Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 64 (1954)

Artikel: Vergleichende Untersuchungen über das Bildungsvermögen verschiedener Arten von Aspergillus für Lactoflavin

Autor: Emmenegger, Titus

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-45162

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: 13.12.2025

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

Vergleichende Untersuchungen über das Bildungsvermögen verschiedener Arten von Aspergillus für Lactoflavin

Von *Titus Emmenegger*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 21. Juli 1954

Inhalt

	Seite
Einleitung	453
Methodisches	455
1. Wahl und Herkunft der *Aspergilli*	455
2. Kultivierung der *Aspergilli*	456
3. Bestimmung von Lactoflavin	457
a) Fluorimetrisch	457
b) Mikrobiologisch	458
Bedingungen der Lactoflavinbildung	461
1. Einfluß der Temperatur auf die Mycel- und Lactoflavinbildung	461
2. Einfluß der Konzentration an Magnesiumionen auf die Mycel- und Lactoflavinbildung	463
3. Einfluß von Kohlehydraten auf die Mycel- und Lactoflavinbildung	467
a) Saccharose	467
b) Glucose	471
4. Einfluß von Stickstoffquellen auf die Mycel- und Lactoflavinbildung	474
a) Ammoniumionen	474
b) Nitrationen	475
5. Lactoflavinbildung in Schüttelkultur	476
6. Über die Ausscheidung des Lactoflavins aus dem Mycel	478
7. Über einen Vergleich der systematisch-morphologischen Gruppierung von *Aspergilli* mit einer solchen nach dem Bildungsvermögen für Lactoflavin	480
Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse	483
Literaturverzeichnis	484

Einleitung

Die große biologische Bedeutung des Lactoflavins liegt darin, daß es in den pflanzlichen und tierischen Zellen unentbehrlich ist für die Zellatmung und zur Bildung des «gelben Atmungsfermentes» (Warburg und Christian, 1932 a, 1932 b, 1933).

Auch Bakterien, Hefen und Pilze haben die Fähigkeit der Flavinsynthese: Lavollay und Laborey (1937, 1938, 1939), Scheunert und Schieblich (1936), Raffy und Fontaine (1937), Kitavin (1940), Knobloch und Sellmann (1941), Carpenter und Friedländer (1942), Pontovich (1943), Di-

kanskaja (1950), Levin (1951), Sarasin (1953); für zusammenfassende Literatur siehe in «*Annual Review of Biochemistry*».

Wir wissen allerdings wenig über die Bedingungen, die zur Biosynthese bzw. Überproduktion des Lactoflavins führen, noch auch kennen wir die Gesetzmäßigkeiten der Wechselwirkung zwischen der Bildung des Vitamins und seiner Ausscheidung oder die Anteilnahme bestimmter Zellelemente hieran (Dikanskaja, 1950).

1897 beschrieb Meissner das Auftreten einer gelben Färbung des Mycels von *Aspergillus glaucus;* die alkoholischen und wässerigen Extraktlösungen fluoreszierten gelb-grün. Milburn (1904) beobachtete ein goldgelbes Pigment von *Asp. niger* als Körnchenausscheidung der Lufthyphen. Klöcker (1916) stellte das Vorhandensein eines flavinähnlichen Stoffes in der Kulturlösung von *Asp. glaucus* fest. Er konstatierte schon damals, also lange bevor Lactoflavin bekannt war, daß in einer solchen Kulturlösung sich ein fluoreszeïnähnlicher Stoff bildete, der folgende Eigenschaften aufwies:

1. Der Ätherauszug war gelb gefärbt mit blauer Fluoreszenz (offenbar war Lactoflavin durch Einwirkung von Licht in Lumichrom umgewandelt worden).
2. Durch Zusatz von Ammoniak zeigte sich eine grüne Fluoreszenz (dies könnte die Unwandlung in Lumiflavin gewesen sein).
3. Beim Stehenlassen am Licht verschwand die Fluoreszenz.

Diese Eigenschaften machen es einigermaßen wahrscheinlich, daß es sich bei dem beschriebenen Stoff um Lactoflavin gehandelt hat.

Nicht nur in Mikroorganismen, sondern auch in höheren Pflanzen ist Lactoflavin nachgewiesen worden. Von Euler und Dahl (1935) haben gezeigt, daß in den ersten Tagen der Keimung bei Hafer und Gerste Flavine entstehen. Bonner (1942) stellte fest, daß Lactoflavin von isolierten Tomaten-, Alfalfa- und Daturawurzeln synthetisiert wird.

Lactoflavin ist allerdings für das Wurzelwachstum nicht erforderlich (J. Bonner und H. Bonner, 1948).

In Kombination mit Heteroauxin in geringer Konzentration soll Lactoflavin die Wurzelbildung bei *Phaseolus multiflorus* und *Helianthus annuus* fördern, sofern die Dauer der Vitamineinwirkung 16 bis 24 Stunden beträgt; bei längerer Einwirkungszeit hingegen zerstört Lactoflavin durch Oxydation die Wirksamkeit von Heteroauxin vollständig (Scheuermann, 1951/52).

Lactoflavin scheint bei höheren Pflanzen (wie auch bei anderen Organismen) vor allem in der besonderen Form der Flavinenzyme als katalytischer Wasserstoffüberträger im Rahmen der biologischen Oxydationsvorgänge zu wirken.

Die in der Literatur vorhandenen und oben erwähnten Angaben über das Vorkommen von Lactoflavin in Kulturlösungen verschiedener Mikroorganismen, besonders auch von *Aspergilli,* geben nur Auskunft

über die Lactoflavinbildung dieser oder jener Art; eine *vergleichende* Untersuchung des Bildungsvermögens für Lactoflavin innerhalb einer systematischen Gruppe unter gleichen Kulturbedingungen ist bis jetzt jedoch nicht durchgeführt worden. Dabei hat diese Aufgabe allgemein-physiologisches Interesse und ergibt zudem die Möglichkeit, das Vorhandensein einer definierten physiologischen Eigenschaft (Bildungsvermögen für Lactoflavin) mit jenem morphologischer Merkmale zu vergleichen, auf denen die systematische Gruppierung ja meistens beruht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, die Bedingungen der Lactoflavinbildung bei verschiedenen *Aspergillus*-Arten vergleichend zu studieren und festzustellen, ob zwischen einer Gruppierung nach systematisch-morphologischen Gesichtspunkten und einer solchen nach dem Bildungsvermögen dieses speziellen Stoffwechselproduktes (Lactoflavin) Parallelität besteht.

Methodisches

1. Wahl und Herkunft der Aspergilli

Es wurden aus den von Thom und Raper (1945) aufgestellten Gruppen verschiedene Arten ausgewählt und folgende *Aspergilli* auf das Bildungsvermögen für Lactoflavin untersucht:

1. *Asp. amstelodami* (Mangin) Thom und Church
2. *Asp. candidus* Link
3. *Asp. clavatus* Desmazieres
4. *Asp. flavipes* (Bain. und Sart.) Thom und Church
5. *Asp. flavus* Link
6. *Asp. fumigatus*$_1$ Fresenius
7. *Asp. fumigatus*$_2$ Fresenius[1]
8. *Asp. janus* Raper und Thom
9. *Asp. medius* Meissner
10. *Asp. niger* A_2 van Tieghem[2]
11. *Asp. niger* A_8 van Tieghem[2]
12. *Asp. nidulans* (Eidam) Wint.
13. *Asp. oryzae* (Ahlburg) Cohn
14. *Asp. restrictus* Smith
15. *Asp. ruber* (Bremer) Thom und Church
16. *Asp. terreus* Thom
17. *Asp. ustus* (Bain.) Thom und Church
18. *Asp. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi

---

[1] *Asp. fumigatus*$_2$ wurde hier durch mich aus Erbsenwurzeln isoliert und von C. B. S. Baarn bestimmt.

[2] Diese beiden Rassen waren schon lange im *Botanischen Institut Basel* in Kultur

Alle Stammkulturen stammten vom *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland* (auf Bierwürze), auch jene von *Asp. niger* A_2 und A_8, die ursprünglich durch Galli (1946) hier isoliert worden waren.

2. Kultivierung der Aspergilli

Die Standkulturen wurden in Fernbachkolben (500 cm³ Inhalt) angelegt, die ihrer Form wegen für diese Versuche besonders geeignet sind.

Um allfällige Schwermetallspuren herauszulösen (Lappalainen, 1919), die das Lactoflavin beeinflussen, wurden die Kulturgefäße vor und nach Benützung zirka 1/2 Stunde lang mit 3 % Salzsäure im Dampftopf gekocht.

Jeder Kolben enthielt 150 cm³ Nährlösung folgender Zusammensetzung: 0,2 % NH_4NO_3; 0,1 % KH_2PO_4; 0,025 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 4 % Rohrzucker des Handels. Die Nährlösung war also relativ arm an Nährsalzen; Spurenelemente wurden keine zugesetzt.

Zum Ansetzen der Nährlösung diente destilliertes Wasser, welches nach dem Ionenaustauschverfahren (Einbett-Entsalzung) entsalzt worden war (Leitfähigkeit zirka 1 Million Ω/cm).

Da die Lactoflavinbildung stark von der Anwesenheit von Magnesiumionen in der Nährlösung abhängig ist (Lavollay und Laborey, 1937, 1938, 1939, und Sarasin, 1953), wurden Nährlösungen ohne $MgSO_4$-Zusatz auf eventuelles Vorhandensein von Magnesium mit dem mikrochemischen Nachweis als Magnesiumammoniumphosphat geprüft. Es konnte gezeigt werden, daß Magnesiumionen dann höchstens in der Größenordnung von 0,01 mg pro 100 cm³ Lösung vorhanden waren.

In $MgSO_4$-freien Kulturen wurden die fehlenden SO_4-Ionen durch Zugabe von 0,025 % K_2SO_4 ersetzt.

Die Standkulturen wurden in Dunkelthermostaten gehalten, die keine größeren Temperaturschwankungen aufwiesen als maximal 1—2° C.

Die Sterilisation der Nährlösung geschah durch dreimaliges je halbstündiges Erhitzen im Abstand von zirka 24 Stunden in strömendem Dampf.

Nach der Sterilisation fanden sich weder Ausfällungen der zugesetzten Nährsalze, noch zeigte die Nährlösung Fluoreszenz.

Die Entnahme der Kulturflüssigkeit (je 1—1,5 cm³) zur Lactoflavin- und *p*H-Bestimmung (mit Glaselektrode, *Beckman-pH-Meter, Modell G)* wurde bei rotem Licht und unter aseptischen Bedingungen ausgeführt, und zwar durch ein jeweils abgeflammtes Pyrexrohr, das im Wattestopfen des Kolbenhalses eingebettet war. Diese Probeentnahme mußte unter äußerster Schonung der Pilzdecke erfolgen, denn wie Demeter und Löweneck (1938) festgestellt haben, kann durch Erschütterungen eine Verzögerung des Wachstums an Pilzkulturen stattfinden.

Da das Wachstum der Pilze in den verschiedenen Kulturkolben meistens ziemlich gleichmäßig war, genügten gewöhnlich Proben aus drei bis fünf parallel geführten Kulturen, um eine Mittelwertbildung zu erlauben; die mittlere Abweichung betrug dann etwa 10—15 %.

Die Stammkulturen der *Aspergilli* wuchsen auf verdünntem Bierwürzeagar (1,5 % Agar) im Dunkeln bei ungefähr 20° C; sie wurden alle vier Wochen auf frisches Substrat

---

gehalten und von Galli (1946) und Sarasin (1953) auf die Ascorbinsäurebildung bzw. Lactoflavinbildung untersucht worden.

Die hier für jede Species aufgeführte Ordnungsnummer bleibt während der ganzen Arbeit unverändert und dient auch zur Bezeichnung der betreffenden Species in den Figuren. Die Maximalwerte (sowohl für die Mycel- als auch für die Lactoflavinbildung) *sind in den Figuren jeweils für jeden Pilz = 100 % gesetzt.*

überimpft. Dabei bildeten sie reichlich Konidiosporen, was beim Impfen (2 cm³ Sporensuspension pro Kolben) sehr von Nutzen war, denn Demeter und Löweneck (1938) stellen fest, daß bei Impfung einer *großen* Zahl von Konidiosporen (und durch kräftiges Schütteln der Kulturgefäße nach der Impfung) Unregelmäßigkeiten in der Entwicklung der Mycelien vermieden werden können. Die Angaben von Sarasin (1953), wonach Änderung des Alters und der Suspensionsdichte der Sporen innerhalb weiter Grenzen keinen Einfluß auf die Lactoflavinbildung von *Asp. niger* hat, konnte auch für andere *Aspergilli* bestätigt werden.

Da Galli (1946) und Sarasin (1953) festgestellt hatten, daß mit zunehmenden Subkulturen bei *Asp. niger* eine Änderung des physiologischen Verhaltens eintrat, welche sich in einem Produktionsrückgang an Ascorbinsäure resp. Lactoflavin äußerte, untersuchte ich diese Frage an *Asp. terreus*. Es zeigte sich, daß durch Überimpfen auf Bierwürzeagar kein Nachlassen der Lactoflavinbildung erfolgt, nicht einmal nach der 13. Subkultur im Zeitraum von fünf Monaten. Durch gelegentliches Überimpfen auf Tomatenagar als Passage konnte bei Wiederholung des Versuches keine Steigerung der Lactoflavinbildung hervorgerufen werden. Im übrigen geht meine Erfahrung dahin, daß die Lactoflavinbildung eines bestimmten Pilzes unter gleichen Versuchsbedingungen nur relativ kleinen Schwankungen unterworfen ist.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes der Mycelien am Ende der Kultur wurden die Myceldecken auf vorher getrocknete und abgewogene Rundfilter abgenutscht, mit Wasser reichlich gespült und im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

3. Bestimmung von Lactoflavin

a) Fluorimetrisch

Die Eigenschaft von Lactoflavin, in saurer, unbelichteter Lösung gelblich-grün zu fluoreszieren, wird zur quantitativen Bestimmung verwendet (von Euler und Adler, 1934). Die fluorimetrische Bestimmung ist durch große Empfindlichkeit und rasche Durchführbarkeit ausgezeichnet (siehe zum Beispiel *Vitamin Assay,* 1947, Adamson, 1946). Ein «Lumetron» (Photovolt Corporation, New York, *Colorimeter Model 402 E*) diente zur Fluoreszenzmessung. Das Meßgerät ist so eingerichtet, daß alle Variablen, außer der Konzentration der fluoreszierenden Substanz, kontrolliert sind; das Fluoreszenzlicht wird photoelektrisch gemessen. Die Empfindlichkeit dieses Instrumentes war zirka 0,1 γ/cm³ Lactoflavin (siehe auch Sarasin, 1953).

Für die Bestimmung des Lactoflavingehaltes der Kulturlösung wurde eine Eichkurve mit bekannten Lactoflavinkonzentrationen hergestellt *(Lactoflavin-Roche);* diese zeigte im verwendeten Meßbereich von 0—16 γ/cm³ Linearität zwischen der Fluoreszenz und der Lactoflavinkonzentration.

Als Standard diente Natriumfluoreszeïn (0,7 γ/cm³). Die Fluoreszenzen von Natriumfluoreszeïn und Lactoflavin sind nach Weisberg und Levin (1937) innerhalb gewisser Grenzen linear.

Da die Fluoreszenzen von Lactoflavin im Bereich von *p*H 4—7 ungefähr 100 % betragen, konnte bei der Bestimmung von Lactoflavin von der Verwendung von Puffern abgesehen werden (Kuhn und

Moruzzi, 1934), denn zur fluorimetrischen Bestimmung der Kulturlösung wurde diese 1 : 20 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Es sei hier beigefügt, daß die Kulturlösungen sämtlicher verwendeter Pilze darauf geprüft wurden, ob die gebildeten gelben Pigmente die charakteristischen Reaktionen des Lactoflavins zeigten:

1. Reduktion der gelben Pigmente in der Kulturlösung zur Leukoform durch Zugabe von $Na_2S_2O_4$. Durch Schütteln an der Luft erscheint die ursprüngliche Farbe und Fluoreszenz wieder.
2. Überführung der fluoreszierenden Substanz in Lumiflavin durch Belichten in alkalischem Milieu. Extraktion mit Chloroform. Fluoreszenz des Chloroformextraktes: gelb-grün.
3. Überführung der fluoreszierenden Substanz in Lumichrom durch Belichten in saurem Milieu. Fluoreszenz des Chloroformextraktes: blau.

Diese Reaktionen waren stets positiv und sprachen für Vorhandensein von Lactoflavin, mit Ausnahme von *Asp. candidus,* der überhaupt keine gelben Pigmente bildete, und *Asp. ruber,* wo außer Lactoflavin noch andere, mehr grün fluoreszierende, nicht reduzierbare Pigmente auftraten (siehe Figur 1).

b) Mikrobiologisch

Zur weiteren Überprüfung, ob die in der Kulturlösung gebildeten fluoreszierenden Substanzen tatsächlich mit Lactoflavin identisch sind, wurden Kulturlösungen auch mit spezifisch lactoflavinempfindlichen Mikroorganismen getestet (siehe Tabelle 1) nach der Methode von Snell und Strong (1939), modifiziert nach Barton-Wright und Booth (1943); siehe auch Kocher (1945).

Wie man aus Tabelle 1 und 2 erkennen kann, stimmten die fluorimetrisch und mikrobiologisch erhaltenen Werte für Lactoflavin befriedigend bis gut überein. Eine Ausnahme bildet lediglich *Asp. ruber,* der zusätzliche grünlich fluoreszierende Substanzen erzeugt, die nicht Lactoflavin sind.

Des weiteren wurde versucht, wenigstens für einige interessante Kulturlösungen papierchromatische und mikrobiologische Methode zu kombinieren (siehe auch Cramer [1953] und Crammer [1948]). Zu diesem Zweck wurde synthetische Lactoflavinlösung und entsprechend verdünnte Kulturlösung nebeneinander im Abstand von 5 cm auf ein Filtrierpapier von Schleicher & Schüll Nr. 597 aufgetropft, getrocknet und dieses zur Entwicklung des Chromatogramms in das Lösungsmittelgemisch Butanol : Äthanol : Wasser (5 : 1 : 4) gestellt. Nach zirka acht Stunden wurde das Papierchromatogramm aus dem Lösungsmittelgemisch herausgenommen und getrocknet (siehe Figur 1).

Tabelle 1

Vergleich der mikrobiologisch und fluorimetrisch gefundenen Werte für Lactoflavin in *Aspergillus*-Kulturen

Versuch 10*a* bis *g*

	Fluorimetrisch	Mikrobiologisch mit *Lactobacillus casei ε*	Abweichung %	Rf-Wert Chromatographisch
Lactoflavin synth.	1,00 γ/cm³*	—	—	0,20–0,22
Asp. ruber	1,00 γ/cm³§	0,20 γ/cm³	— 80†	0,26
Asp. terreus	1,00 γ/cm³	1,04 γ/cm³	+ 4	0,24
Asp. niger A_2	1,00 γ/cm³	1,20 γ/cm³	+ 20	0,23
Asp. niger A_8	1,00 γ/cm³	1,04 γ/cm³	+ 4	0,26
Asp. versicolor	1,00 γ/cm³	1,20 γ/cm³	+ 20	0,24
Asp. restrictus	1,00 γ/cm³	1,32 γ/cm³	+ 32	
Asp. fumigatus$_1$	1,00 γ/cm³	1,08 γ/cm³	+ 8	0,26
Asp. flavus	1,00 γ/cm³	1,08 γ/cm³	+ 8	0,16
Asp. amstelodami	1,00 γ/cm³	1,24 γ/cm³	+ 24	
Asp. nidulans	1,00 γ/cm³	1,00 γ/cm³	± 0	
Asp. clavatus	1,00 γ/cm³	1,08 γ/cm³	+ 8	0,25
Asp. medius	1,00 γ/cm³	0,30 γ/cm³	— 70†	
Asp. fumigatus$_2$	1,00 γ/cm³	1,19 γ/cm³	+ 12	
Asp. janus	1,00 γ/cm³	1,09 γ/cm³	+ 9	
Asp. flavipes	1,00 γ/cm³	1,15 γ/cm³	+ 15	
Asp. ustus	1,00 γ/cm³	0,94 γ/cm³	— 6	
Asp. candidus	0	0	0	

* Einwaage: 1,00 γ/cm³ Lactoflavin-Roche.

§ Die Kulturlösungen wurden mit destilliertem Wasser verdünnt, bis die Fluoreszenz jeweils 1,00 γ/cm³ betrug.

† Die große Abweichung in der Bestimmung der fluoreszierenden Substanz mit den beiden Methoden lag darin, daß in der Kulturlösung nur ein kleiner Prozentsatz Lactoflavin vorhanden war; auf die übrigen fluoreszierenden Substanzen in der Nährlösung reagierten die Mikroorganismen nicht.

Tabelle 2

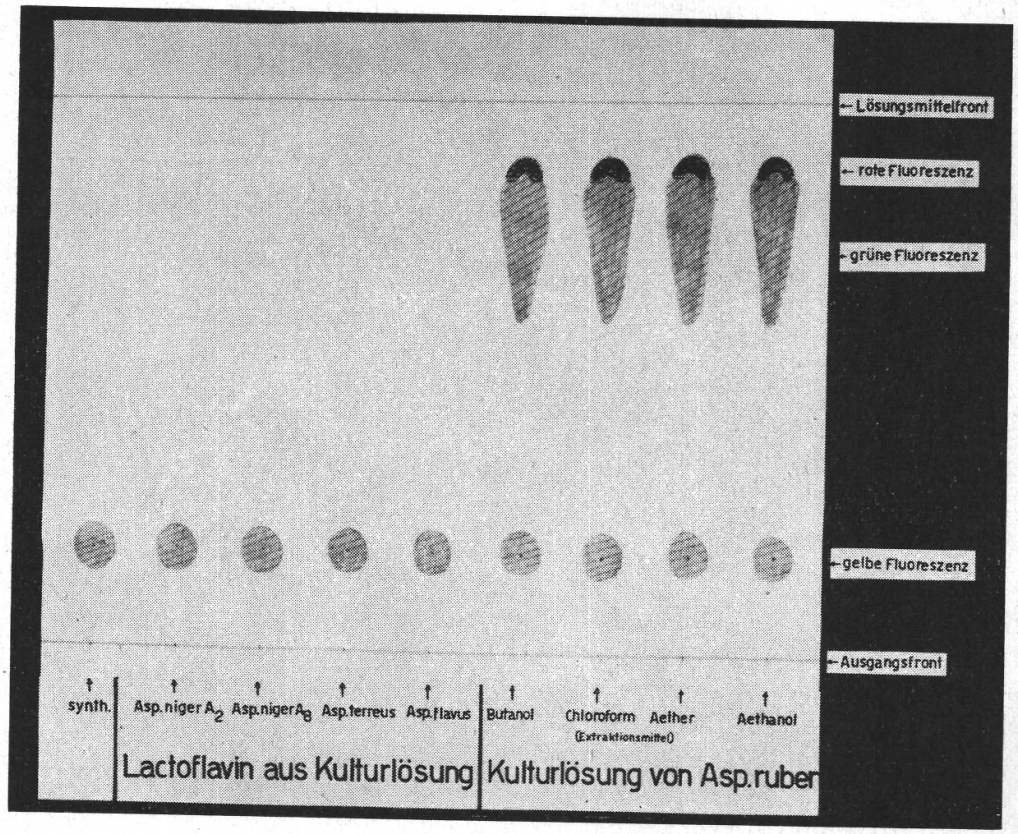
Vergleich der mikrobiologisch und fluorimetrisch gefundenen Werte für Lactoflavin in Kulturlösungen von *Asp. niger* A_8 und *Asp. ruber*

Versuch 10*a*

Test	Kulturlösung von *Asp. niger* A_8	Kulturlösung von *Asp. ruber*
*Streptococcus faecalis**	1,2 γ/cm³	0,04 γ/cm³
*Lactobacillus helveticus**	1,4 γ/cm³	0,05 γ/cm³
Lactobacillus casei ε 7469†	1,4 γ/cm³	0,05 γ/cm³
Kontrolle (fluorimetrisch)†	1,5 γ/cm³	0,15 γ/cm³

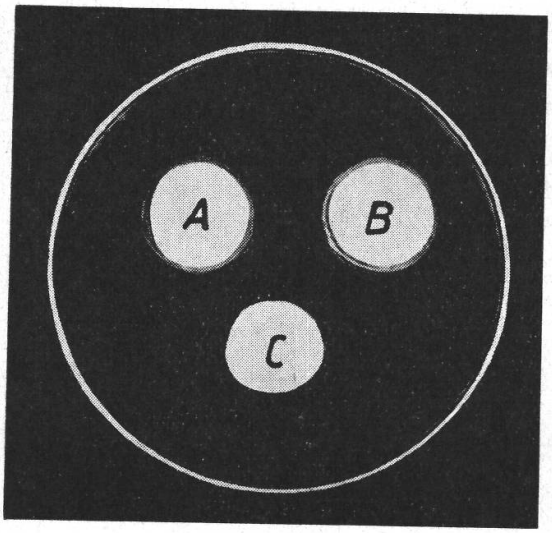
* Vitamin-B_2-Bestimmungen durchgeführt im ehemaligen *mikrobiologischen Laboratorium St. Jakob, Basel* (Dr. Kocher).

† Vitamin-B_2-Bestimmungen durchgeführt von mir im *Botanischen Institut, Basel.* Stamm bezogen vom *Eidgenössischen Vitamininstitut, Basel.* Verwendete Testsubstanz: Lactoflavin-Roche.



Figur 1
Aufsteigendes Papierchromatogramm zur Trennung und Reinigung der Kulturlösung von Lactoflavin
Verwendetes Lösungsmittelgemisch Butanol: Äthanol: Wasser (5 : 1 : 4)
Papier: Schleicher & Schüll Nr. 597

Unter der Quarzlampe betrachtet, hatte sich sowohl das synthetische Lactoflavin wie auch dasjenige der Kulturlösung in einer gewissen Entfernung von der Ausgangsfront lokalisiert. Die *R_f-Werte* der untersuchten Lösungen waren annähernd gleich groß (siehe Tabelle 1).



Figur 2
Nachweis von Lactoflavin mit *Lactobacillus casei ε* (Freudenreich) 7469 auf *Difco*-Nährboden (B_2-frei) nach papierchromatographischer Trennung
Wachstum von *Lactobacillus casei ε*-Kolonie am Rande der Filtrierpapierstückchen, die mit synthetischem Lactoflavin (A) oder chromatographischer Aufarbeitung einer Kulturlösung von *Asp. terreus* (B) versehen worden waren
Kontrolle (C): Kein Wachstum der *Lactobacillus casei ε*-Kolonie

Der R_f-Wert von synthetischem Lactoflavin war in einem Versuch zum Beispiel 0,22, derjenige der Kulturlösung von *Asp. terreus* war beim gleichen Lösungsmittelgemisch 0,24. Cramer (1953, S. 84) gibt den R_f-Wert für Lactoflavin bei Verwendung des Lösungsmittelgemisches Butanol : Essigsäure von 0,30 an. Nun wurde je ein zirka 3 cm^2 großes Stück der fluoreszierenden Flecken aus dem Papierchromatogramm herausgeschnitten, drei Stunden bei 60° C sterisiliert, unter aseptischen Bedingungen auf Vitamin-B_2-freien Nährboden *(Difco für B_2-Test)* in Petrischalen gelegt und die Papierstückchen mit einer *Lactobacillus casei* ε-Suspension beimpft. War Lactoflavin vorhanden, so bildete sich eine weiße Kolonie von *Lactobacillus* um das Papierstückchen herum (siehe Figur 2).

Diese Art der Trennung und des Nachweises kann auch quantitativ ausgeführt werden, da sich noch zirka 0,05 γ/cm^3 Lactoflavin nachweisen lassen (siehe Cramer [1953] und Crammer [1948]).

Bedingungen der Lactoflavinbildung

1. Einfluß der Temperatur auf die Mycel- und Lactoflavinbildung

Unter den Außenfaktoren, die das Wachstum und die Lactoflavinbildung der Pilze stark beeinflussen, spielt die Temperatur eine besonders wichtige Rolle.

Daher wurde zunächst der Einfluß der Temperatur auf das Myceltrockengewicht und den Lactoflavingehalt in Standkulturen bei folgenden Temperaturen untersucht: 20°, 25°, 30°, 35°, 40° C, und zwar nach zwanzig Tagen, bevor also noch wesentliche Autolyse eingetreten war (siehe auch Behr, 1930).

Bei der Feststellung dieses Temperaturoptimums berücksichtigte ich vorerst andere eventuelle Einflüsse, wie Konzentration an Zucker oder Magnesiumionen (Sarasin, 1953), nicht, was einmal methodisch begründet war, und zudem sind nach Janisch (1940) zur Festlegung eines artmäßigen Optimums eines Pilzes Zweit- und Drittfaktoren der Umwelt unwesentlich, da das Temperaturoptimum als art- bzw. rasseneigener, d. h. erbgebundener Wert anzusehen ist.

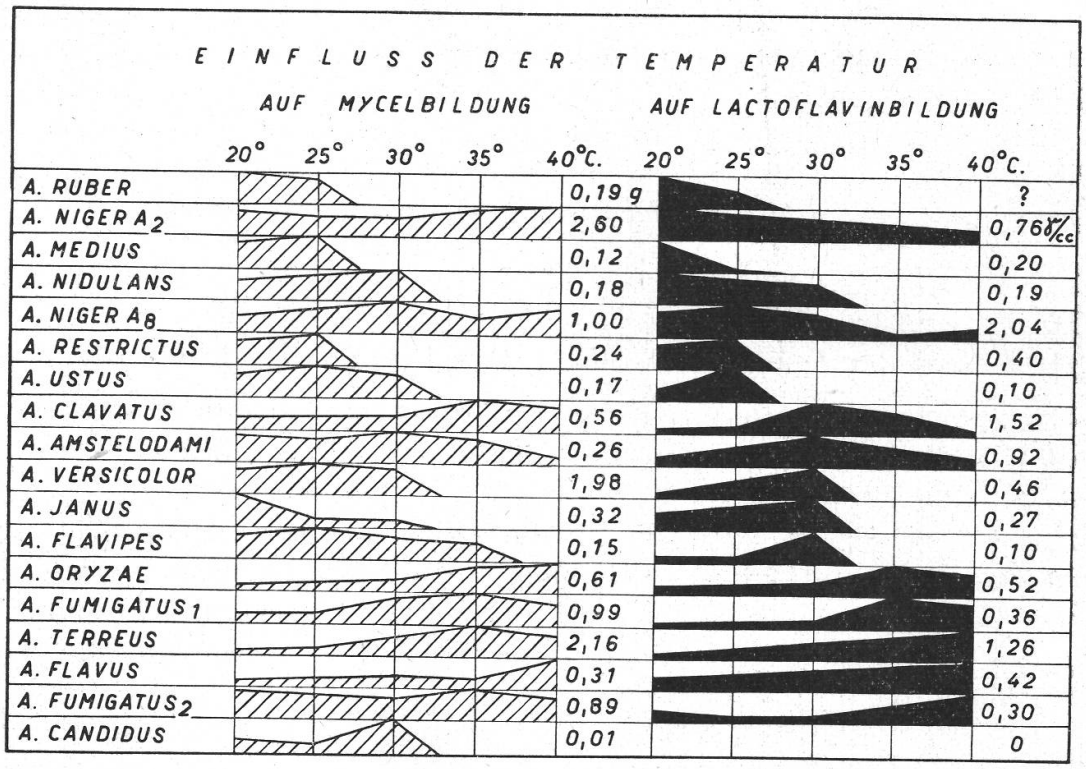
Die experimentell ermittelte Temperaturabhängigkeit für die Mycelbildung (siehe Figur 3) stimmte mit den Angaben von Blochwitz (1929 b) über die Kardinaltemperaturen gut überein, ebenso auch mit den Temperaturoptima für das Mycelwachstum nach Thom und Raper (1945).

Die Temperatur war für viele Species ein begrenzender Faktor sowohl für die Bildung des Mycels als auch des Lactoflavins.

Die Beträge des gebildeten Lactoflavins sind noch nicht maximal, da die Zusammensetzung der Kulturlösung nicht für alle Arten die optimalen Konzentrationen an Magnesiumionen, Zucker usw. enthielt.

Von den 18 untersuchten Arten bildeten 17 unter diesen Bedingungen Lactoflavin, nur *Asp. candidus* war zu dessen Synthese unfähig. Der untersuchte Temperaturbereich lag zwischen 20° C und 40° C (Figur 3); knapp die Hälfte der Arten zeigte das Temperaturoptimum der Lactoflavinbildung eher bei niedriger, die anderen eher bei mittlerer und höherer Temperatur.

Temperaturoptimum für Lactoflavinbildung und Wachstum entsprachen einander selten, dagegen ergaben sich öfters größere Unter-



Figur 3
Abhängigkeit der Mycel- und Lactoflavinbildung von der Temperatur
Versuch 1 *a* bis *s*

Myceltrockengewichte und Lactoflavinausbeute nach 20 Kulturtagen bei Temperaturen von 20, 25, 30, 35 und 40 ° C. Maximalwerte der Mycel- und Lactoflavinbildung für jeden Pilz = 100 % gesetzt. $4 \cdot 10^{-3}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 % Saccharose. Maximaltrockengewichte in g und maximale Lactoflavinerträge in γ/cm^3 in der Kolonne aufgeführt

schiede, wobei *Asp. niger* A_2 das extremste Beispiel war mit einer Optimaltemperatur für Mycelwachstum von zirka 40°, für Lactoflavinbildung von zirka 20° C; letzterer Wert war auch von Sarasin (1953) an der gleichen Pilzrasse bereits festgestellt worden. Die Lage dieser Optima wurde bei den späteren Versuchen berücksichtigt.

Außer *Asp. flavipes* und *Asp. ustus,* die in diesem Versuch submerses Mycelwachstum zeigten, bildeten alle anderen *Aspergilli* eine

homogene Oberflächendecke. Die verschiedene Temperatur hatte auf die Sporenbildung der untersuchten Arten keinen Einfluß; sie war überall gleich gut. Alle Kulturen zeigten auch mit zunehmendem Alter eine steigende Azidität der Kulturlösung.

In den Kulturlösungen trat schon nach wenigen Tagen eine Gelbfärbung auf, unter der UV-Quarzlampe stark gelb-grüne Fluoreszenz; im weiteren Kulturverlauf verstärkte sich sowohl Farbe als auch Fluoreszenz.

Die Kulturlösungen von *Asp. ruber* und *Asp. flavipes* färbten sich schon in den ersten Tagen der Kultur rötlich, die Fluoreszenz war grünlich und anders als diejenige einer Lösung mit synthetischem Lactoflavin. Eine papierchromatische Reinigung der Kulturlösung trennte den grün fluoreszierenden Farbstoff scharf vom gelben Lactoflavin ab und erlaubte noch eine weitere Differenzierung in einen rötlich fluoreszierenden Stoff (siehe Figur 1).

2. Einfluß der Konzentration an Magnesiumionen auf die Mycel- und Lactoflavinbildung

Nach Lavollay und Laborey (1937, 1938, 1939) soll die Lactoflavinbildung von *Asp. niger* bei kleinen Mengen von Mg^{++} und Fe^{++}-Ionen in der Kulturlösung am stärksten sein; das Maximum der Pigmentation wurde bei einer Konzentration an Magnesiumionen von 0,42 mg/100 cm^3 Nährlösung festgestellt. Sarasin (1953) studierte die Abhängigkeit von Wachstum und Lactoflavinbildung bei *Asp. niger* A_2 und kam zu ähnlichen Resultaten.

Meine Untersuchungen erstreckten sich über 18 Arten von *Aspergillus* bei folgenden Magnesiumionen-Konzentrationen: 0; $4 \cdot 10^{-6}$; $4 \cdot 10^{-5}$; $4 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-3}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Nach 28 Tagen wurde sowohl das Myceltrockengewicht als auch die Lactoflavinmenge bestimmt. Steigende Zugabe an Magnesiumionen ergab durchwegs Trockengewichtszunahme (Tabelle 3). Auch Lilly und Barnett (1951) machten die Beobachtung, daß innerhalb gewisser Grenzen die Wachtumssteigerung bei *Asp. niger* proportional ist der Konzentration an Magnesiumionen im Nährmedium.

Ebenfalls nahm in meinen Versuchen die Sporenbildung mit steigenden Dosen an Magnesium zu, was mit Ergebnissen von Lilly und Barnett (1951) übereinstimmt. Weiter beobachtete ich Änderung der Sporenfarbe bei den verschiedenen Magnesiumkonzentrationen (Tabelle 3).

Für die Lactoflavinbildung ergaben sich deutliche Optimalkonzentrationen an Magnesiumionen; diese wurden allerdings nicht in allen Fällen erreicht (Figur 4).

Tabelle 3

Wachstum einiger *Aspergillus*-Arten bei verschiedener Konzentration an Magnesiumionen

Versuch 5 *a* bis *s*

Myceltrockengewicht in g nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur für die Mycelbildung. 5% Saccharose. Sporenfarbe weiß (w), grau (g), grün (gr), schwarz (s)

Molaritäten $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	$4 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-3}$
Asp. candidus	0,150	**0,175**	0,132	0,086	0,055
Asp. amstelodami	0,042	0,161	**0,291**	0,255	0,229
Asp. flavus	0,332 g	0,665 g	**0,843** g	0,589 w	0,556 w
Asp. ustus	0,225	0,424	**0,525**	0,292	0,310
Asp. clavatus	0,138	0,097	0,369	**1,459**	0,894
Asp. terreus	0,095	0,105	0,467	**1,598**	1,357
Asp. restrictus	0,164 ggr	0,109 ggr	0,139 ggr	**0,419** w	0,415 w
Asp. fumigatus$_1$	0,202	0,170	0,552	**0,873**	0,815
Asp. nidulans	0,129	0,084	0,141	**0,229**	0,222
Asp. niger A_8	0,246	0,192	0,499	1,069	**1,182**
Asp. niger A_2	0,230 w	0,320 s	0,645 s	1,718 s	**2,170** s
Asp. oryzae	0,317	0,225	0,278	0,726	**0,742**
Asp. janus	0,139	0,071	0,112	0,189	**0,191**
Asp. medius	0,021	0,055	0,038	0,058	**0,113**
Asp. versicolor	0,330 w	0,197 w	0,412 gr	1,439 w	**1,635** w
Asp. ruber	0	0	0	0,562	**0,730**
Asp. flavipes	0,175	0,116	0,184	0,184	**0,320**
Asp. fumigatus$_2$	0,335 w	0,327 ggr	0,611 ggr	0,809 w	**0,842** w

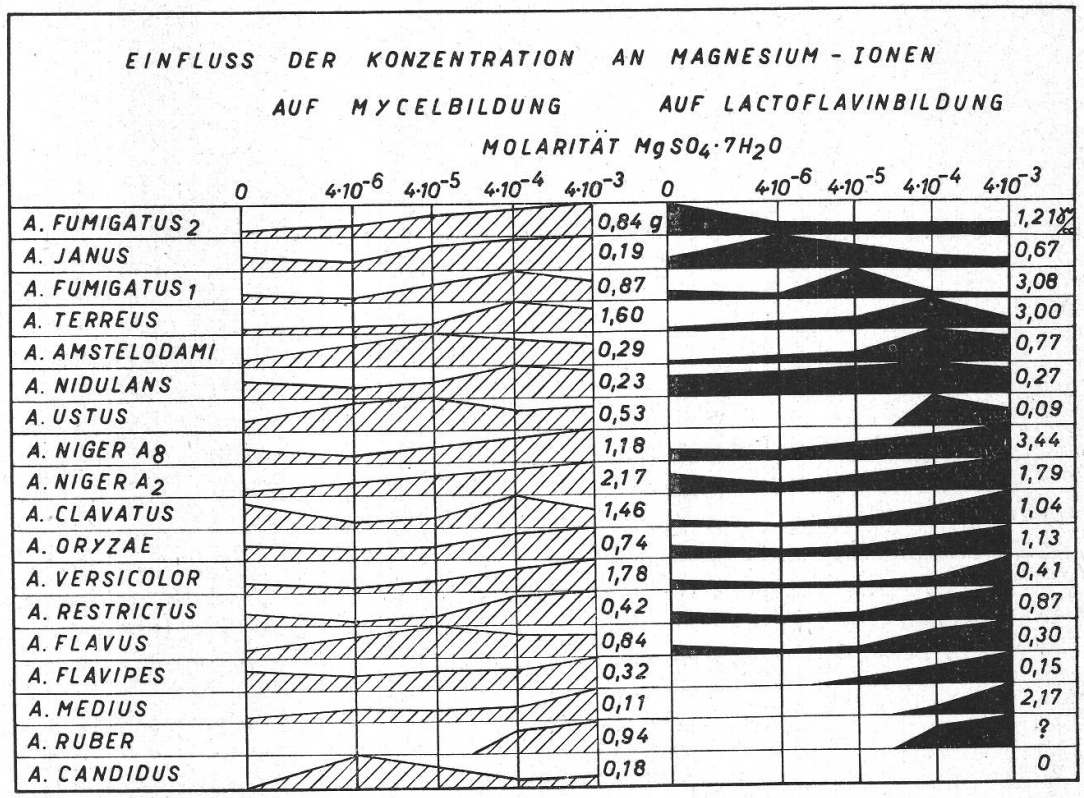
Eine Ausnahme stellte *Asp. fumigatus*$_2$ dar, der ohne Zusatz von Magnesium am meisten Lactoflavin bildete. Mit Ausnahme von *Asp. flavipes, Asp. medius* und *Asp. ruber* waren die untersuchten *Aspergilli* auch ohne Zusatz [1] von Magnesium fähig, geringe Mengen Lactoflavin zu synthetisieren. Die Lactoflavinbildung ist demnach nicht unbedingt an die Anwesenheit von Magnesiumionen gebunden, doch können sie die Lactoflavinbildung verstärken. Diese Feststellung findet gewisse Parallelen in den Versuchsergebnissen von Knobloch und Sellmann (1941), in denen gezeigt wurde, daß von 43 Stämmen von *Asp. niger* 22 zur Lactoflavinbildung befähigt waren; bei 20 davon konnte die Lactoflavinbildung durch Magnesium stimuliert werden, während 2 Stämme eher eine Hemmung durch höhere Magnesiumkonzentrationen erfuhren.

Die stimulierende Wirkung des Magnesiums auf die Lactoflavinbildung warf die Frage auf, ob auch andere Elemente der Erdalkaligruppe ähnliche Eigenschaften aufwiesen. Versuche an *Asp. niger* A_2

[1] Der Gehalt an Magnesiumionen blieb in solchen Fällen unter 0,1 mg/l (siehe Seite 456).

mit folgenden Zusätzen in der Nährlösung: je $4 \cdot 10^{-6}$ bis $4 \cdot 10^{-3}$ molar an Ca^{++} resp. Sr^{++} resp. Ba^{++} ergaben keine Förderung. *Demnach scheint die Wirkung des Magnesiums auf die Lactoflavinbildung spezifisch zu sein.*

Figur 5 gibt die absoluten Werte des Lactoflavingehaltes während des Wachstums an. Bis zum Alter von 28 Tagen nahm sowohl die



Figur 4

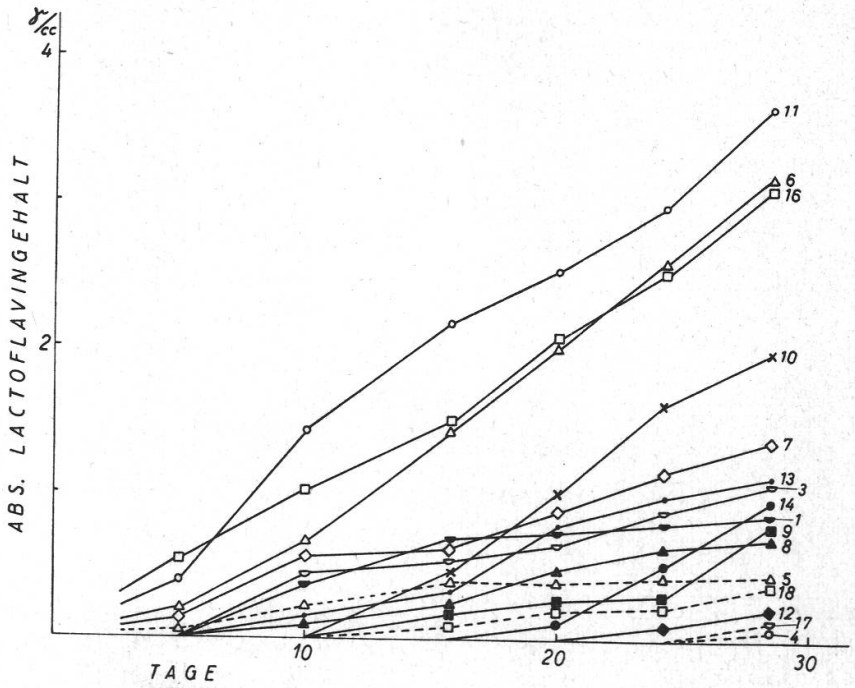
Abhängigkeit der Mycel- und Lactoflavinbildung von der Konzentration an Magnesiumionen

Versuch 5 *a* bis *s*

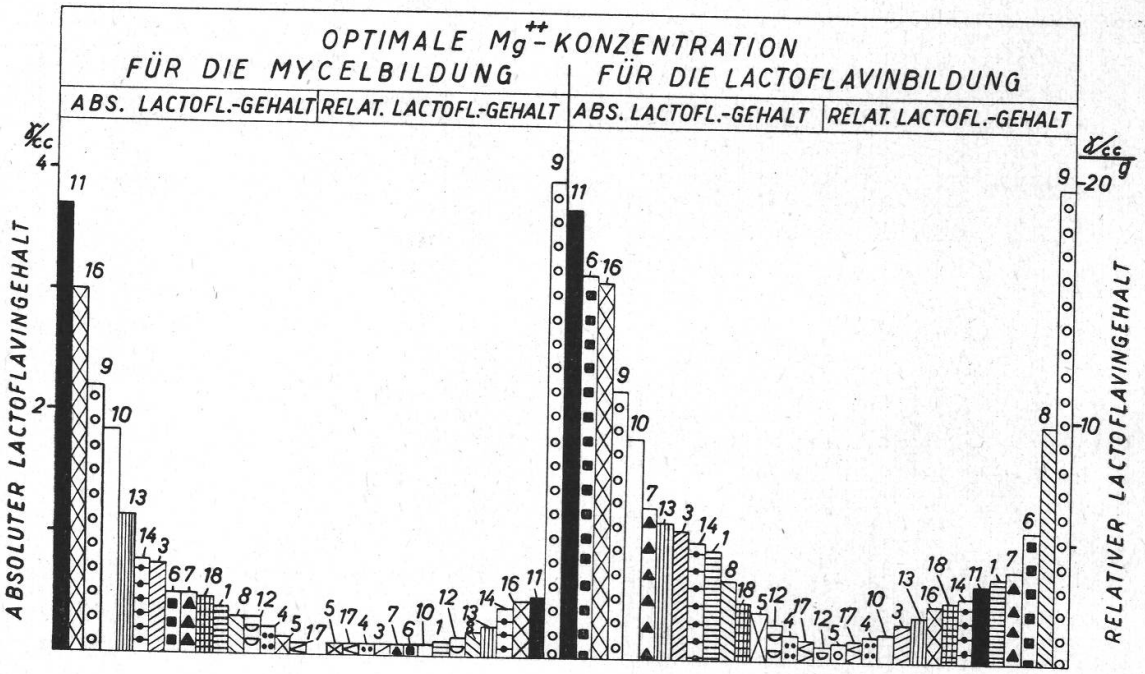
Myceltrockengewicht in g, Lactoflavingehalt der Kulturlösungen in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur für die Lactoflavinbildung. 5 % Saccharose

Mycelbildung als auch die Lactoflavinbildung zu; ältere Kulturen wiesen Anzeichen einer beginnenden Autolyse auf. Solange die Pilzkulturen im Wachstum begriffen waren, synthetisierten sie Lactoflavin, wie dies auch schon von Lavollay und Laborey (1938) und Sarasin (1953) beschrieben worden war und aus Figur 3 gut ersichtlich ist.

Figur 6 gibt die bei Versuchsabbruch am 28. Tag erhaltenen Werte des absoluten und relativen (auf Trockengewicht bezogen) Lactoflavingehaltes der Kulturlösungen wieder.



Figur 5
Zeitlicher Verlauf der Lactoflavinbildung
Versuch 5 *a* bis *s*
Lactoflavingehalt der Kulturlösungen in γ/cm^3 bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung
5 % Saccharose



Figur 6
Absoluter und relativer Lactoflavingehalt der Kulturlösung bei optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavin- resp. Mycelbildung
Versuch 5 *a* bis *p*
Lactoflavinausbeute nach 28 Kulturtagen bei optimalen Bedingungen für die Mycelbildung (links) und Lactoflavinbildung (rechts)

3. Einfluß von Kohlehydraten auf die Mycel- und Lactoflavinbildung

a) Saccharose

Die Saccharosekonzentration hat einen wesentlichen Einfluß sowohl auf das Mycelwachstum als auch auf die Lactoflavinbildung.

Es ergaben sich folgende Myceltrockengewichtsernten nach 28 Tagen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Versuch 15 *a* bis *q*

Mycelbildung in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration

Myceltrockengewicht in g nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Mycelbildung

Saccharosekonzentration	3%	8%	16%	20%	25%
Asp. terreus	0,840	**2,913**	1,916	1,630	1,766
Asp. janus	0,345	**0,417**	0,160	0,222	0,350
Asp. ruber	0,492	1,110	2,105	**2,280**	2,193
Asp. niger A_8	1,292	1,230	1,890	**2,190**	1,886
Asp. oryzae	0,593	0,651	0,755	**0,968**	0,730
Asp. versicolor	1,168	2,066	2,596	**3,345**	2,862
Asp. fumigatus$_1$	0,551	0,493	0,541	**0,560**	0,465
Asp. fumigatus$_2$	0,176	0,212	0,548	**0,762**	0,710
Asp. candidus	0,095	0,145	0,272	**0,303**	0,255
Asp. clavatus	1,005	2,285	2,420	2,715	**2,750**
Asp. amstelodami	0,227	0,347	0,296	0,319	**0,420**
Asp. niger A_2	1,780	3,330	3,700	3,710	**4,895**
Asp. restrictus	0,930	1,240	1,027	1,170	**1,832**
Asp. flavus	0,470	0,560	0,835	0,782	**1,253**
Asp. nidulans	0,237	0,315	0,390	0,405	**0,467**
Asp. medius	0,175	0,580	0,790	1,350	**1,370**
Asp. ustus	0,266	0,330	0,466	0,580	**0,585**
Asp. flavipes	0,245	0,419	0,678	0,750	**0,876**

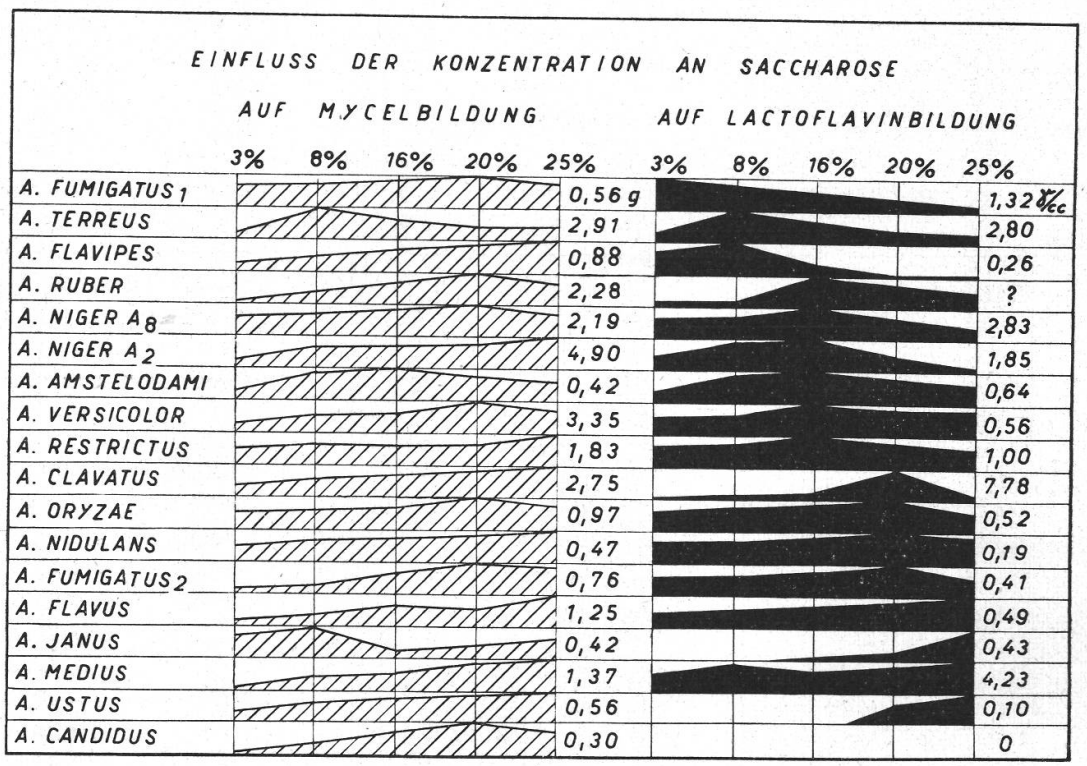
Mit steigendem Angebot an Saccharose erhöhte sich die Myceldausbeute. Sämtliche *Aspergillus*-Arten zeigten eine Erhöhung des Myceltrockengewichts mit zunehmender Konzentration an Saccharose, *Asp. terreus* und *Asp. janus* haben ihr Optimum der Mycelbildung allerdings schon bei 8 % Saccharose (siehe Tabelle 4).

Durch vermehrte Saccharosezugabe trat im allgemeinen auch eine intensivere Ausbildung der Sporen auf.

Eine Steigerung der Saccharosekonzentration von 3 bis 25 % ergab nicht bei allen *Aspergillus*-Arten eine intensivere Lactoflavinbildung. Die Optima für die Lactoflavinbildung der untersuchten Species sind aus Figur 7 ersichtlich.

Während also im allgemeinen zwischen 8 und 25 % Saccharose, je nach Species, eine Tendenz zur erhöhten Lactoflavinbildung auftrat, zeigte *Asp. fumigatus*$_1$ ein umgekehrtes Verhalten.

Die Lactoflavinbestimmungen nach 28 Kulturtagen ergaben unter dem Einfluß verschiedener Saccharosekonzentrationen folgende Lactoflavinmengen (siehe Tabelle 5). Die Stämme von *Asp. niger* A_2 und A_8 zeigten dieselben Optima der Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung, nämlich 16 %, wie Sarasin (1953) gefunden hatte.



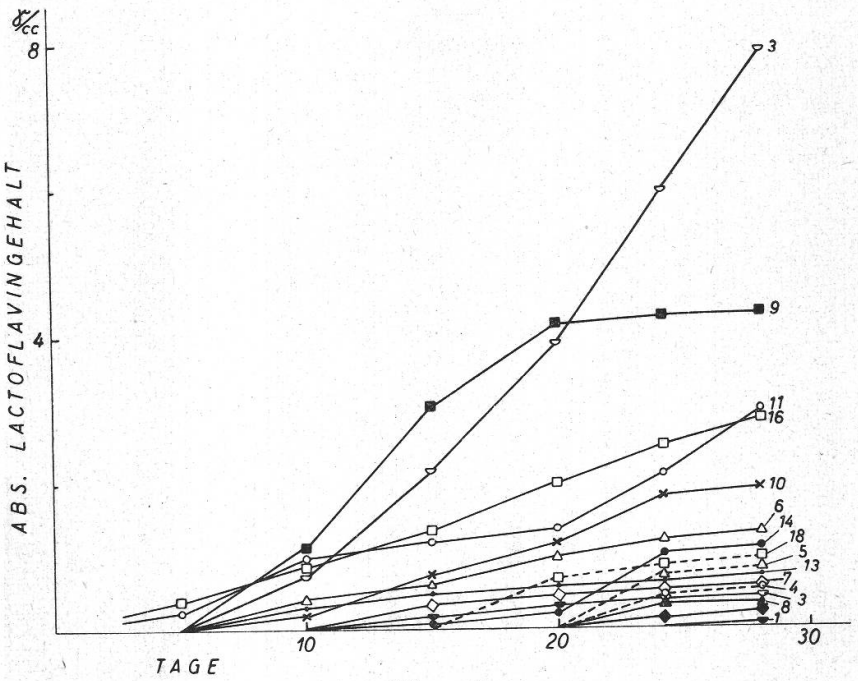
Figur 7

Einfluß von Saccharosekonzentration auf Mycel- und Lactoflavinbildung
Versuch 15 *a* bis *s*
Myceltrockengewicht in g und Lactoflavin in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration (3—25 %)

Die zeitliche Abhängigkeit der Mengen an gebildetem Lactoflavin bei der Berücksichtigung optimaler Verhältnisse an Temperatur, Magnesiumkonzentration und Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung der verschiedenen *Aspergilli* während der Kultur ergibt Figur 8.

Aus Figur 9 ist der absolute und relative Lactoflavingehalt bei Versuchsabbruch nach 28 Tagen ersichtlich. Die bedeutend kleineren *relativen* Werte des Lactoflavingehaltes in Abhängigkeit von Saccharose als unter dem Einfluß der Konzentration an Magnesiumionen (Figur 6) rühren daher, daß durch steigende Saccharosekonzentrationen viel höhere Trockengewichte resultierten, was die relativen Werte stark beeinflußte.

Die Zugabe einer optimalen Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung steigerte das Bildungsvermögen für Lactoflavin vor allem bei *Asp. clavatus* (siehe Figur 8).



Figur 8

Zeitlicher Verlauf der Lactoflavinbildung in Abhängigkeit von der optimalen Saccharosekonzentration

Versuch 15 *a* bis *s*

Lactoflavingehalt der Kulturlösung in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung (Temp., Mg^{++}, Sacch.)

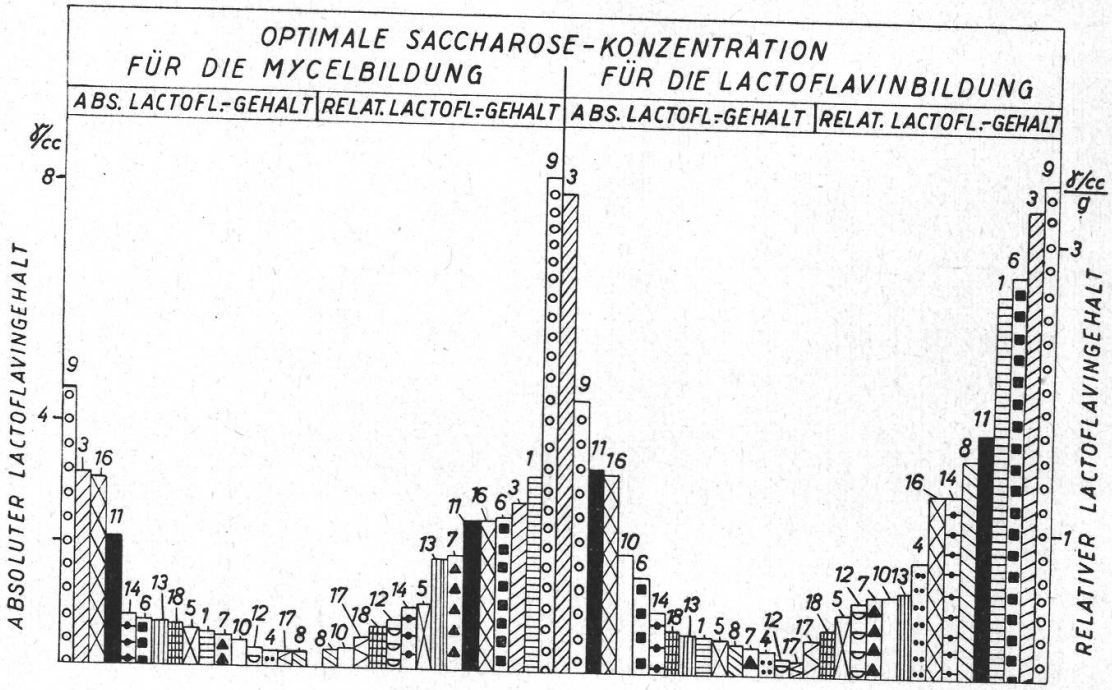
Tabelle 5

Lactoflavinausbeute in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration

Versuch 15 *a* bis *q*

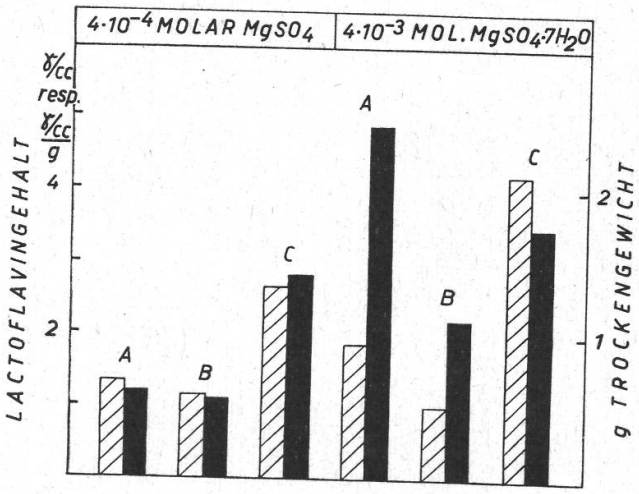
Lactoflavingehalt der Kulturlösung in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung

Saccharosekonzentration	3%	8%	16%	20%	25%
Asp. fumigatus$_1$	**1,32**	1,20	0,76	0,54	0,34
Asp. terreus	1,15	**2,80**	1,83	1,37	1,29
Asp. flavipes	0,19	**0,26**	0,12	0,07	0,07
Asp. niger A_8	2,07	2,67	**2,83**	2,06	1,33
Asp. niger A_2	0,92	1,75	**1,85**	0,95	0,30
Asp. amstelodami	0,28	0,60	**0,64**	0,56	0,47
Asp. versicolor	0,32	0,39	**0,56**	0,49	0,51
Asp. restrictus	0,71	0,77	**1,00**	0,92	0,62
Asp. clavatus	0,10	0,51	3,08	**7,78**	2,95
Asp. oryzae	0,34	0,34	0,43	**0,52**	0,30
Asp. nidulans	0,15	0,13	0,17	**0,19**	0,13
Asp. fumigatus$_2$	0,30	0,34	0,37	**0,41**	0,29
Asp. flavus	0,24	0,28	0,36	0,41	**0,49**
Asp. janus	0	0	0,07	0,12	**0,43**
Asp. medius	2,38	3,93	3,05	3,97	**4,23**
Asp. ustus	0	0	0	0	**0,10**



Figur 9
Absoluter und relativer Lactoflavingehalt der Kulturlösung bei optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung (rechts) und Mycelbildung (links)
Versuch 15 *a bis s*
Lactoflavinausbeute und Myceltrockengewichtsernte nach 28 Kulturtagen

Die Stämme von *Asp. niger* A_2 und A_8 bildeten unter den bisherigen Bedingungen keine größeren Lactoflavinmengen; hingegen konnte durch Verwendung von Kulturgefäßen mit einer großen Oberfläche und optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinsynthese bei *Asp. niger* A_2 eine Steigerung sowohl der absoluten als auch der relativen



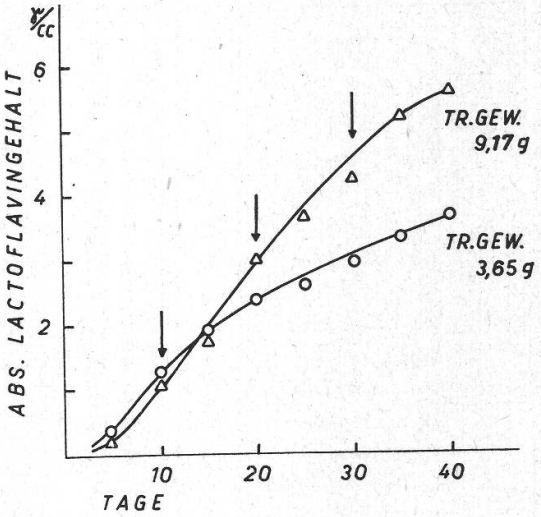
B = relat. Lactoflavingehalt in $\frac{\gamma/cm^3}{g}$

Figur 10
Einfluß der Vergrößerung der Kulturoberfläche auf die Lactoflavinbildung bei *Asp. niger* A_2
Versuch 5 *h*, 14
$4 \cdot 10^{-4}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ = unteroptimale Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung
$4 \cdot 10^{-3}$ molar $MgSO^4 \cdot 7H_2O$ = optimale Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung
T = 20 ° C; 16 % Saccharose
▨ Fernbachkolben von 500 cm³ Inhalt
■ Fernbachkolben von 1800 cm³ Inhalt
A = abs. Lactoflavingehalt in γ/cm^3
C = Trockengewicht in g

Lactoflavinmengen erzielt werden (siehe Figur 10). Als Kulturgefäße verwendete ich kleine Fernbachkolben von 500 cm³ Inhalt, einer Schichthöhe von 1,9 cm (bei 150 cm³ Nährlösung), einer Oberfläche von 95 cm² und große Fernbachkolben von 1800 cm³ Inhalt, einer Schichthöhe von 0,6 cm mit einer Oberfläche von 227 cm².

Vergrößerte Oberfläche und geringere Schichtdicke erlaubten offenbar eine bessere Ausnützung der gebotenen Nährstoffe, was sich in einer Verstärkung der Lactoflavinbildung äußerte (Lavollay und Laborey [1938], Levin [1951]).

Figur 11
Mehrmaliges Auswechseln der Kulturlösung durch neue bei *Asp. terreus*
Versuch 28 *b*
Mittelwerte aus 5 Kolben
$4 \cdot 10^{-4}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 8 % Saccharose
T = 40 ° C
△——△ Nährlösung ersetzt durch neue ↓
○——○ Kontrolle
Trockengewicht bei Versuchsabbruch am 40. Tag



Durch mehrmaligen und vorsichtigen Wechsel der Kulturlösung unter der Pilzdecke gegen frische Nährlösung während der Kultur konnte die Lactoflavinbildung etwas gefördert werden (siehe Figur 11), wobei allerdings darauf hingewiesen werden muß, daß auch das Trockengewicht des Mycels durch sekundäre Mycelbildungen stark zunahm. Die Ausbeute, d. h. die auf das Trockengewicht des Mycels bezogene Lactoflavinbildung, ergibt beim Wechsel der Kulturlösung geringere Werte.

b) Glucose

Zugabe von Glucose hatte bei den verschiedenen *Aspergilli* sowohl auf die Bildung des Mycels wie des Lactoflavins eine fördernde Wirkung. Bei Versuchsabbruch am 28. Tag ergaben sich bei den Myceltrockengewichtsbestimmungen folgende Werte (siehe Tabelle 6). Die Optima der Glucosekonzentration für die Mycelbildung der 18 *Aspergillus*-Arten lagen alle bedeutend höher als für die Saccharose, nämlich bei 0,9—1,4 molar, statt wie für Saccharose bei 0,6—0,8 molar.

Die Intensität der Sporenausbildung nahm im allgemeinen mit steigenden Glucosekonzentrationen zu, bei *Asp. oryzae* ab. Die Farbe der Sporen variierte bei einigen *Aspergillus*-Arten unter dem Einfluß steigender Glucosekonzentrationen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6

Mycelbildung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration

Versuch 16 *a* bis *s*

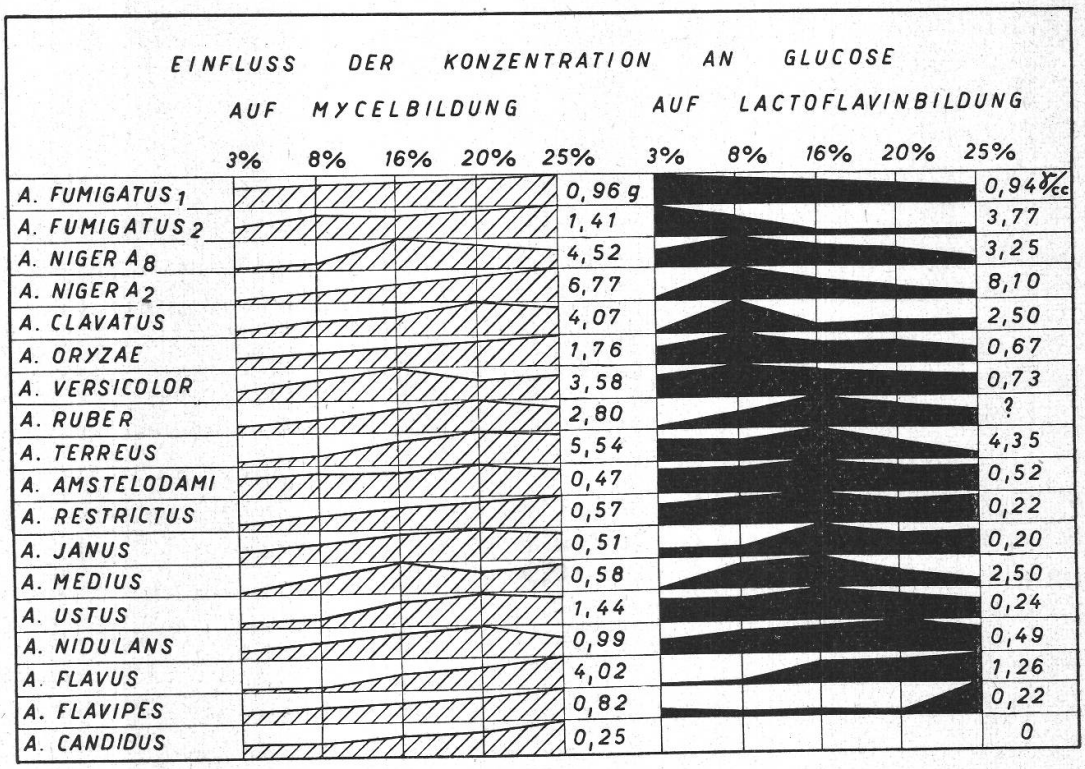
Myceltrockengewicht in g nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Mycelbildung. Sporenfarbe orange (o), rot (r), grau (g), grün (gr), weiß (w)

Glucosekonzentration	3%	8%	16%	20%	25%
Asp. niger A_8	0,770	1,810	**4,515**	4,030	3,550
Asp. versicolor	1,093	2,436	**3,583**	1,870	3,556
Asp. medius	0,060	0,340	**0,580**	0,490	0,560
Asp. ruber	0,802 **o**	1,200 **o**	2,448 **r**	**2,800 r**	2,705 **r**
Asp. clavatus	0,633	2,050	2,170	**4,068**	3,846
Asp. terreus	0,908	1,701	5,080	**5,543**	5,431
Asp. amstelodami	0,296	0,360	0,438	**0,470**	0,428
Asp. janus	0,203	0,303	0,510	**0,513**	0,486
Asp. nidulans	0,290	0,522	0,885	**0,992**	0,620
Asp. ustus	0,413	0,595	1,275	**1,440**	1,210
Asp. niger A_2	1,062	2,612	4,670	5,355	**6,770**
Asp. oryzae	0,580	0,975	1,475	1,630	**1,763**
Asp. restrictus	0,130 **ggr**	0,312 **w**	0,507 **w**	0,513 **w**	**0,573 w**
Asp. fumigatus$_1$	0,577	0,605	0,638	0,878	**0,960**
Asp. fumigatus$_2$	0,618	1,172	1,105	1,390	**1,408**
Asp. candidus	0,105	0,107	0,155	0,160	**0,250**
Asp. flavus	0,403	0,726	3,300	3,560	**4,020**
Asp. flavipes	0,368	0,425	0,495	0,620	**0,820**

Die Mycelbildung und Lactoflavinbildung der verschiedenen *Aspergillus*-Arten bei steigendem Glucoseangebot ist aus Figur 12 ersichtlich.

Für die Rassen von *Asp. niger* (A_2 und A_8) war 0,5 molare Saccharose oder Glucose für die maximale Lactoflavinbildung gleich wirksam, während für die maximale Mycelbildung verschiedene Konzentrationen an Zucker nötig waren.

Es ergaben sich folgende Lactoflavinmengen bei Versuchsabbruch nach 28 Tagen (siehe Tabelle 7). Während bisher *Asp. niger* A_8 bei allen untersuchten Bedingungen für die Lactoflavinbildung immer eine stärkere Lactoflavinsynthese zeigte, wurde nun bei Zugabe von Glucose durch *Asp. niger* A_2 bedeutend mehr Lactoflavin gebildet (siehe Tabelle 7 und Sarasin [1953]).



Figur 12
Einfluß der Glucosekonzentration auf Mycel- und Lactoflavinbildung
Versuch 16 *a* bis *s*
Myceltrockengewicht in g und Lactoflavingehalt in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration (3 bis 25 %)

Tabelle 7. Lactoflavinausbeute in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration
Versuch 16 *a* bis *s*
Lactoflavingehalt in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur und optimaler Magnesiumkonzentration für die Lactoflavinbildung

Glucosekonzentration	3%	8%	16%	20%	25%
Asp. fumigatus$_1$	**0,94**	0,84	0,64	0,60	0,45
Asp. fumigatus$_2$	**3,77**	2,14	0,62	0,62	0,69
Asp. niger A_8	2,77	**3,25**	2,49	2,05	1,20
Asp. niger A_2	1,44	**8,10**	5,78	3,47	2,17
Asp. clavatus	0,30	**2,50**	0,71	0,96	0,97
Asp. oryzae	0,39	**0,67**	0,43	0,47	0,30
Asp. versicolor	0,45	**0,73**	0,67	0,47	0,45
Asp. amstelodami	0,43	0,45	**0,52**	0,47	0,43
Asp. terreus	0,92	3,00	**4,35**	3,20	3,10
Asp. restrictus	0,15	0,21	**0,22**	0,19	0,20
Asp. janus	0,17	0,16	**0,20**	0,09	0,09
Asp. medius	0,13	2,12	**2,50**	1,44	0,88
Asp. ustus	0,13	0,19	**0,24**	0,22	0,15
Asp. nidulans	0,28	0,41	0,47	**0,49**	0,41
Asp. flavus	0,17	0,28	1,13	1,14	**1,26**
Asp. flavipes	0,11	0,08	0,08	0,07	**0,15**

4. Einfluß von Stickstoffquellen auf die Mycel- und Lactoflavinbildung

Nitrate und Ammoniumsalze erweisen sich nach Steinberg (1939) als die besten anorganischen Stickstoffquellen für die *Aspergilli*. In meinen Versuchen wurde bis anhin Stickstoff in Form von NH_4NO_3 gegeben; da aber bekannt ist, daß einige Pilze bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitratstickstoff und Ammoniumstickstoff im Milieu letzteren vorziehen, wurde der Einfluß beider Ionen getrennt untersucht.

a) Ammoniumionen

Die Ammoniumionen wurden in Form von NH_4Cl zugesetzt. Über die Ergebnisse orientiert Tabelle 8. Bei allen untersuchten *Aspergilli* trat eine Ansäuerung der Kulturlösung auf, die durch die raschere Aufnahme der Ammoniumionen aus der Nährlösung bedingt ist. Die Ammoniumionen bewirkten, daß folgende *Aspergillus*-Arten ihr Deckenwachstum gegen ein submerses Mycel austauschten: *Asp. flavipes, Asp. restrictus, Asp. ustus, Asp. amstelodami, Asp. versicolor, Asp. oryzae,* was zu einem geringeren Myceltrockengewicht führte als bei Decken-

Tabelle 8

Lactoflavingehalt und Myceltrockengewichte bei verschiedenen *Aspergillus*-Arten unter dem Einfluß von NH_4^+- und NO_3^--Ionen

Versuch 27 *a* bis *s*

Maximalwerte nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur, optimaler Magnesiumkonzentration und optimaler Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung und optimaler NH_4^+- oder NO_3^--Konzentration für die Lactoflavin- bzw. Mycelbildung

	Absoluter Lactoflavingehalt in γ/cm^3		Relativer Lactoflavingehalt in $\frac{\gamma/cm^3}{g}$		Trockengewicht in g	
	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
Asp. ruber	0	0	0	0	0,300	**1,591**
Asp. niger A_8	**2,50**	2,13	**1,36**	1,25	1,837	**1,880**
Asp. niger A_2	1,76	**14,90**	0,54	**2,86**	3,098	**5,240**
Asp. clavatus	0,45	**0,69**	0,45	**0,87**	1,055	**2,056**
Asp. terreus	1,40	**4,65**	**1,98**	1,66	1,765	**4,610**
Asp. amstelodami	0,93	**0,99**	**1,60**	0,64	0,777	**2,220**
Asp. oryzae	0,37	**0,97**	**0,76**	0,58	0,808	**2,557**
Asp. versicolor	0	**0,25**	0	**0,31**	0,232	**0,810**
Asp. restrictus	0,16	**0,50**	**5,00**	1,76	0,076	**1,650**
Asp. fumigatus$_1$	0,50	**1,20**	1,32	**2,08**	0,423	**0,641**
Asp. flavus	0,92	**4,80**	0,79	**1,28**	1,167	**3,980**
Asp. janus	0,18	**1,70**	0,19	**0,60**	1,660	**3,630**
Asp. nidulans	1,38	**1,63**	**1,65**	0,81	**2,615**	2,373
Asp. candidus	0	0	0	0	**0,450**	0,300
Asp. medius	3,65	**23,50**	6,50	**8,67**	0,680	**4,131**
Asp. ustus	0,30	**0,39**	**0,49**	0,29	0,912	**3,590**
Asp. flavipes	0,10	**2,40**	0,36	**1,28**	0,332	**3,070**
Asp. fumigatus$_2$	**1,16**	0,96	1,19	**2,00**	**1,030**	0,577

kulturen dieser Pilze. Der Säuregrad des Milieus beeinflußt den Baustoffwechsel, den Betriebsstoffwechsel und im Zusammenhang damit die Bildung von Lactoflavin.

Bei Zugabe von NH_4Cl waren unter sonst gleichen optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung die gebildeten Lactoflavinmengen niedriger als bei Zugabe des Stickstoffs in Form von NH_4NO_3. Bei Versuchsabbruch am 28. Tag resultierten folgende Erträge an Lactoflavin (siehe Tabelle 8). Bei *Asp. versicolor* unterblieb bei Zugabe von NH_4Cl als Stickstoffquelle die Lactoflavinbildung vollkommen.

b) Nitrationen

Nach den Angaben von Foster (1949, S. 486) sollen *Aspergilli* vor allem Nitrate als Stickstoffquellen für ihr Wachstum benötigen. Als Nitratquelle verwendete ich $NaNO_3$. Mit steigenden Nitrationen wurde eine Förderung der Mycelbildung erzielt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9

Ertragssteigerung der Myceltrockengewichts-Ernte mit zunehmender Nitratkonzentration
Versuch 27 *a* bis *s*
Myceltrockengewichte in g nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur, optimaler Magnesiumkonzentration und optimaler Saccharosekonzentration für die Mycelbildung

Nitrat-Ionenkonzentration	0,02%	0,08%	0,25%	0,3%	0,6%	0,9%
Asp. terreus	0,453	1,715	2,830	**4,610**	3,740	3,510
Asp. janus	0,840	0,895	0,746	**3,630**	2,850	2,431
Asp. nidulans	0,858	1,645	1,325	**2,373**	2,188	1,862
Asp. candidus	0,250	0,275	0,280	**0,300**	0,290	0,285
Asp. fumigatus$_2$	0,566	0,562	0,480	**0,577**	0,387	0,470
Asp. oryzae	0,555	1,125	2,022	**2,557**	2,280	2,295
Asp. niger A_8	0,700	1,255	1,837	1,711	**1,880**	1,748
Asp. niger A_2	0,908	1,811	3,303	4,853	**5,240**	4,923
Asp. medius	0,430	0,955	1,410	2,540	**4,131**	3,620
Asp. fumigatus$_1$	0,374	0,379	0,380	0,640	**0,641**	0,610
Asp. amstelodami	0,785	1,038	1,973	2,050	**2,220**	2,150
Asp. versicolor	0,455	0,632	0,657	0,700	**0,810**	0,750
Asp. clavatus	0,546	1,010	1,820	1,861	1,910	**2,056**
Asp. ruber	0,596	0,715	0,933	1,468	1,465	**1,591**
Asp. ustus	1,240	2,556	2,120	3,210	2,920	**3,590**
Asp. flavipes	0,535	1,130	2,215	2,705	2,670	**3,070**
Asp. restrictus	0,076	0,091	0,151	1,550	1,570	**1,650**
Asp. flavus	0,752	1,688	2,540	3,134	3,758	**3,980**

Eine Zusammenstellung der gebildeten Myceltrockengewichte und Lactoflavinerträge der verschiedenen *Aspergilli* bei optimalen Stickstoffkonzentrationen für das Mycelwachstum bzw. die Lactoflavinbildung gibt Tabelle 8. Es ist ersichtlich, daß *Nitrationen sowohl die Mycel- als auch*

die Lactoflavinbildung stärker förderten als Ammoniumionen. Asp. terreus, Asp. medius, Asp. niger A_2, Asp. flavus, vor allem *Asp. flavipes* erfuhren unter dem Einfluß von Nitrationen ($NaNO_3$) eine Förderung des Lactoflavinbildungsvermögens, während bei den übrigen untersuchten *Aspergilli* die Lactoflavinbildung kleiner blieb als bei Verwendung von NH_4NO_3 in der Nährlösung (vgl. Tabellen 5 und 8). Steigerung des Wachstums und verstärkte Lactoflavinbildung durch zunehmende Gaben von Nitrat- oder Ammoniumionen innerhalb der Konzentration von 0,02—0,6 % resp. 0,02—0,25 % (NH_4Cl) Stickstoff gingen parallel. Die beiden Ionen wirkten nicht im entgegengesetzten Sinne, wie Sarasin (1953) bei *Asp. niger* festgestellt hatte.

Die Lactoflavinausbeute aller *Aspergillus*-Arten stieg bei größerem Angebot von Nitrationen an (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10

Steigerung der Lactoflavinausbeute durch vermehrte Zugabe von Nitrationen
Versuch 27 *a* bis *s*
Lactoflavingehalt der Kulturlösung in γ/cm^3 nach 28 Kulturtagen bei Optimaltemperatur, optimaler Magnesiumkonzentration und optimaler Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung

Nitrationenkonzentration	0,02%	0,08%	0,25%	0,3%	0,6%	0,9%
Asp. terreus	0,75	2,15	**4,65**	3,39	2,00	1,99
Asp. ustus	0,37	0,36	**0,39**	0,24	0,12	0
Asp. flavipes	0,33	1,45	**2,40**	1,27	1,75	1,85
Asp. fumigatus$_2$	0,60	0,84	**0,96**	0,62	0,52	0,41
Asp. niger A_8	0,50	0,67	1,25	**2,13**	1,57	1,54
Asp. clavatus	0,47	0,37	0,60	**0,69**	0,26	0,25
Asp. oryzae	0,32	0,60	0,90	**0,97**	0,88	0,86
Asp. janus	0	0	0,18	1,14	**1,70**	1,22
Asp. medius	2,26	4,07	4,75	22,00	**23,50**	21,80
Asp. niger A_2	0,32	0,32	1,94	12,50	**14,90**	13,20
Asp. flavus	0	0,11	1,15	3,54	**4,80**	4,57
Asp. amstelodami	0,50	0,50	0,54	0,94	**0,99**	0,89
Asp. nidulans	0,64	0,71	0,75	1,27	**1,63**	1,50
Asp. versicolor	0	0	0,11	0,20	**0,25**	0,21
Asp. restrictus	0,13	0,16	0,19	0,38	0,43	**0,50**
Asp. fumigatus$_1$	0,50	0,56	0,79	0,94	1,11	**1,20**

5. Lactoflavinbildung in Schüttelkultur

Knobloch und Sellmann (1941) haben festgestellt, daß verschiedene Stämme von *Asp. niger* in Schüttelkultur zur Lactoflavinsynthese befähigt sind.

Meine Versuche mit Schüttelkulturen wurden unter denselben Bedingungen (Temperatur, Magnesiumionenkonzentration, Saccharosekonzentration) durchgeführt, die in Standkulturen für die maximale

Lactoflavinbildung gefunden worden waren. Jeder Kolben wurde durch Umwickeln mit Stanniolfolien verdunkelt (Zerstörung von Lactoflavin durch Licht); die Schüttelfrequenz betrug 80 bis 100 Schwingungen pro Minute, bei einer Amplitude vom 5 cm (über Schüttelkulturen vgl. Kluyver und Perquin [1933]).

Die Myceltrockengewichte der *Aspergillus*-Arten nach 28 Tagen Kulturdauer waren in den Schüttelkulturen meist höher als in den Standkulturen (Tabelle 11), obwohl die Wasserstoffionenkonzentration beider Kulturarten sich gleichsinnig änderte.

Tabelle 11

Vergleich der Lactoflavinbildung von Stand- und Schüttelkultur

Versuche 18 *a* bis *s* und 15 *a* bis *s*

Bei Optimaltemperatur, optimaler Magnesiumkonzentration und optimaler Saccharosekonzentration für die Lactoflavinbildung der einzelnen *Aspergilli*

	Standkultur		Schüttelkultur	
	Trockengewicht in g	Lactoflavingehalt in γ/cm^3	Trockengewicht in g	Lactoflavingehalt in γ/cm^3
Asp. niger A_8	**1,890**	**2,83**	1,738	2,00
Asp. niger A_2	3,700	**1,85**	**4,002**	1,31
Asp. clavatus	**2,715**	**7,78**	1,707	0,36
Asp. fumigatus$_2$	**0,762**	0,41	0,483	**0,69**
Asp. fumigatus$_1$	0,551	1,32	**0,663**	**4,30**
Asp. terreus	2,913	**2,80**	**3,460**	2,15
Asp. amstelodami	0,296	**0,64**	**0,638**	0,50
Asp. oryzae	0,968	0,52	**1,277**	**0,99**
Asp. versicolor	**3,345**	**0,56**	1,285	0,26
Asp. restrictus	1,027	1,00	**1,676**	**1,78**
Asp. flavus	1,253	0,49	**2,882**	**0,73**
Asp. janus	0,350	**0,43**	**0,455**	0,28
Asp. nidulans	0,405	0,19	**1,235**	**0,45**
Asp. candidus	0,303	0	0	0
Asp. medius	1,370	**4,23**	**1,480**	2,50
Asp. flavipes	0,419	0,26	**0,446**	**0,28**
Asp. ustus	0,585	0,10	**7,538**	**0,23**

Asp. ustus zeigte ein bedeutend höheres Myceltrockengewicht in Schüttelkultur als in Standkultur, bei den gewählten Bedingungen 13mal größer. Unter dem Einfluß der Schüttelbewegung entstanden körnige, submerse Mycelien, die bei den einzelnen Arten in Größe, Form und Farbe stark variieren. Einzig *Asp. candidus* kam in Schüttelkultur nicht zur Entwicklung.

Sämtliche *Aspergillus*-Arten bildeten während der Schüttelkultur Lactoflavin, jedoch lagen die Werte oft unter denjenigen der Standkulturen; *Asp. fumigatus*$_1$ bildete als Ausnahme in Schüttelkultur bedeutend mehr Lactoflavin als in Standkultur.

6. Über die Ausscheidung des Lactoflavins aus dem Mycel

Galli (1946) stellte bei der Untersuchung der Ascorbinsäurebildung durch Rassen von *Asp. niger* fest, daß sich die Ascorbinsäure zu Beginn der Kultur vor allem im Mycel lokalisierte, dann langsam in die Außenlösung gelangte, und schließlich war die Konzentration in der Außenlösung viel größer als diejenige im Pilzmycel.

Bei der Bildung von Lactoflavin in *Aspergillus*-Kulturen liegt eine ähnliche Situation vor: Lactoflavin entsteht intrazellulär im Mycel (siehe Levin [1951]).

Ich studierte die Änderung des Lactoflavingehaltes im Mycel bei *Asp. terreus* unter optimalen Bedingungen für die Lactoflavinbildung. In bestimmten Zeitintervallen wurden fünf Kolben aus dem Versuch genommen zur Ermittlung des Lactoflavingehaltes in der Kulturlösung und im Mycel [1]. In den ersten Tagen der Kultur ergab sich der höchste Lactoflavingehalt im Mycel, und der Lactoflavingehalt der Kulturlösung nahm im Verlaufe der Kultur zu. Die Außenlösung zeigte schließlich einen höheren Lactoflavingehalt als das Mycel (siehe Tabelle 12). Es mußte demnach eine Ausscheidung von Lactoflavin aus dem Mycel in die Kulturlösung erfolgt sein.

Tabelle 12

Abnahme des Lactoflavingehaltes im Mycel bzw. Zunahme in der Kulturlösung während der Kultur von *Asp. terreus*

Versuch 21 Mittelwerte aus 5 Kolben

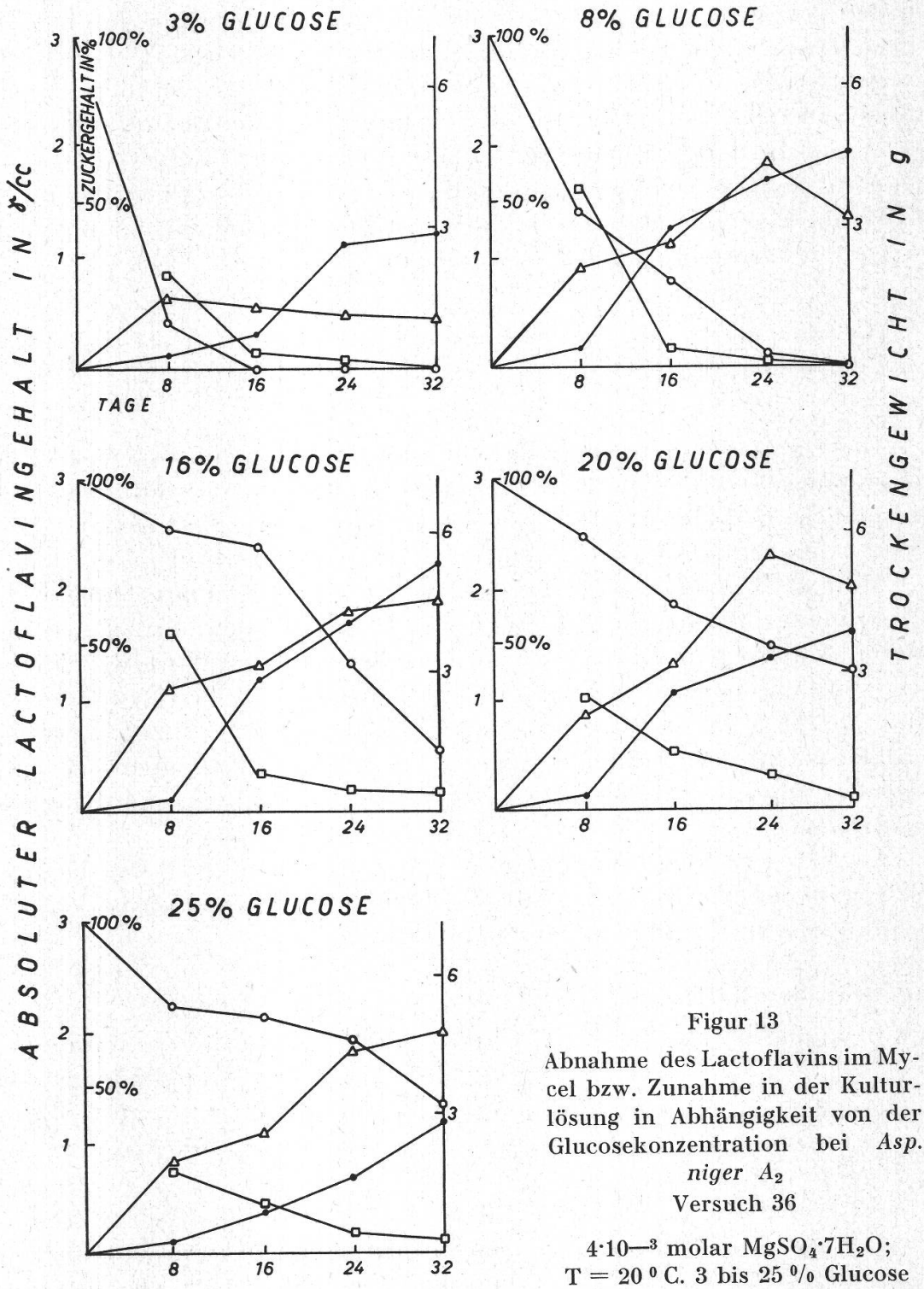
$4 \cdot 10^{-4}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 16% Glucose; *p*H 4,5; T = 40° C

Zeit (Tage)	Mycelfrischgewicht in g	Myceltrockengewicht in g	Wassergehalt des Mycels in g	Zuckerverbrauch[1]		*p*H[2]	Abs. Lactoflavingehalt[3] in γ/cm^3	
				in %	in mg/cm^3		der Kulturlösung	des Mycels
4	8,60	1,42	7,2	41	56	3,6	0,52	6,8
8	8,90	2,59	6,3	55	12	3,0	0,75	4,0
12	13,25	3,69	9,6	80	36	3,6	0,86	2,2
16	13,66	4,42	9,3	91	12	3,0	2,15	2,8
22	13,23	4,63	8,6	91	12	2,9	2,35	2,2

[1] Zuckerbestimmung nach Bertrand.
[2] *p*H-Bestimmung mit *Beckmann-pH-Meter, Modell G.*
[3] Bezogen auf den Wassergehalt des Mycels (g = cm^3 gesetzt).

Weitere Versuche mit *Asp. niger* A_2 (siehe Figur 13) und *Asp. terreus,* bei denen der Glucosegehalt der Nährlösung variiert worden war, führten zu gleichen Resultaten. In Abständen von jeweils acht Tagen

[1] Zu diesem Zweck wurde das Mycel im Mörser zu einem feinen Brei zerrieben und das Lactoflavin mit Methanol extrahiert. Der Lactoflavinextrakt wurde wie üblich fluorimetrisch bestimmt.



Figur 13

Abnahme des Lactoflavins im Mycel bzw. Zunahme in der Kulturlösung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei *Asp. niger* A_2
Versuch 36

$4 \cdot 10^{-3}$ molar $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
T = 20 ° C. 3 bis 25 % Glucose

□——□ Lactoflavingehalt in Mycel (γ/cm^3) (auf Wassergehalt des Mycels bezogen)

●——● Lactoflavingehalt in der Kulturlösung (γ/cm^3)

○——○ Zuckergehalt der Kulturlösung in %

△——△ Myceltrockengewicht in g

wurden bestimmt: 1. das Myceltrockengewicht, 2. der Glucosegehalt der Kulturlösung, 3. der Lactoflavingehalt des Mycels und 4. der Lactoflavingehalt der Kulturlösung. Dabei zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Glucosegehalt [1] und der Lactoflavinbildung im Mycel und in der Kulturlösung. Solange die Kulturlösung Glucose enthielt, trat kein Gewichtsverlust des Mycels auf. Die Abnahme des Lactoflavins im Mycel erfolgte bei kleinerem Glucosegehalt viel schneller als bei größerem Glucoseangebot (siehe Figur 13).

7. Über einen Vergleich einer systematisch-morphologischen Gruppierung der Aspergilli mit einer solchen nach dem Bildungsvermögen für Lactoflavin

Die Unmöglichkeit, manche Schimmelpilzarten nur auf Grund der morphologischen Merkmale zu klassifizieren, hat es notwendig gemacht, physiologische Eigenschaften zur Einteilung heranzuziehen, zum Beispiel Farbstoffbildung, Verhalten gegen Salze, Temperaturoptimum usw.

Manche Forscher (Thom [1910], Weidemann [1907 a, b], Westling [1911] und Haenicke [1916]) versuchten bei der Einteilung der *Penicillium*-Arten physiologische Eigenschaften mitzuberücksichtigen. Weidemann (1907 a) schreibt: «... erst seitdem man immer mehr Wert darauf legt, diese morphologisch zum großen Teil so außerordentlich ähnlichen Pilze (gemeint sind die *Penicillien*) auch physiologisch zu charakterisieren, ist eine Besserung in der Diagnose eingetreten.»

Ähnlich wie die oben genannten Autoren unternahm Blochwitz (1929 a, b) den Versuch, die Gattung *Aspergillus* in zwei physiologisch-morphologische Hauptgruppen einzuteilen:

I. *Euglobose Arten:*

morphologische Eigenschaft	endständige Blase des Conidiophors kugelförmig, scharf vom Stiel abgesetzt
physiologische Eigenschaft	im allgemeinen acidiphil und *xerophob*

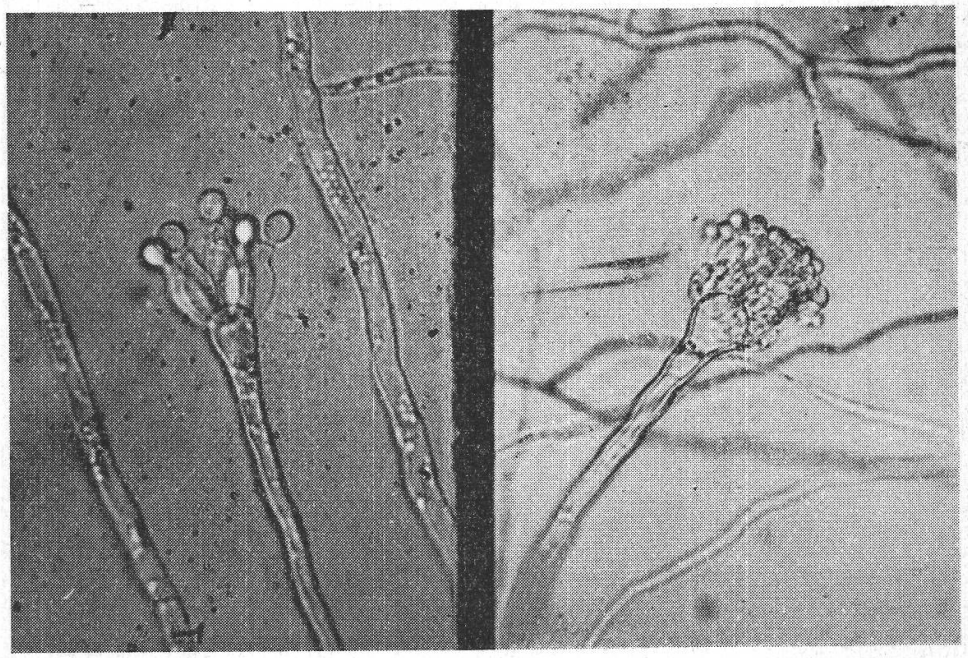
II. *Aglobose Arten:*

morphologische Eigenschaft	Blase des Conidiophors weicht von der Kugelform stark ab und geht nur allmählich in den Stiel über. Keulenförmig
physiologische Eigenschaft	neutrophil-basiphil, *xerophil*

Thom und Raper (1945, S. 188) zeigen aber, daß zum Beispiel *Asp. janus* Übergänge in der morphologischen Struktur des Conidio-

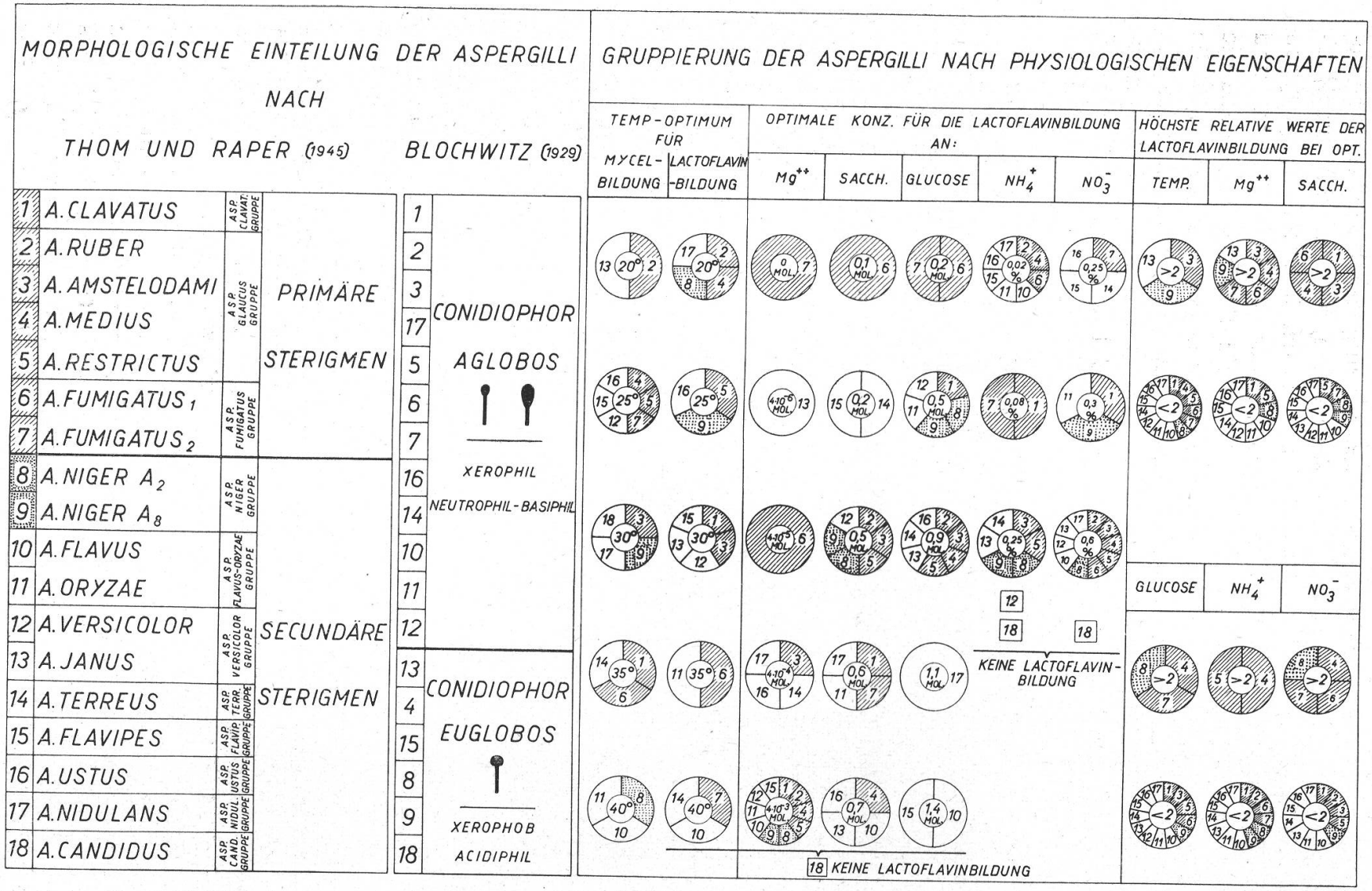
[1] *Glucosebestimmungen* nach Bertrand: Fehlingreaktion, Lösen des Kupferoxyduls in Ferrisulfatlösung, Titrieren der Ferroionen mit K-Permanganat.

phors aufweisen kann. Auch meine Beobachtungen anhand von Hängetropfenkulturen an 18 *Aspergillus*-Arten zeigten, daß einige Arten Übergänge aufwiesen, die eine Einteilung in eine der beiden Hauptgruppen nach Blochwitz als unsicher erscheinen ließen. Thom und Raper (1945) suchten mit Hilfe der morphologischen Merkmale die *Aspergilli* in verschiedene Gruppen einzureihen. Sie stützten sich auf die Ausbildung primärer oder sekundärer Sterigmen auf dem Bläschen des Conidiophors (siehe Figur 14). Figur 15 zeigt den Versuch, die untersuchten *Aspergillus*-Arten nach Thom und Raper (1945) resp.



Figur 14
Ausbildung primärer und sekundärer Sterigmen auf dem Conidiophor
Asp. fumigatus$_1$ (Fresen.) — Primäre Sterigmen
Asp. terreus (Thom) — Sekundäre Sterigmen

Blochwitz (1929) in Gruppen einzureihen und zugleich ihre Fähigkeit zur Lactoflavinsynthese damit in Vergleich zu setzen. Dabei zeigt sich deutlich: 1. daß das Synthesevermögen für Lactoflavin bei den untersuchten *Aspergilli* stark verschieden ist (wie auch bei den übrigen Organismen); 2. daß eine Gruppierung der untersuchten *Aspergilli* nach dem Synthesevermögen für Lactoflavin weder mit der morphologisch-systematischen Einteilung nach Blochwitz noch nach Thom und Raper parallel geht (gilt übrigens auch für den Vergleich des Mycelwachstums [siehe Figur 15]); und 3. daß infolgedessen die heute übliche systematische Einteilung der *Aspergilli* keine Voraussage über das Vermögen einzelner Species zur Bildung von Lactoflavin erlaubt.



Figur 15. Einteilung der *Aspergilli* nach morphologisch-systematischen und physiologischen Gesichtspunkten
Links: Einteilung nach Thom und Raper (1945) und Blochwitz (1929)
Rechts: Einteilung der *Aspergilli* nach ihrem Vermögen zur Mycel- und Lactoflavinbildung

Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse

1. Die Lactoflavinbildung von 18 Arten der Gattung *Aspergillus* wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Bestimmung des Lactoflavins erfolgte hauptsächlich fluorimetrisch; es konnte noch ein Lactoflavingehalt von 0,1 γ/cm^3 nachgewiesen werden.
2. Die fluorimetrisch ermittelten Werte des Lactoflavingehaltes der Kulturlösungen stimmten befriedigend mit den mikrobiologisch gefundenen überein.
3. Sporendichte des Impfgutes, Alter der Sporen und Qualität des Nährbodens für die Subkultur hatten auf die Lactoflavinbildung der verwendeten *Aspergilli* keinen wesentlichen Einfluß.
4. Die Lactoflavinbildung erfolgte vor allem während der Wachstumsperiode der Pilze; Wachstum und Lactoflavinbildung verliefen gleichsinnig.
5. Vergrößerte Pilzdeckenoberfläche und Verringerung der Schichtdicke der Kulturlösung förderten die Lactoflavinbildung.
6. Durch steigende Magnesiumgaben konnte im allgemeinen sowohl Mycelbildung als auch Lactoflavinbildung gefördert werden.
7. Die ermittelte Optimaltemperatur für Mycelbildung resp. für Lactoflavinbildung erwies sich im allgemeinen auch für dieselbe Species als verschieden.
8. Glucose wirkte sowohl auf die Bildung des Mycels wie auch auf diejenige des Lactoflavins stärker fördernd als Saccharose.
9. Optimale Saccharosekonzentration steigerte das Bildungsvermögen für Lactoflavin vor allem bei *Asp. clavatus* (7,8 γ/cm^3), optimale Glucosekonzentration jenes bei *Asp. niger* A_2 (8,1 γ/cm^3).
10. Zugabe von Ammoniumionen als Stickstoffquelle zur Nährlösung bewirkte bei einigen *Aspergilli,* daß sie ihr Deckenwachstum gegen ein submerses Wachstum austauschten.
11. Nitrationen wirkten gleichförmig auf Mycel- und Lactoflavinbildung und förderten sie stärker als Ammoniumionen.
12. Auch in Schüttelkulturen synthetisierten die untersuchten *Aspergilli* Lactoflavin; *Asp. fumigatus*$_1$ bildete als Ausnahme dabei mehr Lactoflavin als in Standkultur.
13. *Asp. candidus* war unter keinen Versuchsbedingungen zur Lactoflavinbildung zu bringen.
14. Das Lactoflavin fand sich in den ersten Tagen vor allem im Mycel, dessen Lactoflavingehalt dann größer war als derjenige der Kulturlösung; dieses Verhältnis kehrte sich im Verlaufe der Kultur um. Es muß demnach eine Ausscheidung von Lactoflavin aus dem Mycel in die Kulturlösung stattgefunden haben.

15. Die Ausscheidung des Lactoflavins aus dem Mycel erfolgte bei kleinerem Glucosegehalt der Kulturlösung schneller als bei größerem.
16. Die *einzelne Species* der untersuchten *Aspergillus*-Arten wies bei Wiederholung der Versuche stets gleiche Optima für die Lactoflavinbildung auf, dagegen zeigten sich hinsichtlich der Lage dieser Optima bei den *verschiedenen Species* größere Unterschiede.
17. Die Fähigkeit zur Synthese des Lactoflavins ist offenbar eine konstitutionelle Eigenschaft der betreffenden systematischen Einheit, da sich dessen Bildung durch keine experimentellen Einflüsse völlig unterdrücken noch bei den verschiedenen Species auf gleiche Höhe bringen ließ.
18. Es ließ sich aber keine eindeutige Parallelität zwischen dem untersuchten physiologischen Verhalten der *Aspergilli* und ihrer systematisch-morphologischen Gruppierung nach Blochwitz (1929) resp. Thom und Raper (1945) feststellen.
19. Aus der Stellung einer *Aspergillus*-Species in der heute üblichen systematischen Anordnung kann daher nichts über ihr Bildungsvermögen für Lactoflavin vorausgesagt werden.

Die vorliegende Arbeit entstand im *Botanischen Institut der Universität Basel* auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Max Geiger-Huber.

Als Vorsteher des Institutes stellte mir Herr Prof. Dr. Max Geiger-Huber Instrumente und Material in großzügiger Weise zur Verfügung, wofür ich ihm hier meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte. Für die wertvollen Anregungen während der Arbeit bin ich ihm ebenfalls zu großem Dank verpflichtet.

Herrn cand. phil. A. C. Schaefer, Assistent, danke ich für die photographischen Aufnahmen; ebenso der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, für ihr Interesse.

Literaturverzeichnis

Adamson, D. C. M., 1946. Physico-Chemical Methods in Vitamin Estimations. Emil Christoph Barell, Jubilee Volume, Basel, 179—198.

Annual Review of Biochemistry, bis Band 1952. Ann. Reviews, Inc. Stanford, California.

Barton-Wright, E. C., und Booth, R. G., 1943. The assay of riboflavin in cereals and other products. Bioch. J., **37,** 25—30.

Behr, G., 1930. Über Autolyse bei Aspergillus niger. Arch. f. Mikrobiol., **1,** 418—444.

Blochwitz, A., 1929 a. Die Aspergillaceen. Ann. Mycol., **27,** 185—204.

— 1929 b. Die Gattung Aspergillus. Ann. Uycol., **27,** 205—240.

Bonner, J., 1942. Riboflavin in isolated roots. Botan. Gaz., **103,** 581—585.

— und Bonner, H., 1948. The B-vitamins as plant hormones. Vitamins and Hormones, **VI,** 225—275.

Carpenter, C. C., und Friedländer, E. W., 1942. Occurrence of vitamins in fungi. Science, **95,** 625.

Cramer, F., 1953. Papierchromatographie, 2. Auflage. Verlag Chemie, Weinheim.

Crammer, J. L., 1948. Paper chromatography of flavine nucleotides. Nature, **161,** 349/350.

Delitsch, H., 1944. Über den Einfluß des Nährbodens auf das Wachstum und die Farbstoffbildung von Schimmelpilzen. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **106,** 357—367.

Demeter, K. J., und Löweneck, M., 1938. Über die Zuverlässigkeit der Erntegewichtsbestimmung von Schimmelpilzparallelkulturen. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **97,** 124—133.

Dikanskaja, E. M., 1950. Riboflavinsynthese (Vit. B_2) durch Mikroorganismen. Mikrobiologiya, **XIX 3,** 260—274.

v. Euler, H., und Adler, E., 1934. Über Vorkommen von Flavinen in tierischen Geweben. Hoppe Seylers Ztschr., **223,** 105—106.

— und Dahl, O., 1935. Zur Bildung von Flavinenzym-Systemen in keimenden Pflanzen. Bioch. Ztschr., **282,** 235—241.

— und Schlötzer, 1934. Verbreitung des gebundenen und des freien Flavins in Pflanzen. Hoppe Seylers Ztschr., **226,** 87—94.

Foster, J. W., 1949. Chemical activities of fungi. Academic Press, New York.

Galli, A., 1946. Über die Bildung der Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von Aspergillus niger. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **56,** 113—174 (Diss. Basel).

Haenicke, A., 1916. Vererbungsphysiologische Untersuchungen an Arten von Penicillium und Aspergillus. Ztschr. f. Botan., **8,** 225—343.

Hawker, L. E., 1950. Physiology of the fungi. University of London Press.

Janisch, E., 1940. Wo liegt das Temperaturoptimum bei Pilzen? (Asp. niger) Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **101,** 120—138.

Kitavin, G. S., 1940. Gewinnung von kristallinischem Riboflavin durch Einwirkung von Quecksilbersalzen auf Asp. niger. Compt. Rend. (Doklady), Acad. Sci. URSS, **28,** Nr. 6, 517.

— 1948. Dissertation Leningrad staatl. Universität (russ.), zit. in Mikrobiologiya, **20,** 406—414, 1951.

Klöcker, A., 1916. Über die Bildung eines fluoresceinähnlichen Stoffes in Kulturen von Aspergillus glaucus. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **46,** 225/226.

Kluyver, A. J., und Perquin, L. H. C., 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchungen. Bioch. Ztschr., **266,** 68—81.

Knobloch, H., und Sellmann, R., 1941. Notiz über die Bildung eines flavinartigen Farbstoffes in den Kulturflüssigkeiten von Asp. niger. Arch. f. Mikrobiol., **1,** II, 271—276.

Kocher, V., 1945. Streptococcus faecalis, ein neuer Testorganismus zur mikrobiologischen Bestimmung von Lactoflavin und Pantothensäure. Ztschr. f. Vitaminforschg., **16,** 113.

Kuhn, R., und Moruzzi, G., 1934. Über die Dissoziationskonstaten der Flavine. *p*H-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges., **67,** 888.

Lappalainen, H., 1919. Biochemische Studien an Aspergillus niger. Öfvers. af Finska Vet.-Soc. förh., Bd. **LXII,** Afd. A Nr. 1.

Lavollay, J., und Laborey, F., 1937. Action de l'acide ascorbique sur la pigmentation du mycélium d'Aspergillus niger hypomagnésié et sur le développement de ce champignon. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, **205,** 179/180.

— und Laborey, F., 1938. Sur les circonstances d'apparition de pigments jaunes dans le liquide de culture d'Aspergillus niger. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, **206,** 1055—1060.

— und Laborey, F., 1939. Caractérisation de la lactoflavine produite par Aspergillus niger v. Tiegh. Partiellement carencé en magnésium. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, **208,** 1056—1058.

Levin, G. G., 1951. Die Dynamik des Vitamins B_2 beim Pilz Aspergillus niger in Abhängigkeit von seinen Entwicklungsbedingungen. Mikrobiologiya, **20,** 406 bis 414 (russisch).

Lilly, V. G., und Barnett, H. L., 1951. Physiology of the fungi. McGraw-Hill Book Comp., New York, Toronto, London.

Meissner, R., 1897. Über eine neue Species von Eurotium Aspergillus. Bot. Zeitg., 2. Abt., **55,** 337—343.

Milburn, Th., 1904. Über Änderungen der Farben bei Pilzen und Bakterien. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **13,** 268—276.

Pontovich, V. E., 1943. Aspergillus flavus as a source of flavin. Biokhimiya, **8,** 297—301 (russ.). Ref. in Biol. Abstracts, **21,** 57, 1947.

Raffy, A., und Fontaine, M., 1937. Dosages de la flavine au cours du développement dans les cultures d'Eremothecium Ashbyii. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, **205,** II, 1005.

Sarasin, A., 1953. Untersuchungen über die Lactoflavinbildung durch Aspergillus niger v. Tiegh. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **63,** 287—317, 1953 (Diss. Basel).

Scheuermann, R., 1951/52. Der Einfluß wasserlöslicher Vitamine auf die Wirksamkeit von Heteroauxin im Wachstumsprozeß der höheren Pflanzen. Planta, **40,** 265—300.

Scheunert, A., und Schieblich, M., 1936. Über Vitaminbildung durch Aspergillus oryzae. Bioch. Z., **286,** 66—71.

Schopfer, W. H., 1943. Plants and Vitamins. Waltham, Mass., USA.

Snell, E. E., und Strong, F. M., 1939. A microbiological assay for riboflavin. Journ. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **11,** 346—350.

Steinberg, R. A., 1939. Effects of nitrogen compounds and trace elements on growth of Aspergillus niger. Journ. Agric. Res., **59,** 731—740.

Thom, Ch., 1910. Cultural studies of species of Penicillium. Bur. of Anim. Ind. US, Dep. of Agricult. Bull., **118,** 1910.

Tiukow, D., 1931. Beitrag zur Einteilung der Schimmelpilze aus der Gattung Penicillium nach physiologischen Eigenschaften. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **83,** 385—395.

Vitamin Assay, 1947. Interscience Publishers, Inc. New York.

Warburg, O., und Christian, W., 1932a. Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum. Naturwiss., **20,** 688.

— und Christian, W., 1932b. Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum. Bioch. Ztschr., **254,** 438—458.

— und Christian, W., 1933. Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. Bioch. Ztschr., **266,** 377—411.

Wehmer, C., 1901. Die Pilzgattung Aspergillus in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Mémoires de la Soc. de physique et d'histoire naturelle de Genève, T. **XXXIII.**

Weidemann, C., 1907a. Morphologische und physiologische Beschreibung einiger Penicillium-Arten. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **19,** 675—690.

— 1907b. Morphologische und physiologische Beschreibung einiger Penicilliumarten. Zentralbl. f. Bact., II. Abt., **19,** 755—770.

Weisberg, S. M., und Levin, J., 1937. Estimation of riboflavin. Journ. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **9,** 523.

Westling, R., 1911. Über die grünen Species der Gattung Penicillium. Ark. f. Botan., **11,** 1—156.