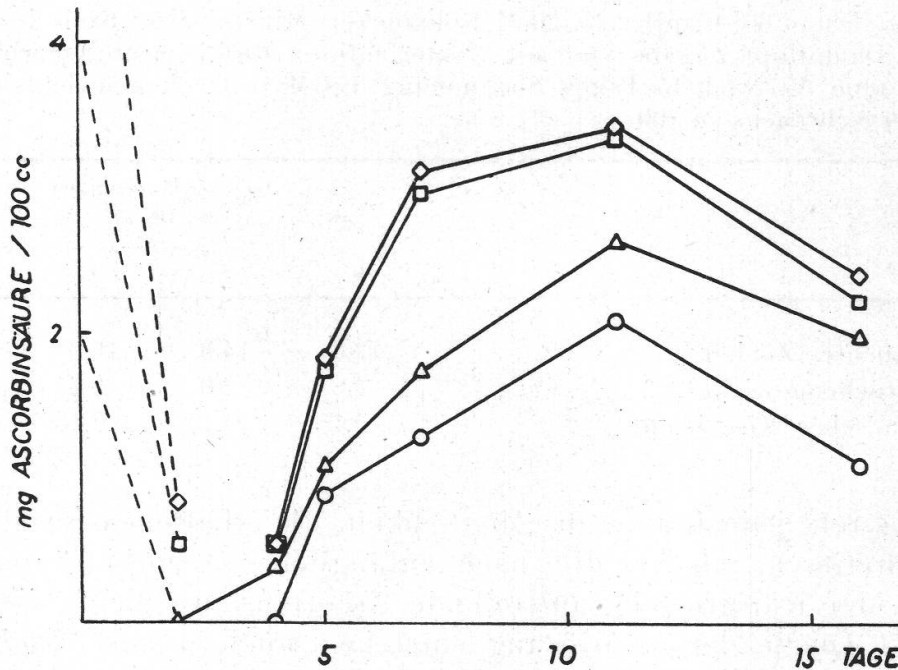


Fig. 9.

Regeneration des Bildungsvermögens für Ascorbinsäure durch vorangehende Zugabe von Ascorbinsäure.

Vers. 75 b : Stamm A<sub>7</sub>; Versuchsanstellung wie 75 a (S. 145).

Ascorbinsäuregehalt bei Zugabe von 0 mg ○—○  
 2 mg △—△  
 4 mg □—□  
 6 mg ◇—◇

Abnahme der zugegebenen Ascorbinsäure während  
 des Kulturbeginns (schematisch) - - - -

3. *Steigerung des Bildungsvermögens*: Versuche, in denen die alte Kulturlösung unter einer Pilzdecke durch eine neue Nährlösung ersetzt wurde, ergaben eine beschleunigte und auch etwas gesteigerte Ascorbinsäureproduktion, und zwar gleichgültig, ob man die Kulturlösung im Zeitpunkt der *maximalen* oder der *abnehmenden* Ascorbinsäureproduktion auswechselte. Diese Erscheinung kann nicht allein durch die Erneuerung der Nährsalze erklärt werden, sondern muß auch im Verhalten des Pilzes selbst liegen, weshalb dieser Vorgang unter den « inneren Bedingungen » besprochen werden soll.

Die Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden graphischen Darstellung veranschaulicht (Fig. 10).

Tabelle 19.

Vers. 75 c : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>. Nach Sterilisation Zugabe von 2 und 4 mg Ascorbinsäure und 2 und 4 mg oxydierter (durch Luftsauerstoff) Ascorbinsäure.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc				
	Ascorbinsäurezugabe mg/100 cc				
	oxydiert		0 mg	nicht oxydiert	
	2 mg	4 mg		2 mg	4 mg
2	0	0	0	0	1,10
3	1,90	—	0	—	0
5	2,10	4,10	—	0,88	1,76
7	1,90	2,20	0,88	2,20	3,30
12	1,24	1,32	2,20	1,76	2,64

Erfolgte der Wechsel nach 28 Tagen, so stieg der Ascorbinsäuregehalt nicht mehr erheblich an. Dieses verminderte Ascorbinsäurebildungsvermögen hängt aber nicht mit dem häufigen Wechseln der Nährlösung, sondern mit dem *Alter* des Mycels zusammen. Bringt man

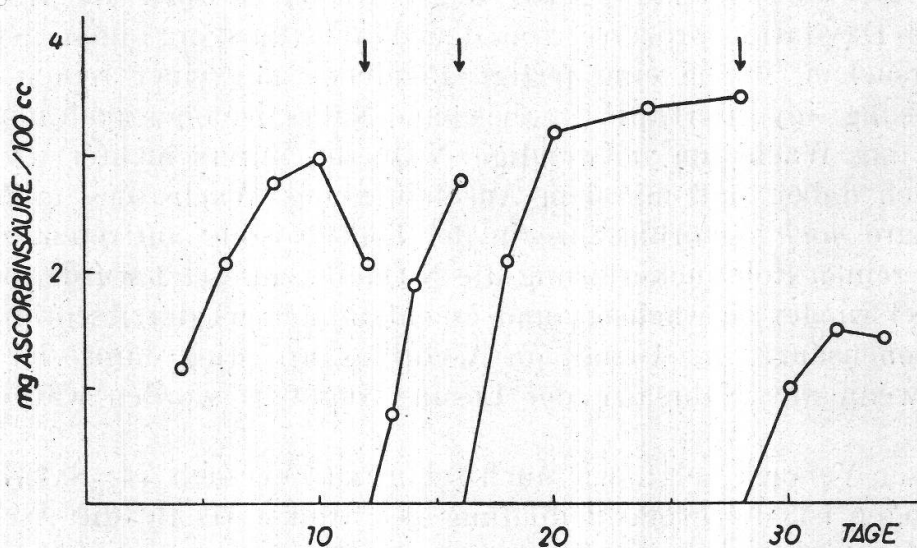


Fig. 10.

Mehrmaliges Auswechseln (↓) alter Nährlösung durch neue.

Vers. 47 : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze. Nach 12, 16 und 28 Tagen wurde die alte Kulturlösung abpipettiert, die neue Nährlösung unter möglichster Schonung der Pilzdecke darunter gegeben. Stamm A<sub>7</sub>.

nämlich eine Pilzdecke überhaupt erst nach 28 Tagen auf eine neue Nährlösung, so vermag sie auch nach diesem ersten Wechseln nur geringe Mengen von Ascorbinsäure zu produzieren. In diesem Zeitpunkt steigen die Oxydationsvorgänge in der Kulturlösung erheblich an (s. S. 152), so daß auch bei normaler Bildung der Ascorbinsäuregehalt gering sein dürfte. Es scheint aber auch, daß nach 28 Tagen ein größerer



Teil des Mycels, an das ja diese Reaktionen gebunden sind, abgestorben ist (Autolyse). Das Mycel wächst dann nur noch schwach, wie aus folgender Zusammenstellung der Myceltrockengewichte hervorgeht (Tabelle 20):

Tabelle 20.

Tage	Myceltrockengewicht
12	2,4 g
16	3,4 g
28	5,6 g
34	5,9 g

Die Zitronensäurebildung stieg durch das Auswechseln der Nährlösung nicht an. Es wurde in jeder neuen Nährlösung derselbe Maximalwert (0,6 g/100 cc) erreicht. Nach 28 Tagen nahm die Zitronensäuremenge ebenfalls, in Übereinstimmung mit den andern Stoffwechselvorgängen, ab.

Es ist auch möglich, durch ein Auswechseln der Nährlösung nicht nur die Ascorbinsäurebildung zu steigern, sondern auch die dissimilatorischen Oxydationsprozesse von den Wachstumsvorgängen getrennt zu untersuchen, indem eine fertige Pilzdecke mit einer reinen Rohrzuckerlösung (invertiert, pH 2), aber ohne Nährsalze oder auch nur ohne die, für das Wachstum notwendige N-Quelle, unterschichtet wird. Es zeigte sich dabei, daß mit dem Ausbleiben des Wachstums *weder* Zitronensäure *noch* Ascorbinsäure in der Kulturlösung auftreten. Sobald aber der reinen Rohrzuckerlösung die N-Quelle zugesetzt wurde, begann das Mycel wieder zu wachsen, und es entstanden wieder Ascorbinsäure und Zitronensäure. Der Gehalt an Ascorbinsäure stieg dann viel höher an, als wenn alle Nährsalze der Lösung zugefügt worden wären (Tabelle 21).

Dieser Versuch zeigt, wie auch schon aus Versuch 74 (S. 137) hervorgegangen ist, die große Bedeutung des Stickstoffs für die Ascorbinsäurebildung. Da jedoch die hohen Ascorbinsäurewerte durch die alleinige Stickstoffzufuhr zur alten Kulturlösung (s. Fig. 5, S. 136) nicht erklärt werden können, muß auch das Wechseln der Nährlösung eine günstige Wirkung auf *Aspergillus niger* ausüben.

4. *Bedeutung des Mycelwachstums*: Wie aus der Zeitabhängigkeit der Ascorbinsäureproduktion und speziell aus den Versuchen des vorangehenden Abschnittes hervorgeht, bildet *Aspergillus niger* Ascorbinsäure nur während des Wachstums. Man könnte aus dieser Feststellung folgern, daß die Ascorbinsäure ein notwendig und zwangsläufig entstehendes Nebenprodukt der Mycelaufbau-Reaktionen sei. Dies ist aber nicht der Fall, ebensowenig ist die Bildung der Ascorbinsäure eine *Voraussetzung* für das Wachstum des Pilzes; Versuch 43 gibt dafür den Beweis.

Tabelle 21.

Vers. 42 : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, 0,2 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (in einem Kontrollversuch alle Mineralsalze); nach 14tägiger Inkubationszeit des Pilzes auf der gewohnten Nährlösung wurde die Kulturlösung abpipettiert (Ascorbinsäuregehalt 2,74 mg, max.) und die 2,4 g schwere Pilzdecke mit der Untersuchungslösung unterschichtet.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc	
	nur $\text{NH}_4\text{NO}_3$	alle Mineralsalze
3	1,76	0,98
7	6,05	3,24
12	10,78	2,32
17	7,26	1,10
21	0,77	0,66
Zuckerverbrauch (g) .	14,9	14,9
Myceltrockengewichtszunahme (g) . . .	1,1	1,8
Ökonomischer Koeffizient . . . . .	0,07	0,12

Vers. 43 : Wird  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  im Vers. 42 durch eine geringe Menge Cystein ersetzt (8 mg), so findet zwar *beträchtliches* Wachstum statt (Zuwachs 2,4 g gegenüber  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mit 1,1 g), es tritt aber *keine* Ascorbinsäure in der Kulturlösung auf.

Die enge Verknüpfung der Ascorbinsäurebildung mit dem Wachstumsprozeß ist in der folgenden Kurve veranschaulicht (Fig. 11).

Nach dem Keimen der Sporen fand sich noch keine Ascorbinsäure in der Kulturlösung. Sie trat dort erst auf, nachdem sich eine dünne Myceldecke gebildet hatte. Im Mycel dagegen war die Ascorbinsäure schon vorher nachweisbar, *Dehydroascorbinsäure* konnte jedoch *nicht* nachgewiesen werden<sup>1</sup>. Der Gehalt an Ascorbinsäure im Mycel, wie auch in der Kulturlösung, war in der Phase des stärksten Pilzwachstums am größten. Jedoch entspricht im allgemeinen einem maximalen Mycelaufbau nicht eine maximale Ascorbinsäurebildung. Beim Verändern der Versuchsbedingungen, vor allem der C- und N-Quellen variieren Wachstum und Ascorbinsäurebildung beträchtlich und *unabhängig* voneinander (s. z. B. Versuch 74, S. 137).

Ein Mycelzuwachs kann die Säurebildung begünstigen, weil mehr Zellsubstanz vorhanden ist, durch die die Umsetzung erfolgt; es ist aber auch möglich, daß durch die Förderung des Atmungsstoffwechsels bei starkem Wachstum die Bildung von Säuren, z. B. Ascorbinsäure und Zitronensäure, *gehemmt* wird.

<sup>1</sup> Nach  $\text{H}_2\text{S}$ -Behandlung zeigte der Mycelextrakt keinen höheren Gehalt an mit Tillmans Reagens titrierbarer Substanz.



### C. Bildung eines Ascorbinsäureschutzstoffes durch *Aspergillus niger*.

Der Ascorbinsäuregehalt der Kulturlösung hängt außer von den Produktionsbedingungen und einem eventuellen Verbrauch auch von der Oxydation der Ascorbinsäure durch den Luftsauerstoff ab. Diese Oxydation selbst ist aber wieder indirekt von den Lebensbedingungen des Pilzes abhängig, so daß es sich rechtfertigt, sie in einem besonderen Kapitel zu behandeln.

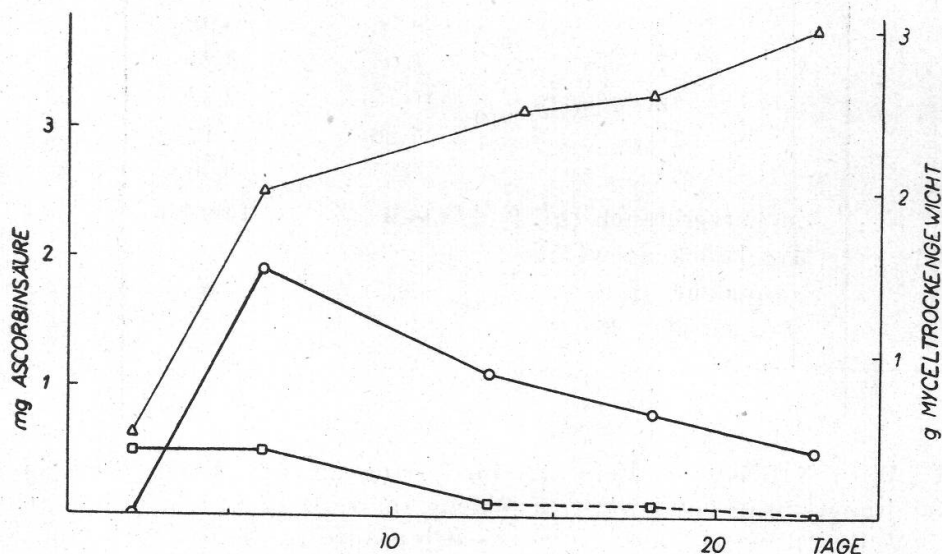


Fig. 11.

Ascorbinsäuregehalt in Kulturlösung und Mycel in Abhängigkeit vom Wachstum.

Vers. 65 : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze. Stamm A<sub>7</sub>.

- — □ Ascorbinsäuregehalt mg im Mycel <sup>1</sup>
- — ○ Ascorbinsäuregehalt mg in Kulturlösung
- △ — △ Myceltrockengewicht

Es ist allgemein bekannt, daß die Ascorbinsäure in der Pflanze *stabiler* ist als in wäßriger Lösung. Man schloß daraus auf in der Pflanze vorhandene Schutzstoffe (Stabilisatoren). Nach Wachholder (1942) kommen vor allem Cystein, Glutathion, CO, KCNS, Oxalsäure und Zitronensäure als stabilisierende Substanzen in Frage; also reduzierende Stoffe, die selber einen Teil des O<sub>2</sub> verbrauchen oder Säuren, denn bei niedrigem pH ist die Oxydierbarkeit der Ascorbinsäure geringer.

<sup>1</sup>Die Ascorbinsäure im Mycel wurde in folgender Weise bestimmt : Verreiben von einem Gewichtsteil Mycel mit drei Gewichtsteilen Metaphosphorsäure (5%ig) und gereinigtem Seesand; nach kräftigem Schütteln und kurzem Stehenlassen im Dunkeln wurde zentrifugiert, filtriert und titriert. 0,1 mg Ascorbinsäure in 2 g Mycel konnten noch nachgewiesen werden; die kleineren Werte sind unsicher.

Es zeigte sich in unseren Versuchen, daß der Ascorbinsäuregehalt in Kulturlösungen, auf denen *Aspergillus niger* gewachsen war, *langsamer* abnahm als in Lösungen (mit gleichem Gehalt an Rohrzucker, Zitronensäure und Nährsalzen), auf die der Pilz nicht eingewirkt hatte. Setzt man einer reinen Ascorbinsäurelösung Kulturlösung (auf der z. B. *Aspergillus niger* 10 Tage gewachsen war) zu, dann wird ihre Oxydation *gehemmt*, und zwar, wie Tabelle 22 zeigt, bedeutend stärker, als dem Gehalt der Kulturlösung an Zitronensäure entsprechen würde :

Tabelle 22.

Vers. 53 : Temp. 28° C, pH 2,0—2,2, 5 % Rohrzucker, Mineralsalze, 0,5 % Ascorbinsäure. Als Schutzstoff wurde zugesetzt : Oxalsäure (0,25 %, 0,5 %), Zitronensäure (0,25 %, 1,0 %, 1,0 %) und vom Pilz abfiltrierte Kulturlösung (5 cc, 10 cc, 25 cc). Kontrollösung *ohne* stabilisierenden Stoff. Zur Sterilisation sämtliche Lösungen durch Bakterienfilter filtriert. Der jeweils festgestellte Ascorbinsäuregehalt ist in Prozenten der Anfangsmenge (0,5 %) angegeben<sup>1</sup>.

Tage	Kontroll- lösung	Oxalsäure- zusatz	Zitronen- säure- zusatz	Kultur- lösung- zusatz
	%	%	%	%
0	100	100	100	100
3	70	100	89	93
5	55	100	78	86
9	40	97	60	80
12	12	96	40	73

Auch die geringe, durch Oxydation von Ascorbinsäure gebildete Menge an Oxalsäure kann nicht für die starke Stabilisierung verantwortlich sein; denn nach Dialyse der Kulturlösung vermag der dialysierende Anteil *keine* Schutzwirkung mehr auszuüben, *wohl aber das Dialysat* (s. S. 155 ff.).

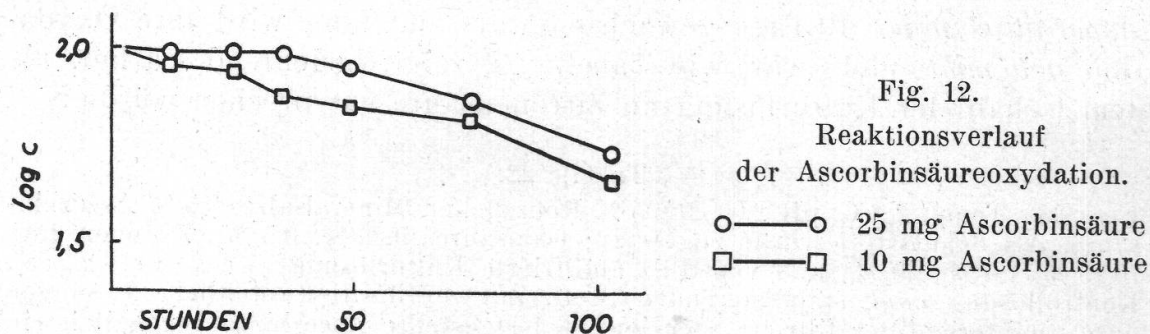
Um den Mechanismus der Stabilisierung aufzuklären, wurde versucht, die Reaktionsordnung der Oxydation der Ascorbinsäure durch den Luftsauerstoff festzustellen. Da die O<sub>2</sub>-Konzentration als praktisch konstant angenommen werden kann, sollte die Oxydation der Ascorbinsäurelösung nach der ersten Ordnung verlaufen. Figur 12 zeigt, daß dies nicht der Fall ist.

Eine eingehende Untersuchung dieser Reaktion, die sich wahrscheinlich als *Summe einzelner Reaktionsstufen, Nebenreaktionen und Diffusionsvorgänge* darstellen läßt, war leider im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich. Dagegen kann man durch Variation der Ausgangsbedingungen im physiologischen Versuch und Feststellung der Oxydationshemmung Rückschlüsse auf die Natur der stabilisierenden Substanzen ziehen:

<sup>1</sup> Er war unabhängig von den angewandten Konzentrationen der Stabilisatoren, weshalb nur je ein Wert angegeben ist.



Die Schutzwirkung ist von Fall zu Fall außerordentlich verschieden. Sie hängt unter anderem auch von der Pilzrasse ab<sup>1</sup>. Ganz allgemein wurde festgestellt, daß Kulturlösungen mit *hohem* Ascorbinsäuregehalt auch oxydationsunempfindlicher waren. Zudem veränderte sich die Be-



Vers. 71: Temp. 20° C, pH 2,25 % Rohrzucker, 0,5 % Zitronensäure, 0,025 % und 0,010 % Ascorbinsäure. Schutzstoff: 5 cc Kulturlösung von Stamm A<sub>7</sub>.  
100 cc Lösung in 250 cc Erlenmeyer-Kolben mit Wattestopfen verschlossen, auf Schüttelmaschine im Thermostat.

ständigkeit der Ascorbinsäure in der Kulturlösung mit der *Versuchsdauer*. Am Anfang ist sie gering, steigt dann an parallel mit dem Gehalt an Ascorbinsäure in der Lösung und sinkt wieder ab, und schließlich nimmt der Ascorbinsäuregehalt *schneller ab*, als es der reinen Luftoxydation entsprechen würde. Dies ist aus Tabelle 23 ersichtlich.

Tabelle 23.

Vers. 66: Zu 50 cc einer Lösung von 5 % Rohrzucker, 0,5 % Zitronensäure und 0,025 % Ascorbinsäure wurden je 5 cc verschieden alte Kulturlösung resp. 5 cc H<sub>2</sub>O dest. zugefügt, pH 2,25, Temp. 20° C, Kolben dem Licht nicht ausgesetzt. 3 Parallelkolben,  $m = \pm 0,1-0,2$ . Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025%) angegeben.

Tage	Kontroll- lösung	Zugabe von Kulturlösung im Alter von						
		3 Tagen	6 Tagen	8 Tagen	11 Tagen	15 Tagen	18 Tagen	25 Tagen
0	%	%	%	%	%	%	%	%
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	88,7	89,9	95,3	98,7	92,6	—	—	80,2
2	71,6	—	85,3	89,4	82,7	75,8	71,8	61,9
3	42,3	57,2	71,6	76,5	73,4	60,5	52,4	36,4
4	16,6	36,4	68,3	69,6	58,2	38,4	28,4	—

Die *optimale* Oxydationshemmung wird kurz vor dem *höchsten* Ascorbinsäuregehalt der Kulturlösung erreicht, unabhängig davon, ob dieser Maximalwert früher oder später zustande kommt.

<sup>1</sup>In allen folgenden Versuchen wurde die Stabilisierung ausschließlich bei Stamm A<sub>7</sub> untersucht.

Um zu prüfen, ob die Oxydationshemmung infolge Aufnahme des Luftsauerstoffs durch eine stabilisierende Substanz erfolgt, wurde eine achttägige Kulturlösung durch Einleiten von Luft weitgehend oxydiert, so daß sämtliche Ascorbinsäure zerstört war. Das Stabilisierungsvermögen dieser Lösung gegenüber reiner Ascorbinsäurelösung blieb *unverändert* erhalten. Auch beim Stehenlassen einer vom Pilz abfiltrierten Kulturlösung wurden die Schutzstoffe langsamer als die Ascorbinsäure zerstört (s. Tabelle 24).

Tabelle 24.

Vers. 73 : 3 Parallelkolben,  $m = \pm 0,2-0,3$ , Schutzstoff : Kulturlösung verschieden lang gestanden bei 20° C, 5 cc, Methodik wie bei Vers. 66. S. 152. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontroll- lösung	Kulturlösung gestanden				
		0 Tage	2 Tage	5 Tage	10 Tage	14 Tage
0	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100
1	91,4	96,4	95,8	96,2	93,4	92,8
2	69,3	88,9	83,4	82,8	82,8	77,4
3	36,5	74,6	69,8	66,2	59,6	52,1

Folgende Tabelle (25) zeigt die Abhängigkeit der Schutzwirkung von der *Verdünnung* der Kulturlösung. Das Optimum der Stabilisierung liegt bei einer Verdünnung von  $\frac{1}{10}$  Volumen, eine Abnahme beginnt bei  $\frac{1}{50}$  Volumen.

Tabelle 25.

Vers. 84 : Methodik s. Vers. 66. Schutzstoff : 10 Tage alte Kulturlösung.  $m = \pm 0,1$  bis 0,2. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontroll- lösung	Volumen Kulturlösung								
		$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$
1	% 86,4	% 88,0	% 87,2	% 91,4	% 88,2	% 88,2	% 88,9	% 87,9	% 86,9	% 87,4
2	58,4	78,6	77,6	88,9	77,6	72,4	68,0	68,4	67,7	60,4
4	12,4	61,6	64,9	65,2	63,7	56,4	45,7	44,6	42,4	15,2

Bei anderen Versuchen nahm bei einer Verdünnung auf  $\frac{1}{100}$  die Stabilisierung bedeutend stärker ab.

Das *Erwärmen* der stabilisierenden Kulturlösungen bis zu einer Temperatur von 80° C bewirkte *keine* oder nur eine *geringe* Abnahme der Oxydationshemmung. Sie verschwindet erst beim Erwärmen auf 90° bis 100° C, stellt sich jedoch nach drei bis vier Tagen teilweise wieder ein (s. Tabelle 26).



Tabelle 26.

Vers. 72 : Methodik s. Vers. 66, S. 152. Die Kulturlösungen wurden 15 Minuten auf verschiedenen Temperaturen gehalten, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt und der Ascorbinsäurelösung zugesetzt. Kulturlösung 11 Tage alt, 5 cc, 4 Parallelkolben,  $m = \pm 0,08-0,18$ .

Tage	Kontroll- lösung	Kulturlösung erwärmt auf °C					
		100°	90°	80°	60°	40°	20°
	%	%	%	%	%	%	%
1	90,6	90,6	90,6	—	—	—	—
2	59,4	59,4	59,4	89,0	89,0	89,0	89,1
4	22,1	25,0	32,4	78,8	78,6	78,7	78,8
6	0	15,0	22,0	67,4	67,6	67,3	67,7

Bei längerem Sieden (30 Minuten) der Kulturlösung traten keine oxydationsfördernde Substanzen darin auf. Erst bei völligem Eindampfen und Erhitzen des *Rückstandes* auf 150° C erhält dieser *oxydationsfördernde* Wirkungen, vielleicht durch Abspaltung von Schwermetallen aus komplexen Verbindungen.

Mit der *Wasserstoffionenkonzentration* (wenigstens zwischen pH 1,25 und 3,60) änderte sich die Stabilisierung nur in geringem Maße, obwohl die Oxydationsempfindlichkeit der Ascorbinsäure mit steigendem pH rapid zunimmt. Die relativen Werte der Stabilisierung in Abhängigkeit vom pH gehen aus folgenden Zahlen hervor (Tabelle 27) :

Tabelle 27.

Vers. 63 : Methodik s. Vers. 66, S. 152. Schutzstoff: 10 Tage alte Kulturlösung (5 cc),  $m = \pm 0,1-0,2$ , Kontrolllösung (K), Kulturlösung (V), pH eingestellt mit HCl und NaOH. Puffersubstanzen wurden absichtlich vermieden, da ihre Wirkung den pH-Einfluß überlagerte. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	pH													
	1,25		1,70		2,35		3,00		3,60		4,30		4,90	
	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V
3	37,4	78,2	38,2	79,8	38,6	80,1	30,1	70,7	30,0	67,1	20,6	51,2	12,2	40,6

Die stabilisierenden Substanzen sind nicht nur in der Kulturlösung, sondern auch im *Mycel* vorhanden: Ein Wasserauszug aus frisch geerntetem *Mycel* hat deutlich oxydationshemmende Wirkung auf Ascorbinsäurelösungen (Tabelle 28).

Bei 105° bis 110° C getrocknetes *Mycel* übte im Gegensatz zu bei 100° C behandelter Kulturlösung immer noch eine beträchtliche Oxydationshemmung aus. Erst bei 150° C getrocknetes *Mycel* zeigte keine

Tabelle 28.

Vers. 50: 20 g Mycelsubstanz (entsprechend 5 g Trockengewicht) wurde mit 10 g gereinigtem Quarzsand und 80 cc H<sub>2</sub>O dest. ca. 20 Minuten zerrieben, 1, 3 oder 8 Stunden stehen gelassen, zentrifugiert und filtriert und je 2, 5 oder 8 cc des Extraktes den Ascorbinsäurelösungen beigelegt. Methodik s. Vers. 66, S. 152. m = ± 0,25 bis 0,30. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontroll- lösung	Mycelextrakt								
		1 Stunde gestanden			3 Stunden gestanden			8 Stunden gestanden		
		2 cc	5 cc	8 cc	2 cc	5 cc	8 cc	2 cc	5 cc	8 cc
1	84,6	92,6	95,3	94,6	94,9			90,4		
2	52,4	69,5	69,3	70,8	77,9			70,7		
4	11,6	43,5	41,8	41,4	45,8			41,0		

Wirkung mehr. Mycel, das noch höheren Temperaturen ausgesetzt war, *beschleunigt* den Oxydationsvorgang in Ascorbinsäurelösungen (Tabelle 29).

Tabelle 29.

Vers. 67: Bei einer bestimmten Temp. (20°—250° C) getrocknetes Mycel wurde der Ascorbinsäurelösung zugegeben (gut geschüttelt), Kontrolle *ohne* Mycel. m = ± 0,25—0,30. Methodik s. Vers. 66, S. 152. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontroll- lösung	Mycel erhitzt auf					
		20° C		105—110° C		150° C	250° C
		1 g	0,2 g	1 g	0,2 g	1 g	0,2 g
1	87,2	—	97,2	91,7	90,4	85,1	51,6
2	66,6	82,6	79,9	84,4	80,7	69,7	42,7

*Dialysiert* man die Kulturlösung, so bleibt die Schutzwirkung an das Dialysat gebunden (Tabelle 30).

Bemerkenswert ist, daß bei einer längeren als vierzigstündigen Dialyse die Schutzwirkung *verloren* geht und auch beim Zusammenbringen von Dialysat und dialysierender Flüssigkeit *nicht mehr* erhalten wird, was der Fall sein müßte, wenn das Kolloid nur Träger einer abspaltbaren und dialysierbaren Wirksubstanz wäre. Allem Anschein nach muß beim langen Dialysieren das stabilisierende System zerstört worden sein.

Da in der dialysierenden Flüssigkeit nie stabilisierende Stoffe festgestellt werden konnten, üben allein die *kolloidal* gelösten Stoffe eine Schutzwirkung aus. Es ist möglich, daß die oxydationshemmende Wirkung auf der *Bindung* von *Spuren* von Schwermetallen, die die Oxyda-



tion von Ascorbinsäure beschleunigen, beruht. Überraschend ist vor allem die hohe Hitzebeständigkeit, die teilweise reversible Zerstörung des kolloidalen Schutzstoffes bei 100° und die irreversible Inaktivierung durch längere Dialyse. Letzteres deutet darauf hin, daß die Oxydationshemmung durch ein komplexes System zustande kommt. Die Schwankungen der Stabilisierung mit der Ausdehnung des Versuches entstehen wahrscheinlich durch die Lebenstätigkeit des Mycels, da die Schutzstoffe durch den Luftsauerstoff nicht leicht zerstört werden.

Tabelle 30.

Vers. 91: Methodik s. Vers. 66, S. 152. Schutzstoff: Kulturlösung, Dialysat der Kulturlösung und dialysierender Anteil der Kulturlösung. Für Kontrollversuch H<sub>2</sub>O dest. · Dialyse: A. Kulturlösung im Pergamentschlauch 24 Std. gegen fließendes Leitungswasser und 6 Std. gegen H<sub>2</sub>O dest. dialysiert. B. Kulturlösung dialysiert gegen H<sub>2</sub>O dest. (<sup>3</sup>/<sub>2</sub> Volumen Kulturlösung); m = ± 0,25—0,30. Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontrolllösung H <sub>2</sub> O			Kulturlösung							
				nicht dia- lysiert	Dialysat				dialysierend B		
	A		B								
	5 cc	10 cc	25 cc		5 cc	5 cc	10 cc	5 cc	10 cc	5 cc	10 cc
2	76,4	73,4	73,5	87,0	85,4	83,4	85,4	82,4	73,4	63,6	70,0
3	52,4	46,3	49,7	65,4	69,8	66,7	70,2	68,4	52,4	43,7	48,0
4	11,6	14,6	12,6	35,6	44,0	53,0	44,6	52,0	11,6	12,6	10,4

Es findet keine nennenswerte Vergrößerung der Stabilisierung durch Dialyse statt. Die stabilisierende Wirkung des Dialysats zeigte, wie die der Kulturlösung, ebenfalls eine Abhängigkeit von der Ausdehnung der Versuchsdauer.

In der Kulturlösung muß aber noch ein *oxydierendes* System vorhanden sein. Die Oxydationsbeschleunigung durch auf 150° erhitzte Kulturlösung-Rückstände kann durch Schwermetallabspaltung aus komplexen Verbindungen erklärt werden. Die Oxydationsbeschleunigung am Schlusse lang andauernder Versuche ist aber eher auf das Vorhandensein eines *Oxydasesystemes* zurückzuführen, wie ein solches sich auch bei *Aspergillus niger* finden kann (Euler, 1934). Die Wirkung von Oxydasen (Polyphenolase, Peroxydase) wird bekanntlich verstärkt durch Zugabe von Substanzen mit phenolischen Gruppen, die als Sauerstoffüberträger wirken können. Es wurden daher Versuche mit Phenol, Brenzcatechin und Vanillin ausgeführt (Tabelle 31).

Durch diese Zusätze wird die Oxydation tatsächlich gefördert, was eine Bestätigung für die Annahme eines Oxydasesystemes in der Kulturlösung ist. Unter normalen Bedingungen kann sich das Oxydasesystem wegen Fehlens von O<sub>2</sub>-Überträgern und wegen des tiefen pH nicht auswirken; zudem wird dieser Vorgang von der Stabilisierung überlagert.

Tabelle 31.

Vers. 87 : Methodik s. Vers. 66, S. 152. Zugabe von 0,25 g Phenol, 0,004 g Brenzcatechin und 0,014 g Vanillin zu 50 cc des Versuches und zur Kontrolllösung. Schutzstoff : 10 Tage alte Kulturlösung.  $m = \pm 0,2$ . Oxydierte Ascorbinsäure in % der Anfangsmenge (0,025 %) angegeben.

Tage	Kontrolllösung mit				Kulturlösung mit			
	keinem Zusatz	Phenol	Brenz-catechin	Vanillin	keinem Zusatz	Phenol	Brenz-catechin	Vanillin
2	32,4	27,6	31,5	30,7	14,6	27,6	31,5	26,6
4	85,7	68,6	78,6	76,3	30,6	33,6	45,9	52,4
5	97,4	82,4	92,5	89,4	41,4	41,4	51,1	62,8

Erst bei lang andauernden Versuchen steigt das pH, und es treten Farbstoffe mit wahrscheinlich phenolischem Hydroxyl in der Lösung auf. Auch beim starken *Konzentrieren* der Kulturlösungen (wie z. B. für die Tierversuche) macht sich die oxydationsfördernde Wirkung bemerkbar.

### Diskussion der Ergebnisse.

Sämtliche bis jetzt wiedergegebenen Kurven, die den Ascorbinsäuregehalt der Kulturlösung als Funktion der Zeit darstellen, sind als *Summe* von Bildung, Verbrauch und Oxydation aufzufassen (s. S. 126). Es stellt sich also die Aufgabe, diese drei Anteile aus der experimentell bestimmten Summenkurve zu ermitteln.

Die Kurve der Bildung und die Kurve eines eventuellen Verbrauchs lassen sich von dem dritten Anteil, der Kurve der unbiologischen Luftoxydation, durch folgende Versuchsreihe trennen (s. Fig. 13).

Aus achtzehn Parallelkolben mit möglichst gleichen Pilzkulturen werden von einem bestimmten Zeitpunkt ab jeden zweiten Tag je 2 cc Lösung entnommen. Durch die geringe Entnahme von jeweils nur 2 % der gesamten Kulturlösung wird die Kultur so wenig beeinflusst, daß sie praktisch als unter gleich bleibenden Bedingungen wachsend angesehen werden kann. Andererseits hat man in den vereinigten Proben von zusammen 36 cc genügend Lösung, um den momentanen Gehalt der Kulturlösung an Ascorbinsäure und den Abfall des Ascorbinsäuregehaltes durch die Luftoxydation zu bestimmen. Diese wird nur während *eines* Tages verfolgt<sup>1</sup>; dann sind die Stabilisierungsverhältnisse in der abgetrennten Lösung praktisch noch dieselben wie diejenigen in der Kulturlösung, was eine Voraussetzung der Anwendbarkeit dieser Methode ist.

<sup>1</sup> Für die Zwischentage werden für Gehalt und Oxydationsgeschwindigkeit die Mittelwerte aus dem vorangehenden und nachfolgenden Tage angenommen.



Die bis zu einem herausgegriffenen Tage erfolgte *totale* Bildung an Ascorbinsäure setzt sich aus dem momentanen Gehalt plus der bis zu diesem Zeitpunkt im ganzen oxydierten Menge Ascorbinsäure zusammen. Dieser Oxydationswert ist aber leicht aus den gemessenen Oxydationsanteilen jedes einzelnen Tages durch Summenbildung zu ermitteln. In Tabelle 32 sind die Meßwerte und die Summen zusammengestellt.

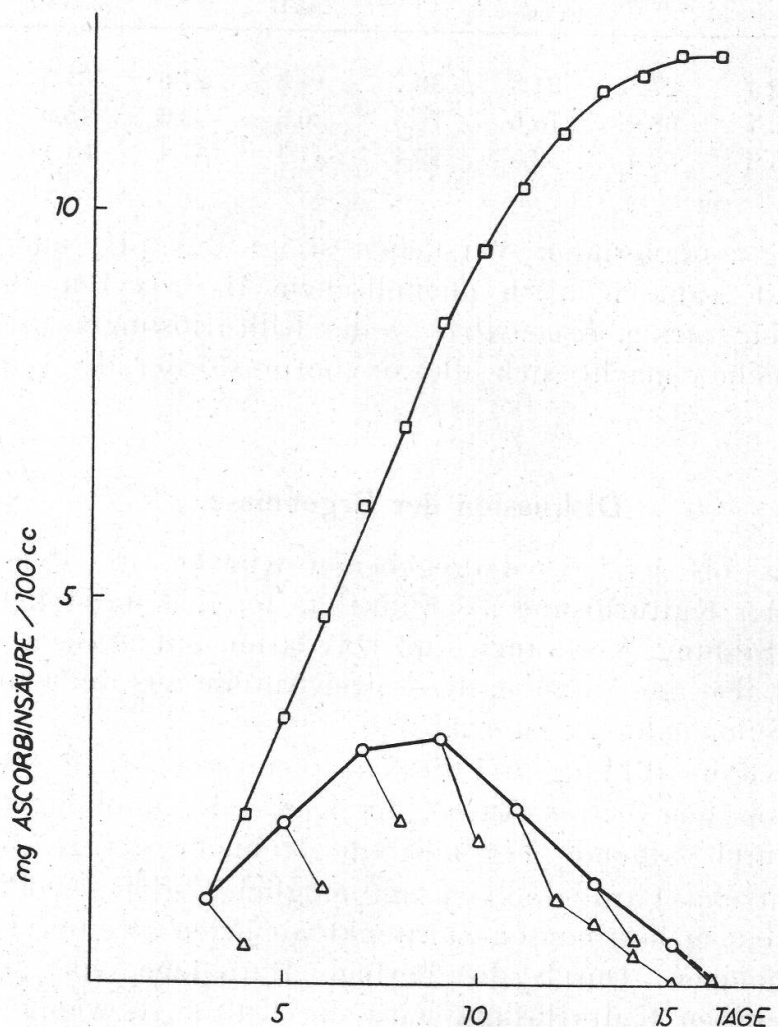


Fig. 13.

Aus Ascorbinsäuregehalt und Oxydation ermittelte Bildungskurve.  
 Vers. 117 : Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>.  
 ○—○ Kurve A: Bildung, Oxydation und eventueller Verbrauch.  
 □—□ Kurve B: Bildung minus eventueller Verbrauch.  
 ○—△ Kurve C: Oxydation durch den Luftsauerstoff.

Figur 13 (Kurve B) gibt die daraus konstruierte Kurve der Bildung (minus einem eventuellen Verbrauch) wieder. Kurve B ist eine erste Näherung für die Differenz zwischen Bildung und eventuellem Verbrauch. Durch Verkürzung der Meßintervalle könnten theoretisch be-

liebig genaue Näherungen gefunden werden (vgl. graphische Integrationsverfahren). Die durch Titrationsfehler entstandenen Schwankungen der Oxydationsmeßwerte sind aber bei eintägigen Meßintervallen bereits von der gleichen Größenordnung wie die durch Mittelwertsbildung begangenen Fehler. Die wiedergegebene Kurve der Bildung (minus einem eventuellen Verbrauch [Kurve B in Figur 13, S. 158]) ist also von der gleichen Genauigkeit wie die direkt gemessene Gehaltskurve (Kurve A in Fig. 13, S. 158).

Tabelle 32.  
Vers. 117 : Versuchsanordnung s. S. 158.

Tage	Ascorbinsäuregehalt in der Kulturlösung mg	Pro Tag oxydierte Ascorbinsäure mg	Pro Tag oxy- dierte Ascor- binsäure in % des Gehaltes	Total oxy- dierte Ascor- binsäure mg	Totale Bildung (minus ev. Verbrauch) mg
3	1,10				1,10
4	1,60	0,60	54,6	0,60	2,20
5	2,10	0,76	47,5	1,36	3,46
6	2,56	0,85	40,5	2,21	4,77
7	3,04	1,02	39,7	3,23	6,25
8	3,15	0,91	38,9	4,14	7,29
9	3,20	1,28	40,5	5,42	8,62
10	2,80	1,35	42,2	6,77	9,57
11	2,30	1,33	47,2	8,10	10,40
12	1,80	1,20	52,2	9,30	11,10
13	1,36	0,97	53,7	10,27	11,63
14	0,80	0,75	55,2	11,02	11,82
15	0,55	0,52	64,8	11,54	12,09
16	0,15	0,41	74,5	11,95	12,10

Aus der Kolonne 3 ist auch ersichtlich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit vom siebenten auf den achten Tag ein Minimum durchläuft, übereinstimmend mit der früheren Feststellung (s. S. 152, Tab. 23), daß achttägige Kulturlösung das größte Stabilisierungsvermögen besitzt.

Vom elften Tag an wurde die Oxydation (Kurve C in Fig. 13, S. 158) in der abgetrennten Lösung über mehrere Tage verfolgt. Sie verläuft annähernd parallel der Kurve des Ascorbinsäuregehaltes in der Kulturlösung (Kurve A in Fig. 13, S. 158). Wegen der noch vorhandenen allerdings geringen Ascorbinsäurebildung und der schlechteren Stabilisierung (keine CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, keine Pilzdecke, keine Neubildung von stabilisierenden Substanzen) gegenüber der Kulturlösung, liegt die Kurve C jedoch etwas tiefer als Kurve A.

Die weitgehende Übereinstimmung im Charakter der beiden Kurven läßt mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß beide vom gleichen



Vorgang bestimmt werden, daß sich also Kurve A *nur* aus Bildung und Luftoxydation ergibt und *keinen Verbrauchsanteil* enthält.

Um sicher festzustellen, ob *Aspergillus niger* keine Ascorbinsäure verbraucht, wenn er eine *günstigere C-Quelle in genügender Menge* zur Verfügung hat, wurde im folgenden Versuch die Ascorbinsäureabnahme in einer Kulturlösung mit lebender Pilzdecke verglichen, mit der Abnahme in einer entsprechenden Kulturlösung, die aber, zur Ausschaltung des Verbrauchs, vom Mycel abgetrennt worden war (s. Tabelle 33).

Tabelle 33.

*Vers. 118:* Zu einer Kulturlösung einer unter den üblichen Versuchsbedingungen gehaltenen 4 resp. 11 Tage alten Pilzkultur, deren Ascorbinsäuregehalt also zunahm (1,60 mg%) resp. abnahm (2,30 mg%), wurde soviel Ascorbinsäure zugegeben, daß der Gehalt je ca. 9 mg/100 cc betrug; die Kulturlösungen geteilt, die eine Hälfte unter der lebenden Pilzdecke gelassen (V) und die andere durch ein Bakterienfilter filtriert, um auch die Pilzsporen zurückzuhalten (K). In beiden Teilen wurde die Ascorbinsäureabnahme bestimmt.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc			
	Kulturen			
	4 Tage alt		11 Tage alt	
	V	K	V	K
0	9,20	9,20	8,76	8,76
1	7,30	6,20	6,74	6,23
2	6,40	5,23	5,64	4,90
3	5,58	4,10	4,94	4,12
4	4,50	2,64	3,46	2,02

Der Ascorbinsäuregehalt nimmt in den Kontrollösungen schneller ab als in den Kulturlösungen unter der lebenden Pilzdecke, was *nicht für einen Verbrauch spricht*, und was auf die gleichen Ursachen zurückzuführen ist wie in dem vorhergehenden Versuch der Unterschied der Kurve A und C. Wenn überhaupt Ascorbinsäure verbraucht wird, so sind die Mengen gegenüber dem festgestellten Gehalt verschwindend klein; die Kurve des Ascorbinsäuregehaltes wird also nur durch *Bildung* und *Luftoxydation* bestimmt.

## A. Physiologische Bedingungen der Ascorbinsäurebildung

### 1. Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung :

Bei den durchgeführten Versuchen konnte immer wieder eine nahe Beziehung zwischen Ascorbinsäure- und Zitronensäurebildung beobachtet werden. Für das Auftreten beider Säuren in der Kulturlösung sind die *gleichen* Versuchsbedingungen, hoher Zuckergehalt, tiefes pH und hohe Temperatur Voraussetzung. Es sind auch beide Vorgänge an

den Lebensprozeß der Zelle gebunden, wie die Bedeutung des Mycelwachstums und des Sauerstoffs für die Säurebildung beweist. Der Zitronensäuregehalt ändert sich auch je nach Pilzrasse. Er übertrifft stets den der Ascorbinsäure um mehrere Größenordnungen. Während die Kulturlösungen der Stämme  $A_1$ — $A_6$ , in Übereinstimmung mit der Ascorbinsäurebildung, eine starke Zitronensäurezunahme und nach zirka zwanzig Tagen eine schwache Abnahme aufweisen, bleibt der Gehalt an Zitronensäure in der Kulturlösung von  $A_7$  gering und nach zirka drei Tagen fast konstant; z. B. schwankt er in Figur 2, S. 126, nur zwischen 0,42—0,56 g/100 cc innert zwanzig Tagen. Das von Stamm zu Stamm abweichende Mengenverhältnis von Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung zeigt aber, daß die Synthesen dieser beiden Säuren *nicht* in *stöchiometrischem* Zusammenhang stehen können.

Diese Annahme wird auch noch durch andere Versuche gestützt. Die Nährsalze, besonders die N-Quelle, beeinflussen die Ascorbinsäurebildung in *anderer* Weise als die Zitronensäurebildung. Der Konzentrationsbereich der maximalen Wirkung der für die Kohlehydratsynthese wichtigen Nährstoffe K und  $H_2PO_4'$  ist für die Zitronensäurebildung breiter als für die Ascorbinsäurebildung (s. Tabelle 10, S. 135: Zitronensäure: K 0,015—0,10 %, P 0,01 % 0,14 %; Ascorbinsäure: K 0,015—0,06 %, P 0,01—0,10 %). Zu einem ähnlichen Ergebnis führten die Versuche mit der N-Quelle. Hier ist die gebildete Zitronensäuremenge konstant von 0,2—0,8 %  $NH_4NO_3$ -Zugaben und nimmt bei höheren  $NH_4NO_3$ -Konzentrationen wieder ab. Der Ascorbinsäuregehalt steigt dagegen an bis zu einem Maximalwert (bei 0,8 %  $NH_4NO_3$ -Zugabe) und bleibt dann konstant (s. Tabelle 11, S. 136). Es scheint, daß die N-Aufnahme (in geringem Maße auch die Kalium- und Phosphat-Ionenaufnahme) beim Pilz geregelt wird, weshalb große  $NH_4NO_3$ -Konzentrationen nur das Wachstum hemmen, nicht aber die Ascorbinsäuresynthese beeinflussen können.

## 2. Bildungsort der Ascorbinsäure :

Die Bildung der Ascorbinsäure erfolgt im Mycel<sup>1</sup>, also *intracellulär*, und nicht durch ein ausgeschiedenes Fermentsystem (s. S. 150, Fig. 11). Nach einiger Zeit jedoch findet man in der Kulturlösung höhere Konzentration an Ascorbinsäure als im Mycel (s. Tabelle 34).

Es stellt sich die Frage, wie die Ascorbinsäure in die Außenlösung gelangt. Ein geringer Teil der Ascorbinsäure wird zwar nach Autolyse der Zellen in die Kulturlösung diffundieren; der Hauptteil muß aber durch einen anderen Mechanismus ausgeschieden werden, denn in der Zeit, in der die ersten Spuren Ascorbinsäure in der Kulturlösung auf-

<sup>1</sup> Ob die Ascorbinsäure an bestimmten Orten des Mycels resp. der Zelle fixiert oder diffus verteilt ist, konnte nach der Methode von Giroud und Leblond (s. Wolf-Heidegger, 1942) nicht festgestellt werden.



treten, sind noch sämtliche Mycelzellen am Leben (Nachweis der toten Zellen durch Färbung mit Methylenblau 1:10 000 negativ). Die Tatsache, daß die Konzentration der Ascorbinsäure in der Kulturlösung größer wird als im Mycel, deutet auf das Vorhandensein eines *Membranpotentials* hin, d. h. der Pilz wendet zur Ausscheidung der Ascorbinsäure *Energie* auf.

Tabelle 34.

Vers. 70: Temp. 30° C, pH 2,25, 20 % Rohrzucker, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>. Die Ascorbinsäurekonzentration im Mycel wurde auf das darin enthaltene Wasser bezogen, das sich aus der Differenz zwischen Mycelfrischgewicht und Myceltrockengewicht ergab, g = cc gesetzt.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc	
	Kulturlösung	H <sub>2</sub> O des Mycels
2	0	18,0 (2,7)
5	2,10	2,7 (11,0)
8	3,06	0,8 (13,0)
11	1,52	0,3 (14,7)
14	0,88	0 (15,0)

Die in Klammern gesetzten Werte geben den H<sub>2</sub>O-Gehalt des Mycels (g) an.

Da die Ascorbinsäure hydrophile Eigenschaften besitzt und nicht lipoidlöslich ist, wird die Permeierfähigkeit dieses Stoffes *gering* sein. Man könnte sich vorstellen, daß durch das tiefe pH und die hohe Zuckerkonzentration die Permeabilität der Zellen verändert wird, so daß die Diffusion der Ascorbinsäure leichter erfolgen kann.

Da sich jedoch bei höherem pH und auch bei höherem pH und geringerem Zuckergehalt (s. Versuch 103 mit folgender Versuchsanordnung: Temp. 29°, pH 6,0, 20 % resp. 5 % Rohrzucker, vierfache Salzkonzentration, Stamm A<sub>7</sub>) *keine* Ascorbinsäure im Mycel nachweisen läßt, kann man nicht entscheiden, ob die Durchlässigkeit des Protoplasten unter diesen Bedingungen größer oder kleiner ist.

Eine Ausscheidungsbeschleunigung durch Konvektionsströme ist nicht wahrscheinlich.

### 3. Abhängigkeit der Ascorbinsäureproduktion von den Lebensbedingungen des Pilzes:

Wie schon im vorherigen Abschnitt angedeutet, tritt bei den für das Wachstum von *Aspergillus niger* *günstigeren* Lebensbedingungen (siehe Vers. 103) weder Ascorbinsäure noch Dehydroascorbinsäure im Mycel auf; auch die Kulturlösung weist dann nur einen sehr geringen Gehalt an Ascorbinsäure auf (0,22 mg/100 cc)<sup>1</sup>. Es stellt sich daher die Frage,

<sup>1</sup> Zur Bestimmung der Ascorbinsäure wurde die Formaldehydmethode (s.S.125) angewandt, um die übrigen stark reduzierenden Substanzen auszuschalten.

ob die Ascorbinsäure (ebenso wie die Zitronensäure) *nur* unter *extremen* physiologischen Bedingungen oder auch unter *normalen* Lebensverhältnissen entsteht. Z. B. könnte die Ascorbinsäure ein Zwischenglied in einer Reaktionsfolge sein, die unter für den Pilz ungünstigen Lebensbedingungen teilweise unterbrochen wird; dabei würden die nicht weiter verarbeiteten Zwischenprodukte, unter anderem Ascorbinsäure, an die Kulturlösung abgegeben. Entsprechend könnte unter normalen Bedingungen der Pilz die Fähigkeit haben, mehr Ascorbinsäure weiterzuverarbeiten, als er selbst zu produzieren imstande ist. Dies ist jedoch nicht der Fall: Bei Zugabe von 4—8 mg Ascorbinsäure zu unter günstigen Verhältnissen wachsenden Pilzkulturen wird *keine* Ascorbinsäure verbraucht (s. Tabelle 35).

Tabelle 35.

Vers. 104: Versuchsanordnung analog Vers. 118, S. 160. Temp. 28° C, pH 6,0, 5 % Rohrzucker, 4fache Salzkonzentration, Stamm A<sub>7</sub>. Zugabe von ca. 8 mg Ascorbinsäure nach 7 und 11 Tagen.

Tage	mg Ascorbinsäure/100 cc			
	Kulturen			
	7 Tage alt		11 Tage alt	
	V	K	V	K
0	8,24	8,24	8,10	8,10
2	5,24	4,84	5,40	5,02
4	2,89	2,21	3,02	2,65
6	1,26	0,87	1,36	1,02

## B. Über die Synthese der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*.

Die Synthese der Ascorbinsäure ist, wie schon auf S. 148 ff. erwähnt, an die *lebende* und *wachsende* Zelle gebunden. Daher gelang es auch nicht, durch Autolyse des Mycels ein Fermentsystem zu erhalten, das aus Rohrzucker Ascorbinsäure bilden könnte.

Ganz anders liegen dagegen die Verhältnisse bei der 2-Keto-l-gulonsäure als Ausgangsstoff für die Ascorbinsäuresynthese. Der Pilz vermag aus ihr unter gleichen Bedingungen wie aus Rohrzucker *große* Mengen von Ascorbinsäure zu bilden und sie auch zum Mycelaufbau zu verwenden. Im Gegensatz zu den Rohrzuckerversuchen verläuft die Umsetzung von Ketogulonsäure in Ascorbinsäure *unabhängig* vom Wachstum des Mycels:

Bringt man eine ausgewachsene Pilzdecke (auf Rohrzucker oder Ketogulonsäure kultiviert) auf eine Lösung von 15 % Ketogulonsäure



plus Mineralsalze, aber zur Ausschaltung des Wachstums *ohne* N-Quelle, so tritt doch Ascorbinsäure in der Kulturlösung auf (s. Tabelle 36).

Tabelle 36.

*Vers. 95* : Temp. 30° C, pH 2,2, 7,5 g Ketogulonsäure in 50 cc Lösung, Mineralsalze ohne NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Versuchsobjekt : Pilzdecke von A<sub>7</sub> (Myceltrockengewicht 1,8 g, auf Rohrzucker kultiviert). Kulturdauer 11 Tage.

2-Keto-l-gulonsäure g/50 cc		Ascorbinsäure mg/50 cc am Versuchsende <sup>1</sup>		
am Anfang	am Versuchsende <sup>1</sup>	Total- gehalt	chemisch <sup>2</sup> gebildet	vom Pilz gebildet
7,5	4,54	47,81	22,41	25,40

Nur ein sehr geringer Prozentsatz der aufgenommenen Ketogulonsäure geht in Ascorbinsäure über, der restliche Anteil der Ketogulonsäure dient wahrscheinlich der Atmung; eine quantitative Bestimmung des produzierten CO<sub>2</sub> wurde jedoch nicht durchgeführt.

Um zu prüfen, ob die Umwandlung von Ketogulonsäure in Ascorbinsäure auch außerhalb des Pilzes durch ein ausgeschiedenes *Ferment-system* in der Kulturlösung vor sich gehen kann, wurden folgende orientierende Versuche unternommen :

Der Ort, wo die gegenseitige Berührung von Ferment und Substrat stattfindet, ist das Mycel; denn sobald die Kulturlösung vom Mycel abfiltriert wird (Bakterienfilter), entsteht in ihr nur noch *gleichviel* Ascorbinsäure wie in einer Ketogulonsäurelösung, die *nie* mit Mycelien in Berührung stand.

Es gelingt jedoch, das Austreten des Fermentsystems aus den Pilzzellen zu erzwingen: Verdünnte Salzsäure vermag aus zehntägigen Pilzdecken das Fermentsystem herauszulösen (mit H<sub>2</sub>O dest. gelingt die Extraktion nicht) (s. Tabelle 37).

Die Bildungsgeschwindigkeit der Ascorbinsäure und ihre absolute Menge sind gering (in einigen Versuchen überhaupt nicht nachweisbar). Das *Alter* des extrahierten Mycels spielt dabei eine Rolle, *nicht aber das*

<sup>1</sup> Bestimmung der 2-Keto-l-gulonsäure nach *Elger* (1936) : Lösung im Vakuum bei 50° C zur Trockene eingedampft, mit 3 Teilen HCl-Eisessig (2,7% HCl-Gas in Eisessig) aufgenommen und genau 30 Minuten bei 98° C erhitzt (H<sub>2</sub>O-Bad), mit H<sub>2</sub>O verdünnt und die Ascorbinsäure mit Tillmans Reagens bei pH 2,0 titriert. In Parallelversuchen mit ungefähr der gleichen Menge an Ketogulonsäure und Ascorbinsäure wird dieselbe Operation wiederholt. Daraus ergibt sich, wieviel Ascorbinsäure unter den gegebenen Bedingungen aus Ketogulonsäure entstehen kann. Die Umsetzung ist stark von der Konzentration der Ketogulonsäure abhängig.

<sup>2</sup> Da 2-Keto-l-gulonsäure unter den Versuchsbedingungen teilweise in Ascorbinsäure übergehen kann, ist ein Kontrollversuch nötig zur Bestimmung der rein chemisch gebildeten Ascorbinsäure.

*Substrat*, auf dem der Pilz gewachsen war. Bei verschiedenen Konzentrationen des Substrates werden auch entsprechend verschiedene Mengen an Ascorbinsäure gebildet. Ein doppelt so großer Zusatz von Fermentlösung erhöht die Ausbeute, wenn auch nicht proportional. Bei höherem pH ist die umgesetzte Menge geringer, in einigen Versuchen sogar Null.

Tabelle 37.

*Vers. 94* : 4 Myceldecken, A<sub>7</sub> (Trockengewicht zirka 0,8 g auf Ketogulonsäure gewachsen) mit 25 cc verd. HCl (pH 2,2) 24 Stunden überschichtet. (Temp. 30° C.) Danach je 10 cc dieser « Fermentlösung » einer Lösung von 2 g resp. 3,75 g Ketogulonsäure in 15 cc H<sub>2</sub>O + Salze ohne NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> zugesetzt (pH 2,2, Temp. 30° C.). In einem Kontrollversuch wurde die « Fermentlösung » zuerst 15 Min. auf 100° C erhitzt zur Zerstörung des Fermentes und die nicht auf enzymatischem Wege entstandene Ascorbinsäure von zirka 2 bis 6 mg von den anderen Werten abgezogen. m = zirka ± 0,5.

Stunden	mg Ascorbinsäure/100 cc	
	2-Keto-l-gulonsäure	
	2 g	3,75 g
8	2,0	4,3
24	6,4	14,8
48	3,2	6,6
72	2,8	7,2

Es wird also nur ein Bruchteil des Fermentes durch Extraktion mit verdünnter Säure erhalten. Man könnte annehmen, daß der *Hauptteil* des Fermentes nur nach Zerstörung der Protoplasmastruktur in die wässrige Lösung übertritt. Zum Abtöten der Zellen und zur Auflockerung des Zellgefüges wurde die Pilzdecke nach Zusatz des Zellgiftes Toluol der schnellen *Autolyse* nach Willstätter (1920) unterworfen (s. Tabelle 38).

Auch hier zeigte sich nur eine geringe Aktivität. Um einen tieferen Einblick in den Wirkungsmechanismus des Fermentes zu erhalten, müßten konzentriertere Enzympräparate dargestellt werden. Erst mit diesen hat es dann einen Sinn, die Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur usw.) genauer zu untersuchen.

Die bis jetzt gewonnenen Resultate beweisen auf jeden Fall, daß die Umwandlung von Ketogulonsäure in Ascorbinsäure durch *Aspergillus niger* an ein *extrahierbares Fermentsystem* gebunden ist und *nicht* wie die Bildung aus Rohrzucker mit dem *Wachstumsvorgang des Mycels* zusammenhängt.

Aus der Tatsache, daß die Umlagerung von Ketogulonsäure in Ascorbinsäure *nur* bei *tiefem* pH vor sich geht (s. oben), erklärt sich, warum trotz der günstigeren Lebensverhältnisse bei pH 6,0 *Aspergillus niger* zwar auf Ketogulonsäure wächst, aber dann *keine* Ascorbin-



säure (sondern Oxalsäure) bildet, wie z. B. im Versuch 101: Temp. 30° C, pH 6,0, 7,5 g Ketogulonsäure in 50 cc Lösung, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>. Keine Ascorbinsäure, Oxalsäure in Spuren.

Tabelle 38.

Vers. 108: Das Mycel (A<sub>7</sub>) wird mit der Hand von H<sub>2</sub>O abgepreßt, mit dem Hornmesser gut zerkleinert, mit 2 Teilen H<sub>2</sub>O + HCl (pH 2,2),  $\frac{1}{20}$  des Gewichtes an Toluol und Quarzsand solange zerrieben, bis alles verflüssigt ist (zirka 1 Stunde) und bei 20° C der Autolyse überlassen. Nach 24- resp. 48stündigem Stehen wird die Lösung durch Zentrifugieren von den ungelösten Zellresten befreit. 10 cc dieser Lösung zu Ketogulonsäure gegeben (analog Vers. 94, S. 165). Die rein chemische Umsetzung der Ketogulonsäure in Ascorbinsäure wurde berücksichtigt.

mg Ascorbinsäure/100 cc		
Stunden	Autolysendauer	
	24 Stunden	48 Stunden
3	—	1,76
24	2,64	2,20
48	4,34	—
72	8,60	8,00

Es gelingt jedoch, bei einem anfänglichen pH von 6,0, Ascorbinsäure zu erhalten, wenn man Ketogulonsäure (5 g/100 cc) einer Rohrzuckerlösung (15 g/100 cc) zugibt. Es sei aber erwähnt, daß durch die dabei entstehende Oxalsäure das pH sehr schnell auf 4,0 sinkt. Bei pH 2,2 kann durch diese Versuchsanstellung dieselbe Ascorbinsäureausbeute erhalten werden wie aus 15 g Ketogulonsäure als einzige C-Quelle, obwohl hier die Ketogulonsäure in dreimal geringerer Menge vorhanden ist (s. Tabelle 39).

Es zeigt sich also, daß ein gutes Wachstum die Ascorbinsäureproduktion aus Ketogulonsäure ebenfalls günstig beeinflusst.

Die hohen Ausbeuten an Ascorbinsäure aus Ketogulonsäure deuten darauf hin, daß die 2-Keto-l-gulonsäure als *Zwischenprodukt* der Ascorbinsäuresynthese im Pilz anzusehen ist. Diese beiden Substanzen sind auch chemisch nahe verwandt. Sie unterscheiden sich nur durch die Enolgruppe und den Lactonring. Trotz der Tautomerie dieser Stoffe kann die Ketogulonsäure chemisch nur unter energischen Bedingungen in die Ascorbinsäure übergeführt werden. Gegen Alkalien ist die Ketogulonsäure äußerst beständig. In saurer Lösung dagegen tritt Enolisierung ein, da dann wahrscheinlich der stabile Lactolring der Osonsäure partiell zur freien Ketoform geöffnet wird (Reichstein, 1936). Das tiefe pH setzt aber die Enolisierungsgeschwindigkeit herab.

Da in unseren Versuchen der Pilz nur in stark saurer Lösung zur Umlagerung der Ketogulonsäure in Ascorbinsäure befähigt ist, kann man sich fragen, ob das Öffnen des Lactolringes oder die Enolisierung

oder beide Vorgänge (die Lactonisierung vollzieht sich von selbst) fermentativ erfolgen. Es ist gut möglich, daß der Pilz *nur* die Enolisierung beschleunigt; denn bei pH 2 liegt die Ketogulonsäure zum Teil in der freien Carbonylform ohne Lactolring vor (s. oben). Vielleicht ist die pH-Abhängigkeit der Umwandlung von Ketogulonsäure in Ascorbinsäure überhaupt der Grund dafür, daß *Aspergillus niger* nur in stark sauren Kulturlösungen Ascorbinsäure zu bilden vermag, obwohl das pH in der Kulturlösung und in der reagierenden Zelle ja nicht gleich zu sein braucht.

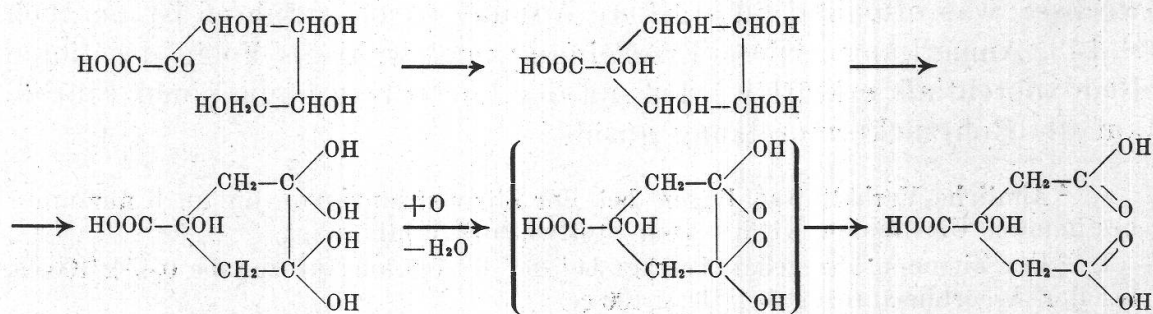
Tabelle 39.

Vers. 111: Temp. 30° C, pH 6,0 resp. 2,2, 15% Rohrzucker, 5% Ketogulonsäure, Mineralsalze, Stamm A<sub>7</sub>. m = ± 0,5 bis 1,1. Die im Kontrollversuch erhaltene Ascorbinsäure (s. Anmerkung 2, S. 164) wurde berücksichtigt.

mg Ascorbinsäure/100 cc		
Tage	Anfangs- pH 2,2	Anfangs- pH 6,0
4	1,3	1,3
7	14,0	7,0
10	39,2	13,2
12	56,3	17,6

Nach 12 Tagen betrug das Myceltrockengewicht bei pH 2,2: 2,38 g und bei pH 6,0: 3,18 g; der Zuckerverbrauch betrug bei pH 2,2: 6,20 g und bei pH 6,0: 9,8 g. Bei pH 6,0 tritt auch in größerer Menge Oxalsäure auf, die das pH herabsetzt (zirka 3,8 bis 4,0). (Auf 15 g Ketogulonsäure wurden nach 12 Tagen ebenfalls zirka 50 mg Ascorbinsäure gebildet.)

Aus der Annahme, daß die Ketogulonsäure *allgemein als Zwischenprodukt in der Ascorbinsäuresynthese* von *Aspergillus niger* aufzufassen ist, ergibt sich die Frage nach den *Vorstufen* der Ketogulonsäure. Letztere könnte durch *direkte* Umwandlung der Hexosen, ohne Aufspaltung der C-Ketten, entstehen. Nach Butkewitsch (1938) wäre eine solche Ascorbinsäuresynthese mit der Zitronensäurebildung gekoppelt. Er schloß dies aus dem gemeinsamen Auftreten dieser Säuren bei vielen Früchten. Aus der Ketogulonsäure würde einerseits Ascorbinsäure, anderseits Zitronensäure nach folgendem Schema entstehen:





Gegen diese Annahme sprechen zwei gewichtige Gründe. Erstens ist keine biologische Reaktion von Hexosen bekannt, in der ein Konfigurationswechsel in 5-Stellung auftritt. Zweitens bildet *Aspergillus niger* aus Ketogulonsäure als C-Quelle nur eine verschwindend kleine Menge von Zitronensäure. Es ist darum sehr wahrscheinlich, daß Substanzen mit C<sub>6</sub>-Ketten zunächst in Zwischenstufen mit kürzeren C-Ketten aufgespalten werden, aus denen dann C-Ketten mit beliebiger Konfiguration und Verzweigung neu aufgebaut werden können. Dafür spricht zudem die Tatsache, daß Ascorbinsäure durch *Aspergillus niger* auch aus ganz verschiedenen Hexosen, aus Hexiten, sowie auch aus Xylose, Glycerin und Glycerinaldehyd gebildet werden kann. Die unterschiedlichen Ausbeuten ließen sich aus den verschiedenen Abbaureaktionen zwanglos erklären; der Aufbau der Ascorbinsäure wird ja wahrscheinlich nach dem gleichen Schema erfolgen.

### C. Stellung der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*.

Die Ascorbinsäure tritt *genau* so wie die anderen, vom Pilz gebildeten Säuren, nur unter bestimmten Bedingungen als Umwandlungsprodukt von Zucker auf. Sie ist ein im Verlauf der Dissimilationsvorgänge entstandenes *Endprodukt* des Pilzes, da sie im allgemeinen nicht mehr in den Stoffwechsel von *Aspergillus niger* zurückkehrt (s. Tabelle 33, S. 160). Unter bestimmten Verhältnissen jedoch kann *Aspergillus niger* die Ascorbinsäure auch *assimilieren*, und zwar dann, wenn sie als *einzige* C-Quelle in der Lösung vorhanden ist<sup>1</sup>: Der Umsatz an Ascorbinsäure ist zwar sehr gering, und demzufolge bildet sich nur eine dünne Myceldecke. Auffallend ist, daß der Pilz auf Ketogulonsäure besser wächst (ökonomischer Koeffizient der Ketogulonsäure 0,15 bis 0,2), trotz der chemisch so nahen Verwandtschaft dieser beiden Substanzen. Vor allem zeigt sich der Unterschied auch deutlich bei ihrer Zugabe (5 g) zu Rohrzucker (15 g) als C-Quelle in der üblichen Nährlösung. Während die Ketogulonsäure das Wachstum der Pilzdecke *nicht* beeinträchtigt (Myceltrockengewicht 2,38 g; Zuckerverbrauch 6,2 g in 12 Tagen), *hemmt* die Ascorbinsäure, trotz gesteigerten Zuckerverbrauchs, die Mycelbildung beträchtlich (Myceltrockengewicht 1,50 g; Zuckerverbrauch 7,2 g in 12 Tagen<sup>2</sup>), verschiebt also das Verhältnis von *Bau-* und *Betriebsstoffwechsel*, was offenbar auf stärkere Atmung zurückzuführen ist (s. auch S. 143, Anmerkung). Diese Erscheinung muß wohl als Folge des tiefen Redoxpotentials erklärt werden, da der Lactonring kaum einen Einfluß auf die Rohrzuckerumsetzung ausübt.

<sup>1</sup> Ähnliche Verhältnisse liegen bei der Zitronensäure vor, die auch nur unter bestimmten Umständen wieder vom Stoffwechsel erfaßt wird.

<sup>2</sup> Der Zitronensäuregehalt beträgt bei der Ketogulonsäurezugabe 0,45 g/100 cc, bei der Ascorbinsäurezugabe 0,30 g/100 cc.

Je nach Versuchsanordnung zeigen sich ganz *verschiedene* Wirkungen der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von *Aspergillus niger* :

Bei Zugabe *größerer* Ascorbinsäuremengen tritt eine deutliche Wachstumshemmung im Zusammenhang mit einem starken Zuckerverbrauch auf; bei *kleiner* Ascorbinsäurezugabe ist nur der größere Zuckerverbrauch und eine *Hemmung der Säurebildung* feststellbar.

Gibt man die Ascorbinsäure in kleinen Mengen schon bei der *Keimung der Sporen* zu der Kulturlösung, dann wirkt sie *wachstumsfördernd*, gleichzeitig damit wird bei Stämmen, die ihr *Bildungsvermögen* für Ascorbinsäure und Zitronensäure verloren haben, dieses wieder hergestellt.

Schließlich kann die Ascorbinsäure bei völliger Abwesenheit anderer C-Quellen auch als *Nährstoff* dienen.

Die Funktion der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von *Aspergillus niger* ergibt sich also nicht nur aus *chemischen und physikalischen* Eigenschaften dieser Säure, sondern sie hängt auch weitgehend von der Gegenwart anderer Substanzen und vor allem von den *speziellen Lebensbedingungen* des Pilzes ab und kann sich daher von Fall zu Fall und auch im Laufe seiner Entwicklung ändern.

---

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber vom April 1943 bis Januar 1945 ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber für seine Anregungen und wertvollen Ratschläge, sowie für das mir stets erwiesene Wohlwollen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Dem verstorbenen Vorsteher der Botanischen Anstalt, Herrn Prof. Dr. G. Senn, schulde ich Dank für die Überlassung von Institutsmitteln, sowie für sein reges Interesse, das er meiner Arbeit freundlicherweise entgegenbrachte.

Der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG., Basel*, danke ich für das Interesse an der Arbeit und die mannigfache Unterstützung, die sie mir hat zuteil werden lassen.

---

## Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

### Experimentelle Ergebnisse.

1. Es werden Methoden zur Kultivierung von *Aspergillus niger* und zur Bestimmung seiner Stoffwechselprodukte, besonders der Ascorbinsäure, beschrieben.
2. Unter den für die Zitronensäurebildung geeigneten Kulturbedingungen vermag der Pilz aus Zuckern geringe Mengen von *l*-Ascorbinsäure zu produzieren.
3. Zum Nachweis der Ascorbinsäure (ca. 2 bis 4 mg/100 cc) in den Kulturlösungen wurden drei Methoden verwendet:
  - a) Isolierung aus zuckerhaltigen Kulturlösungen durch *Adsorption* der *l*-Ascorbinsäure an Bleicitrat und Identifizierung durch ihr Osazon.



- b) Isolierung der l-Ascorbinsäure aus zuckerfreien Kulturlösungen, indem *Aspergillus niger* *Glycerin* als Substrat geboten wurde und Identifizierung ebenfalls durch ihr Osazon.
- c) *Biologische* Prüfung der Kulturlösungen am Meerschweinchen durch den Skorbuttest.
4. Neben Ascorbinsäure befindet sich in überwiegender Menge *Zitronensäure* in den Kulturlösungen. Bei einigen Stämmen von *Aspergillus niger* treten auch geringe Mengen an *Gluconsäure* auf.
  5. Die Zitronensäure- und Ascorbinsäurebildung stehen nicht in stöchiometrischem Zusammenhang.
  6. Die für die Ascorbinsäurebildung geeigneten Kulturverhältnisse sind: C-Quelle in hoher Konzentration, stark saures Medium, bestimmte Nährsalzkonzentrationen, Ergänzung der N-Quelle, hohe Temperatur, aerobe Verhältnisse, wachsendes Mycel, öfteres Wechseln der Kulturlösungen.
  7. Als C-Quelle können außer Rohrzucker folgende Substanzen dienen: Hexosen, Hexite, Disaccharide, C<sub>3</sub>- und C<sub>5</sub>-Körper.
  8. Bei Mangel an N-haltigen Nährsalzen wird die Ascorbinsäurebildung unterbrochen.
  9. Die Ascorbinsäure ist unter den genannten Bedingungen auch *im Mycel* nachweisbar.
  10. *Dehydroascorbinsäure* tritt weder in der Kulturlösung noch im Mycel auf.
  11. Die Fähigkeit zur Ascorbinsäurebildung aus Zuckern ist bei den verschiedenen Rassen von *Aspergillus niger* verschieden groß; sie nimmt auch mit der Zeit ab (parallel mit der Zitronensäurebildung), kann aber für einige Zeit wieder *regeneriert* werden.
  12. *Aspergillus niger* vermag die Ascorbinsäure, wenn sie als *einzige* C-Quelle vorhanden ist, zum Aufbau des Mycels und zur Gewinnung von Energie zu benutzen.
  13. Es gelang nicht, aus Pilzdecken von *Aspergillus niger* ein Fermentsystem zu extrahieren, das aus Hexosen Ascorbinsäure zu bilden vermöchte.
  14. Dagegen ist die Ascorbinsäurebildung aus 2-Keto-l-gulonsäure an ein *extrahierbares* Fermentsystem gebunden.
  15. *Aspergillus niger* enthält und gibt in die Kulturlösung ein Stoffsystem ab, das die Geschwindigkeit der Ascorbinsäureoxydation durch Luftsauerstoff herabsetzt.

#### *Folgerungen*

16. Die Kurve des Ascorbinsäuregehaltes als Funktion der Zeit ergibt sich *allein* aus Bildung und Oxydation; es findet also kein Verbrauch statt.
17. Die Ascorbinsäure ist kein Produkt des *normalen* Pilzstoffwechsels.

18. Die Bildung der Ascorbinsäure erfolgt *intracellulär*, ihre Ausscheidung in die Kulturlösung unter Energieaufwand.
19. Die Ascorbinsäuresynthese aus Zuckern hängt zwar mit dem Mycelaufbau zusammen, bildet aber keine Voraussetzung für das Wachstum.
20. Die Ascorbinsäurebildung aus 2-Keto-l-gulonsäure ist dagegen nicht an die Voraussetzung wachsenden Mycels gebunden.
21. Die Ketogulonsäure scheint Zwischenstufe der biologischen Ascorbinsäuresynthese zu sein.
22. Die Funktion der Ascorbinsäure im Stoffwechsel von *Aspergillus niger* hängt nicht nur von den chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Säure, sondern auch wesentlich von den Lebensbedingungen des Pilzes ab: Die Ascorbinsäure kann als *Nährstoff*, als *Wirkstoff* (zur Regeneration des Säurebildungsvermögens), sie kann auch *wachstumsfördernd* und *wachstumshemmend* wirken.

#### Zitierte Literatur.

- 1936a. Ammon, R.: Die chemische Isolierung des C-Vitamins aus der menschlichen Placenta. Biochem. Ztschr. **288**, 93—101.
- 1936b. — Versuche über den chemischen Nachweis der Ascorbinsäure im Urin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Biochem. Ztschr. **288**, 101—109.
1932. Bernhauer, K.: Oxydative Gärung. J. Springer, Berlin.
- 1936a. — und Iglauer, A.: Über die Säurebildung aus Zuckern durch *Aspergillus niger*: Faktoren der Zitronensäureanhäufung. Biochem. Ztschr. **286**, 45—59.
- 1936b. — Görlich, B. und Köcher, E.: Über die Bildung C-vitaminähnlicher Substanzen durch Pilze und Bakterien. Biochem. Ztschr. **286**, 60 bis 65.
- 1939a. — Gärungsschemisches Praktikum. J. Springer, Berlin.
- 1939b. — Oxydative Gärungen. In Nord und Weidenhagen: Handbuch der Enzymologie. Bd. II, Leipzig.
1941. — und Knobloch, H.: Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*: Faktoren der Zitronensäureanhäufung. Biochem. Ztschr. **309**, 151—178.
1936. Birkinshaw, J. H., Oxford, A. E. and Raistrick, H.: Penicillic acid, a metabolic product of *Penicillium Puberulum* Bainier and *Penicillium Cyclopium* Westling. Biochem. J. **30**, 394—411.
1936. — and Raistrick, H.: Isolation, properties and constitution of terrestrial acid (ethylcarolic acid), a metabolic product of *Penicillium terrestre* Jensen. Biochem. J. **30**, 2194—2200.
1937. Bonner, J.: The rôle of vitamins in Plant development. Bot. Review Vol. **3**, Nr. 12, 616—640.
1938. — and D.: Ascorbic acid and the growth of plant embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. **24**, Nr. 2, 70—75.
1939. Bukatsch, F.: Über die Rolle der Ascorbinsäure in den Chloroplasten. I. Mitteilung. Planta **30**, 118—128.
1940. — II. Mitteilung. Planta **31**, 209—221.
1938. Butkewitsch, Wl. S.: On the question of intermediate phases of biochemical transformation of sugar into citric acid. C. r. Acad. Sci. URSS **18**, 663.



1937. Chrzaszcz, T. und Zakomorny, M.: Über die physiologische De- und Regeneration von Schimmelpilzen mit kräftiger Zitronensäureerzeugung. Biochem. Ztschr. **291**, 312—324.
1933. Clutterbuck, P. W. and Raistrick, H.: The molecular constitution of the metabolic products of *Penicillium Brevi-Compactum Dierckx* and related species. II. Mycophenolic acid. Biochem. J. **27**, 654—667.
1934. — — Haworth, W. N., Smith, G. and Stacey, M.: The metabolic products of *Penicillium Charlesii* G. Smith. Biochem. J. **28**, 97—110.
1935. — — and Reuter, F.: The metabolic products of *Penicillium-Charlesii* G. Smith. II. The molecular constitution of carolic acid and carolinic acids. Biochem. J. **29**, 300—321.
1935. — — III. The molecular constitution of carlic acid and carlosic acids. Biochem. J. **29**, 871—883.
1937. Daniel, E. P. and Munsell, H. E.: Vitamin content of foods. Washington, United States Department of Agriculture: Miscellaneous Publication n° 275.
1935. Dewjatnin, W. and Doroschenko, W.: A chemical method for determining Vitamin C. C. r. Sci. Acad. URSS 177—180.
1936. Elger, F.: Über die Umlagerung der l-Gulonsäure in l-Ascorbinsäure. Festschrift E. C. Barell, Basel, 229.
1943. Enders, C.: Über die Natur der reduzierenden Substanz, die die Vitamin-C-Bestimmung mit Tillmans Reagens stört. Biochem. Ztschr. **314**, 389 bis 398.
1934. Euler, H.: Chemie der Enzyme. II. Teil, 3. Abschnitt, 385 und 427, München.
1890. Fischer, E.: Berichte Dtsch. Chem. Ges. **23**, I 779.
1938. Fisher, R. A.: Statistical methods for research workers, London.
1938. Fries, N.: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symbolae Botanicae Upsalienses, Uppsala III. **2**, 1—188.
1937. Fukumuto, J. und Shimomura, H.: Über die Erzeugung einer Vitamin C ähnlichen reduzierenden Substanz durch Schimmelpilze. J. Agr. Chem. Soc. Japan **13**, 613. Ref.: An. Rev. Biochem. 1940.
1944. Geiger-Huber, M. und Galli, H.: Über die Bildung der Ascorbinsäure durch Schimmelpilze. Verh. Naturf. Ges. Basel, **56**, 37—57.
1945. — — Über den Nachweis der l-Ascorbinsäure als Stoffwechselprodukt von *Aspergillus niger*. Helv. Chim. Acta **28**, 248—250.
1934. Giroud, A., Ratsimamanga, R. et Leblond, C.-P.: Parallélisme entre la vitamine C et le chlorophylle. Compt. rend. Soc. Biol. Paris **117**, 612.
1935. — — Relations entre la vitamine C et les carotinoïdes. Compt. rend. Soc. Boil. Paris **118**, 874.
1937. Glick, D.: Die quantitative Verteilung der Ascorbinsäure im wachsenden Gerstenembryo. Ztschr. physiol. Chem. **245**, 211—216.
1939. Gstirner, F.: Chemische Vitaminbestimmungsmethoden. Enke, Stuttgart.
1935. Guha, B. C. and Ghosh, A. R.: Biological formation of ascorbic acid. Nature **135**, 234.
1936. Hausen von, S.: Die Rolle des Vitamins C beim Wachstum der höheren Pflanzen. Biochem. Ztschr. **288**, 378—392.
1935. Havas, L.: Ascorbic acid (Vitamin C) and the germination and growth of seedlings. Nature **136**, 435.
1935. Hermann, S. und Fodor, N.: C-Vitamin-(l-Ascorbinsäure-)bildung durch eine Symbiose von Essigbakterien und Hefen. Biochem. Ztschr. **276**, 323—325.

1941. H ö r m a n n, B.: Unsere natürlichen Vitamin-C-Spender. Verl. der Pflanzenwerke, München.
1928. J a n k e, A. und Z i c k e s, H.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Dresden-Leipzig.
1937. K a s h e v n i k, L. D.: Die Biochemie des Vitamins C. 3. Fähigkeit des japanischen Teepilzes zur Synthese des Vitamins C. Bull. Biol. Med. exp. URSS **3**, 181—182. Ref.: Chem. C. II 2860, 1937.
- 1932a. K l e i n, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. **2**, 463—476. Wien.
- 1932b. — Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. **2**, 834. Wien.
1933. K l u y v e r, A. J. und P e r q u i n, L. H. C.: Zur Methodik der Schimmelfeststoffwechseluntersuchung. Biochem. Ztschr. **266**, 68—81.
1943. K u h n, A. und G e r h a r d, H.: Über die Adsorption des Vitamins C. Kolloid-Ztschr. **103**, 130—135.
- 1919/20. L a p p a l a i n e n, H.: Biochemische Studien an *Aspergillus niger*. Finska Vetenskapf-Societetens Förhandlingar, Bd. **LXII**, Afd., A, Nr. 1, 1—85.
1942. L u g g, J. W. H.: Use of formaldehyde in the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. Nature **150**, 577.
1938. M a n c e a u, P., P o l i c a r d, A.-A. et F e r r a n d, M.: Sur la production par deux espèces de « *Penicillium* » de substances réductrices analogues à l'acide ascorbique. Bull. Soc. Chim. Biol. Lyon, **20**, 82—92.
1943. M a p s o n, L. W.: Ascorbic acid in dehydrated foods. Nature **152**, 13—14. (J. Soc. Chem. Ind. Lond. **62**, 223.)
1941. M i r i m a n o f f, A.: Quelques aspects du problème de la vitamine C dans les végétaux. Pharmac. Acta Helv. **16**, 163—168.
1939. M o l d t m a n n, H. G.: Untersuchungen über den Ascorbinsäuregehalt der Pflanzen in seiner Abhängigkeit von inneren und äußeren Faktoren. Planta **30**, 297—342.
1938. N o w o t e k n o w, N. W. und W a d o w a, W. A.: Einfluß von Ascorbinsäure auf die Säurebildung durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger*. Mikrobiologie (russ.) **7**, 950—957. Ref.: Chem. C. II 1702, 1939.
1938. P e r q u i n, L. H. C.: Bijdrage tot de kennis der oxydatieve dissimilatie van *Aspergillus niger* van Tieghem. Diss. Delft.
1934. R a y, S. N.: On the nature of the precursor of the Vitamin C in the vegetable kingdom. Biochem. J. **28**, 996—1003.
1934. R e i c h s t e i n, T., G r ü ß n e r, A. und O p p e n a u e r, R.: Synthese der Ascorbinsäure und verwandter Verbindungen nach der Oson-Blausäure-Methode. Helv. Chim. Acta **17**, 510—520.
1936. — und D e m o l e, V.: Übersicht über Chemie und biologische Wirkung der Ascorbinsäuregruppe (Vitamin C). Festschrift E. C. Barell, Basel, 120.
1942. R e i d, M. E.: Effect of variations in light intensity, length of photoperiod and availability of nitrogen upon accumulation of ascorbic acid in cowpea plants. Bull. Torrey Bot. Club. **69**, n° 3, 204.
1939. — and W e i n t r a u b, R. L.: Synthesis of ascorbic acid in excised roots of the white moonflower. Science **89**, 587—588.
1942. R o b b i n s, W. J. and K a v a n a g h, V.: Vitamin deficiencies of the filamentous fungi. Bot. Review Vol. **8**, n° 7, 411—471.
1939. R u b i n, B. A., A r z i c k o w s k a j a, J. W., S p i r i d o n o w a, N. S. und L u l i k o w a, O. T.: Über die Quelle der Bildung des Vitamins C in der lebenden pflanzlichen Zelle. Biochemie (Moskau, russ.) **4**, 260—267. Ref.: Chem. C. II 3719, 1939.
1939. R u d r a, M. N.: Die Rolle des Mangans bei der biologischen Ascorbinsäuresynthese. Biochem. Ztschr. **301**, 238—244.



1933. Sah, P. P. T.: Struktur von Vitamin C (Ascorbinsäure) und seine Theorie seiner Bildung. Sci. Rep. Nat. Tsing. Hua Univ. **2**, 167—190. Ref.: Chem. C. I 3762, 1934.
1943. Schopfer, W. H.: Plants and Vitamins. Waltham, Mass. U.S.A.
1939. Steinberg, R. A.: Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. Bot. Review Vol. **5**, Nr. 6, 327—350.
1935. Strohecker, R.: Über die Bildung, Entstehung und das örtliche Vorkommen von Vitamin C in pflanzlichen Geweben. Ztschr. Unters. Lebensmittel **70**, 76—81.
1939. Sugawara, T.: Studies on the formation of ascorbic acid (Vitamin C) in plants. 1. Influence of light on the ascorbic acid contents in various etiolated seedlings. Jap. J. Bot. **10**, 141—150.  
2. Influence of radiation of different wavelength on the ascorbic acid contents in etiolated seedlings. Jap. J. Bot. **10**, 325—333.
1941. — Relation between the accumulation of ascorbic acid and the carbohydrate contents in plants. Jap. J. Bot. **11**, 148—165.
1938. Tadokoro, T. und Ito, K.: Über die Ascorbinsäurebildung aus Mannose in Pflanzen und im Tierkörper. Bull. agric. chem. Soc. Japan **14**, 89. Ref.: Chem. C. I 2626, 1939.
1930. Treadwell, F. P.: Lehrbuch der analytischen Chemie. Bd. II, 509.
1933. Virtanen, A., Hausen von, S. und Saastemoinen, S.: Untersuchungen über die Vitaminbildung in Pflanzen. Biochem. Ztschr. **267**, 179.
1942. Wachholder, D.: Über das Ascorbinsäure-Oxydationsvermögen pflanzlicher Extrakte. (Zugleich ein Beitrag zur Untersuchung der verschiedenen Arten von Ascorbinsäureoxydation überhaupt.) Biochem. Ztschr. **312**, 394—432.
1935. Wassiljew, G.: Über die biochemische Charakterisierung einiger Stämme von *Aspergillus niger* hinsichtlich ihres Säurebildungsvermögens. Biochem. Ztschr. **278**, 226—234.
1920. Willstätter, R. und Racke, F.: Zur Kenntnis des Invertins. Ann. d. Chemie **425**, 1—135.
1943. Wokes, F., Organ, J. G., Duncan, J. and Jakoby, F. C.: Apparent vitamin C in certain foodstuffs. Nature **152**, 14—15. (J. Soc. Chem. Ind. Lond. **62**, 232, 1943.)
1943. — Apparent vitamin C in foods. Biochem. J. **37**, 695—702.
1942. Wolf-Heidegger, G. und Waldmann, H.: Zur Spezifität des histochemischen Vitamin-C-Nachweises nach Giroud und Leblond. Ztschr. Vitaminforsch. Bern. Bd. **12**, Heft 1/2.
1942. Würgler, W.: Über das Wachstum der Wurzeln von Zen Mays in Organkultur und seine Beeinflussung durch Wirkstoffe. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52**, 239—271. (Diss. Basel.)
1944. Zeller, E. A.: Stand der Vitaminforschung und Vitaminversorgung.  
*Anmerkung bei der Korrektur*: Die beiden folgenden Arbeiten  
Carroll, G. H.: The Rôle of Ascorbic Acid in Plant Nutrition. Botanical Review **1943**, **9**, 41—48  
Somogyi, J. C.: Versuche über Wirkstoffe, die den Ascorbinsäureabbau hemmen. Ztschr. Vitaminforsch. **1945**, **16**, 134—168  
konnten leider nicht mehr berücksichtigt werden, da bei Abschluß der Arbeit die erste des Krieges wegen noch nicht zur Verfügung stand, die zweite aber noch nicht erschienen war.