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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 68 (1958)

Artikel: Die Milchsäurebildung bei Rhizopus chinensis Saito

Autor: Schaub, Heinz

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-47912

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: 25.12.2025

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

Die Milchsäurebildung bei Rhizopus chinensis Saito

Von *Heinz Schaub*

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel)

Eingegangen am 22. Februar 1958

Inhalt

	Seite
Einleitung	64
Methodisches	66
Milchsäurebestimmung	66
Weitere Messungen	69
Kulturbedingungen	69
Schüttelbedingungen	71
Streuung	72
Physiologie der Milchsäurebildung	74
Einfluß der Impfstärke	74
Korrelation Trockengewicht – Milchsäure	75
Einfluß der Temperatur	81
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	85
Einfluß des Zinks	86
Wachstum, Glukoseabbau und Milchsäurebildung	88
Einfluß der Glukosekonzentration	89
Vergleich Schüttelkultur – Deckenkultur	93
Weitere Kohlenstoffquellen	95
Ausnützung der Glukose im Betriebsstoffwechsel	97
Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	99
Zitierte Literatur	101

Einleitung

Während die Bildung von Milchsäure bei Bakterien häufig beobachtet wird, ist sie bei den Pilzen auf wenige systematische Gruppen beschränkt. Man findet sie hier vor allem bei verschiedenen *Mucorineen*, besonders bei der Gattung *Rhizopus*.

Bei der Milchsäuregärung kann der Abbau der Hexosen auf zwei Arten erfolgen (Kluyver and Donker, 1925): Die *homofermentative* Gärung ist eine reine Spaltung nach dem Schema

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH \qquad (1)$$

wobei keine Nebenprodukte entstehen (Orla-Jensen, 1919). Sie tritt bei verschiedenen Bakterien auf (z. B. *Bact. Delbrücki*) und wird auch zur technischen Milchsäuregewinnung benützt (Haehn, 1952). Bei der *hetero-*

fermentativen Gärung, wie sie beispielsweise bei *Rhizopus* vorkommt, treten außer der Milchsäure verschiedene Nebenprodukte auf, wie Alkohol und Kohlendioxyd (Kluyver and Donker, 1925). Oft wird neben der Milchsäure auch Fumarsäure gebildet; unter den *Rhizopus*-Arten gibt es solche, die nur eine der Säuren, und andere, die beide nebeneinander bilden (Sakaguchi et al. 1941, 1942).

Zu den Milchsäurebildnern gehören u. a. *Rhizopus oryzae, nodosus* und *chinensis*. Foster (1949), der eine Übersicht über die Milchsäurebildung durch Pilze gegeben hat, stellt fest, daß gute aerobe Bedingungen die Milchsäurebildung fördern, während die Zugabe von Zink die Milchsäurebildung herabsetzt, dafür aber das Wachstum steigert (s. a. Lilly and Barnett, 1951). Die aerobe Milchsäuregärung stellt er folgendermaßen dar (gekürzt):

$$10\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 15\ C_3H_6O_3 + 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 1{,}5\ \begin{matrix} 9\ CO_2 + 9\ H_2O \\ \text{oder} \\ (CH_2O)_6 \\ \text{oder} \\ (CH_2O)_6 + 3\ CO_2 \end{matrix} \qquad (2)$$

Die ersten und auch einige neuere Arbeiten über die Milchsäurebildung durch *Rhizopus*-Arten stammen von Japanern (Takahashi and Sakaguchi, 1925; Sakaguchi et al., 1941, 1942, 1951; Kitahara and Fukui, 1951). Die meisten dieser Arbeiten sind japanisch geschrieben, und nur knappe Zusammenfassungen der Resultate sind zugänglich (Biological abstracts, 1942, 1952, 1953). Andere physiologische Arbeiten stammen von amerikanischen Autoren (Lockwood et al., 1936; Ward et al., 1936, 1938; Waksman and Hutchings, 1937; Waksman and Foster, 1938; Foster, 1949). Die zitierten Untersuchungen wurden vor allem an *Rhizopus oryzae, nodosus* und *arrhizus* ausgeführt. Oft handelt es sich dabei um Deckenkulturen oder submerse Kulturen der Pilze, die ab und zu von Hand geschüttelt wurden. Maschinell betriebene Schüttel- und Rührkulturen von *Rh. oryzae* wurden durch Bernhauer et al. (1950) angelegt. Amerikanische Autoren (Carson et al., 1951; Gibbs and Gastel, 1953) untersuchten neuerdings die chemischen Vorgänge bei der Milchsäuregärung, wofür sie Verbindungen mit verschiedenen markierten (isotopen) C-Atomen verwendeten.

Rhizopus chinensis wird jeweils bei der Aufzählung milchsäurebildender Pilze auch erwähnt, physiologische Studien mit dieser Art wurden jedoch bisher nicht ausgeführt. Dabei erweckt aber *Rh. chinensis* besonderes Interesse durch seine *hohen Kardinalpunkte der Temperatur*, die ihn von allen übrigen *Rhizopus*-Arten unterscheiden (Weimer and Harter, 1923). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der physiologischen Bedingungen der Milchsäurebildung und des Wachstums bei dieser thermophilsten *Rhizopus*-Art.

Methodisches

Milchsäurebestimmung

Es galt zunächst, unter den vielen in der Literatur angegebenen Methoden zur quantitativen Milchsäurebestimmung eine passende für Serienversuche an Kulturlösungen auszuwählen. Man muß von einer solchen Methode fordern, daß sie nur geringe Mengen Versuchsgut und zur Durchführung nur wenig Zeit benötigt; daß sie spezifisch, genügend genau und empfindlich ist.

In den Handbüchern von Klein (1932, 2, S. 435) und Bamann-Myrbäck (1941, 1, S. 292) wird die *kolorimetrische Methode* von Mendel-Goldscheider (1925) empfohlen. Bei dieser wird nach Entfernung von Eiweiß und Kohlehydraten die Milchsäure durch heiße konzentrierte Schwefelsäure in Acetaldehyd übergeführt; durch Zusatz von Veratrol entsteht eine rote Farbe, deren Intensität proportional der Milchsäurekonzentration sein soll. Entscheidend für das Gelingen ist die Schwefelsäure; die Literaturangaben darüber sind allerdings widersprechend (Mendel-Goldscheider, 1925; Fuchs, 1930). Für meine Versuche wurde «Schwefelsäure für Analyse» von Riedel-de Haën (mit maximal 0,0002% Ammonium und maximal 0,0002% Nitrat) benützt. Leider erwies sich auch diese Säure trotz besonderer Vorsichtsmaßnahmen gegen Wasserzutritt (Mendel, 1928) und trotz Variation der Methode als ungeeignet; es wurden nur schlecht reproduzierbare Werte mit außerordentlich starken Streuungen erzielt. Hansen und Riesser (1932) teilen denn auch mit, daß das Gelingen der Analysen von gewissen unkontrollierbaren Verunreinigungen der analysenreinen Schwefelsäure abhänge, und daß es «mehr oder weniger Glückssache ist, daß man die „richtige" Schwefelsäure in die Hand bekommt». Obwohl weitere Untersuchungen über geeignete Schwefelsäure vorliegen (Diemair et al., 1940; Mauer, 1948/49), habe ich auf die Anwendung dieser Methode verzichtet.

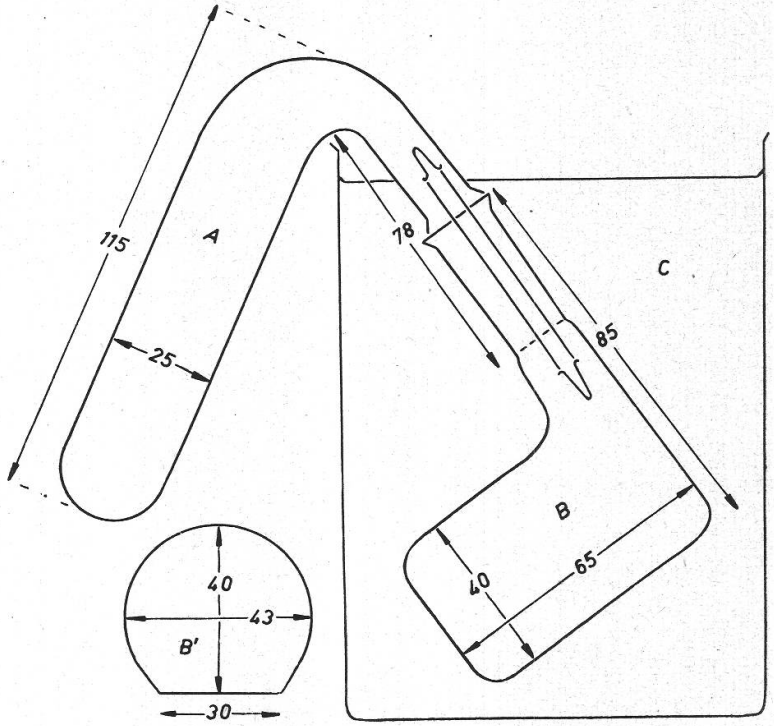
Bei den Stoffwechseluntersuchungen wurden die Milchsäurebestimmungen nur nach der *Methode* von Lang und Pfleger durchgeführt (Lang, 1939; Lang und Pfleger, 1951; Hinsberg und Lang, 1951).

Prinzip: Nach Entfernung störender Stoffe wird die Milchsäure der Kulturlösung zu Acetaldehyd oxydiert; dieser wird destilliert, in Bisulfit aufgefangen und titrimetrisch bestimmt.

Vorarbeiten: Als störende Substanz kommt in erster Linie die Glukose in Frage. Diese wurde nach Salkowski-Van Slyke entfernt (Oppenheimer und Pincussen, 1929). Die Reagenzien wurden aber in andern Mengen verwendet. Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß zur Entzuckerung von 1 cm³ Kulturlösung (mit maximal 5% Glukose) 4 cm³ 10prozentige $CuSO_4$-Lösung und 5 cm³ 10prozentige $Ca(OH)_2$-Suspension nötig sind. Nach Paech (1955) werden dabei die geringen Mengen Eiweiß, die vor-

handen sein könnten, mit entfernt. Eine weitere Vorbehandlung war nicht nötig.

An den *Analysenvorschriften* von Lang und Pfleger (1951) erwiesen sich einige Verbesserungen als zweckmäßig: Die auftretenden Temperaturdifferenzen beanspruchen die Analysengefäße stark, weshalb diese aus Pyrexglas hergestellt wurden, das eine lange Lebensdauer garantiert. Ihre Form wurde zweckmäßiger gestaltet. Es kann vorkommen, daß trotz Verwendung von Siedesteinen die Flüssigkeit im Reaktionsgefäß während des Erhitzens spritzt und dadurch in die Vorlage gelangt; dies sollte aber unbedingt vermieden werden. Die beste Abhilfe ist eine möglichst senk-



Figur 1
Mikrodestillationsapparat zur Bestimmung von Milchsäure
A: Reaktionsgefäß
B: Vorlagegefäß
(B': im Querschnitt)
A und B sind durch paraffinierten Normalschliff (11/10) verbunden.
C: Kühlgefäß mit Eis-Wasser-Gemisch. Maße in mm

rechte Lage des Reaktionsgefäßes; dies führt indessen beim Apparat von Lang (1939) dazu, daß Vorlage und Schliff nicht mehr genügend in das Kühlwasser eintaucht. Um beides zu erreichen, wurde der Schliffansatz abgewinkelt und verlängert. Der Winkel mißt nun statt 90° nur 55° (Figur 1). Das Vorlagegefäß und der paraffinierte Schliff wurden in Eiswasser gekühlt. Dadurch erübrigte sich die Kühlung durch auftropfendes Wasser. Die von Lang (1939) beschriebenen retortenförmigen Vorlagegefäße können nur in besonderen Haltern abgestellt werden und sind so klein, daß darin nicht titriert werden kann. Ich ließ deshalb größere mit ebener Unterseite anfertigen, die 90 cm^3 aufnehmen und leicht abgestellt werden können (Figur 1). Es ist zweckmäßig, das Reaktionsgefäß zum Schutz der Augen hinter einer Glasscheibe zu erhitzen. Es kann nämlich nach langem Gebrauch während des Erhitzens zerspringen.

Besondere Sorgfalt ist auf die Reinigung der Reaktionsgefäße zu verwenden; sie erfolgte mit heißer Salzsäure, Chrom-Schwefelsäure, Wasser mit Sand und zuletzt Aqua destillata.

Ins Reaktionsgefäß kamen nicht, wie vorgeschrieben, 5 cm³, sondern nur 1 cm³ der zu untersuchenden Flüssigkeit. Außerdem wurde so lange erhitzt, bis fast alle Flüssigkeit destilliert war und weiße Dämpfe auftraten. Bei der Titration achtete ich immer darauf, daß bis zum Schluß überschüssiges Natriumbicarbonat vorhanden war.

Bei Verwendung von Mikrobüretten wird eine befriedigende Genauigkeit erzielt. Zur Titration wurde 0,005*n* Jodlösung verwendet; 1 cm³ der-

Tabelle 1

Ergebnisse der Milchsäureanalysen

a) Versuche mit Laktatlösungen

Vorgelegt	0 mg	1,0 mg	5,0 mg	25,0 mg
Gefunden	0,0206 mg	0,965 mg	4,54 mg	22,8 mg
	0,0274	1,106	4,43	22,2
	0,0320	0,944	4,77	21,6
	0,0229	0,981	4,43	22,6
	0,0297	0,960	4,67	22,8
	0,0114	0,868	4,50	22,6
Mittelwert	0,024 mg	0,971 mg	4,56 mg	22,4 mg
Mittlerer Fehler		0,043 mg	0,059 mg	0,24 mg
		4,4 %	1,3 %	1,1 %
Manko		0,029 mg	0,44 mg	2,6 mg
		2,9 %	8,8 %	10,4 %
Korrektionsfaktor		1,030	1,096	1,115

Bei allen Werten (außer 0 mg) ist der Nullwert (0,024 mg) schon subtrahiert.

b) Kulturlösung allein und mit Laktatzusatz (entsprechend 5 mg Milchsäure)

Vorgelegt	Kulturlösung allein	Kulturlösung +Laktat
Erhalten	12,13 mg	16,80 mg
	12,20	16,61
	12,20	16,60
	12,11	16,74
	12,06	16,68
	12,10	16,60
Mittelwert	12,13 mg	16,67 mg
Differenz	4,54 mg	
Manko	0,46 mg	
	9,2 %	

selben entspricht 0,225 mg Milchsäure. Tabelle 1 zeigt, daß bei der Berechnung der Milchsäure ein Leerwert von 0,024 mg Milchsäure (d. h. 0,10 cm^3 Jodlösung) subtrahiert werden muß. Außerdem ist die berechnete Menge etwas kleiner als die vorgelegte. Dieses Manko steigt mit der vorgelegten Milchsäuremenge; es kann rechnerisch eliminiert werden, indem durch Vorversuche mit Laktatlösungen für verschiedene Milchsäuremengen entsprechende Korrekturfaktoren berechnet werden (Tabelle1). Im Teil *b)* der Tabelle 1 wird gezeigt, daß die Analysen in Kulturlösungen in der gleichen Weise verlaufen wie in reinen Laktatlösungen.

Weitere Messungen

Das *Trockengewicht* wurde als Maß für das Wachstum verwendet. Die Myzelien wurden auf gewogenen Filtern abgenutscht und bei 105° C mehrmals bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die *Glukose* wurde nach Bertrand bestimmt. Der Arbeitsgang verlief entsprechend den Angaben von Klein (1932). Blindversuche zeigten einen etwas schwankenden Wassergehalt der Glukose. Zur genauen Ermittlung des Glukoseverbrauchs wurde jeweils auch der Gehalt der unbeimpften Nährlösung bestimmt.

Da jeweils eine bestimmte Impfstärke gewünscht war, mußte vor der Impfung zuerst die *Sporendichte* der Suspension bestimmt werden. Dies geschah mit einem Blutkörperzählapparat (Carl Zeiß, Jena). Hier werden die Sporen in einem bestimmten Volumen gezählt; nachher kann berechnet werden, wie viele Tropfen geimpft werden müssen, damit sich die gewünschte Sporenzahl ergibt.

Die *pH-Messungen* wurden mit einem Beckmann-Gerät (Glaselektrode) elektrometrisch durchgeführt.

Kulturbedingungen

Für die Versuche wurde *Rhizopus chinensis* Saito vom C. B. S. Baarn (Niederlande) verwendet. Es handelt sich dabei um eine *Rhizopus*-Art, die Saito (1904 und 1911) in China entdeckt hat. Der Pilz wird dort bei der Herstellung eines alkoholischen Getränkes aus Reis und Weizen gebraucht. Das Myzel ist in Deckenkulturen zuerst weiß, später grau; auch in Schüttelkulturen ist es zuerst weiß, wird aber bald gelblich und zuletzt gelb-grau. Die jungen Sporangien sind weiß, die reifen schwarz.

Die *Stammkulturen* von *Rh. chinensis* wurden alle vier bis acht Wochen übergeimpft, um den Pilz in einem wachstumsfähigen Zustand zu erhalten. Zur Verhinderung von Degenerationserscheinungen wurden verschiedene natürliche Substrate benützt; abwechslungsweise fanden Malz- und Hefewasseragar (mit Glukose und Kreide) Verwendung.

Wie andere *Rhizopus*-Arten (Meder, 1952) neigt auch *Rh. chinensis* zu relativ schwacher *Sporenbildung*. Dies ist besonders für die Impfung

der vielen Kulturkolben für Serienversuche unangenehm. Bierwürze- und Hefewasseragar waren als Substrat für gute Sporenbildung ungeeignet, günstiger waren Traubensaft- und Tomatenagar, am meisten Sporen erzielte ich aber bei Verwendung von Mannit-Hefewasser-Agar (s. a. Meder, 1952). Dafür werden 20 g Bäckerhefe in 100 cm³ Leitungswasser eine halbe Stunde lang gekocht, dann zentrifugiert, 10 g Mannit zugesetzt und auf 100 cm³ aufgefüllt. Dazu kommen 4 g Agar (in 100 cm³ Wasser gelöst). Damit dem Pilz für die Sporenbildung eine große Oberfläche zur Verfügung steht, wird der Nährboden in Kolleschalen gebracht. Auf diese Weise erhielt ich immer genügend Sporen; bei schwacher Sporenbildung verwendete ich zwei Kulturen. Nach vier bis sieben Tagen waren die Sporen reif.

Die Voraussetzung für ein möglichst gleichmäßiges Wachstum der Kulturen ist eine gleich starke *Impfung* der Parallelkolben. Zu diesem Zweck wurden Sporensuspensionen hergestellt. Jeder Kolben erhielt 1 bis 5 Tropfen dieser Suspension, entsprechend der Sporendichte und der gewünschten Impfstärke. Die Suspension enthielt 0,1 % des Netzmittels Tween 80, um ein Zusammenballen der Sporen zu verhindern. Das Netzmittel war also in der Kulturlösung in einer Verdünnung von $1:2\cdot10^6$ vorhanden, so daß keine Beeinflussung der Versuche zu befürchten war. Eine Wirkung auf den Stoffwechsel zeigte sich nie.

Für die Herstellung der *Nährlösung* fand im Ionenaustauscher entsalztes Wasser (spez. Widerstand $> 4\cdot10^6\Omega$) Verwendung. Da *Rhizopus*-Arten den Stickstoff in Form von Nitrat nicht verwerten können, wurde Ammoniumchlorid benützt. Als Kohlenstoffquelle diente Glukose in verschiedenen Konzentrationen. Um das Wachstum nicht zu beeinträchtigen, muß die gebildete Milchsäure neutralisiert werden. Die Verwendung der Puffersubstanzen ist in einem späteren Abschnitt eingehend beschrieben. Wenn nichts anderes bemerkt ist, enthält die Nährlösung Natriumzitrat als Puffer. Um den Pilz auch mit allen eventuell nötigen Spurenelementen zu versorgen, erhielt jeder Liter 1 cm³ Hoaglandsche A-Z-Lösung. Bei den Versuchen zur Untersuchung des Zink-Einflußes unterblieb das natürlich. Wenn nicht anders bemerkt, enthielt 1 Liter Nährlösung jeweils 0,5 g $MgSO_4\cdot7\,H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 3 g NH_4Cl, 0,02 g $FeCl_3$, 30 oder 60 g Glukose, 21 g Zitronensäure, 8 g NaOH und 1 cm³ A-Z-Lösung.

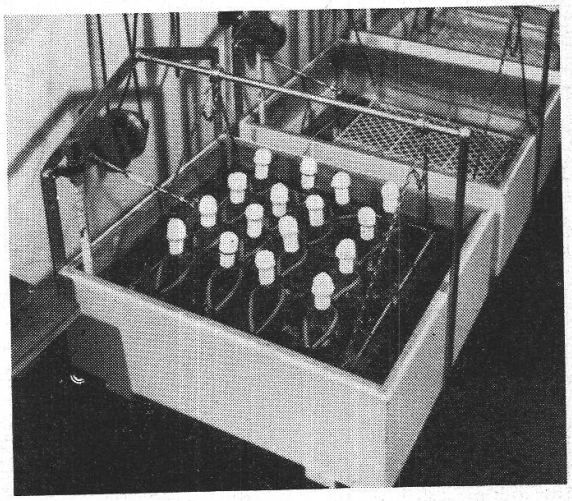
Vor jedem Versuch erfolgte eine sorgfältige Reinigung der *Kulturkolben:* Zuerst mit heißem Wasser und einem Reinigungsmittel, nachher mit Aqua destillata, außerdem wurden sie von Zeit zu Zeit mit verdünnter Salzsäure ausgekocht. Als Kulturgefäße dienten 500-cm³-Erlenmeyerkolben aus Pyrexglas. Jeder Kolben erhielt 200 cm³ Nährlösung. Sterilisiert wurde dreimal (im Abstand von je 24 Stunden) im strömenden Dampf. Die fertige Nährlösung war klar, nur bei hohen Glukosekonzentrationen zeigte sie eine leicht bräunliche Farbe. Die in den Kurven dar-

gestellten Punkte sind Mittelwerte aus 3 bis 4 Parallelkolben. Wo nichts anderes bemerkt ist, erfolgte das Wachstum der Kulturen bei 30° C.

Schüttelbedingungen

Drähte und Gummibänder halten die Kulturkolben in einem Metallkorb fest. Ein solcher nimmt (in 4 Reihen zu 4 Kolben) 16 Halbliterkolben auf. Er kann mit verschiedener Frequenz (38 bis 180 Schwingungen pro Minute) und mit verschiedener Amplitude (2,5 bis 5 cm) in einem temperaturregulierten Wasserbad hin- und herbewegt werden (Figur 2).

Die ersten 2 bis 3 Tage entscheiden über die Art des Wachstums, die hier begonnene Form ändert sich meist nicht mehr. Für die Stoffwechselversuche ist ein möglichst homogenes Myzel, bestehend aus kleinen Einzelstücken, erwünscht (Kluyver und Perquin, 1933). Als wichtiger



Figur 2
Schütteleinrichtung mit Kulturkolben in temperaturkonstantem Wasserbad

Faktor ist in diesem Zusammenhang die Nährlösung zu nennen, besonders die darin enthaltene Puffersubstanz. Wie Meder (1952) auch bei *Rh. japonicus* bemerkte, ist Marmor ungeeignet, wenn Korn- oder Kugelmyzel gewünscht wird, während Natriumzitratpuffer sich für diesen Zweck gut eignet (s. a. S. 85 ff.). Auch die Art des Schüttelns beeinflußt die Myzelform wesentlich. Eine sehr schwache Frequenz hat eine zu schwache Bewegung der Kulturflüssigkeit zur Folge, so daß eine Myzeldecke entsteht und man gar keine Schüttelkultur im üblichen Sinn erhält. Bei sehr starker Frequenz ist kein nennenswertes Wachstum mehr möglich, außerdem werden die Stopfen durch das starke Spritzen mit Nährlösung durchtränkt, so daß eine starke Infektionsgefahr besteht. Es sind also nur mittlere Frequenzen günstig. Man muß die Amplitude in Abhängigkeit von der Frequenz so bestimmen, daß die Nährlösung möglichst stark bewegt wird, aber doch nicht so stark, daß sie an die Stopfen spritzt. Als optimal in diesem Sinn erwiesen sich 60 Schwingungen pro Minute und mittlere

Amplitude. Diese muß auch nach dem vorhandenen Myzel gerichtet werden. Ist viel Myzel vorhanden, so ist eine größere Amplitude nötig, damit die Nährlösung gleich stark bewegt wird wie bei wenig Myzel durch die kleinere Amplitude. Unter diesen Bedingungen kultiviert, lieferte der Pilz homogenes Kugelmyzel mit ½ bis 2 cm (ausnahmsweise bis 3 cm) Kugeldurchmesser. Bei über zwei Wochen alten Myzelien gingen die großen Kugeln dann oft in rundliche Klumpen über. Die Versuche zeigten übrigens, daß der Pilz auf geringfügige Änderungen der Schüttelbedingungen nicht reagiert. Wie schon Meder (1952) bemerkte, müssen die Kolben in den ersten Tagen gelegentlich in kreisende Bewegung versetzt werden, damit allenfalls vorhandene Myzelspuren von den Wänden abgespült werden. Unterläßt man dies, so erhält man neben schönen Kugeln auch langgestreckte Gebilde.

Alle Versuche führte ich unter den genannten Bedingungen durch, sofern nichts anderes bemerkt ist. Dafür standen mir acht Wasserbäder mit Körben für maximal je 16 Kulturkolben zur Verfügung, so daß parallel 8 Kulturserien bei Temperaturen von 10° bis 45° C angelegt werden konnten.

Streuung

Will man den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Organismus untersuchen, so muß man über die natürliche Streuung gleich behandelter Kulturen Bescheid wissen und darauf achten, daß diese möglichst gering ist. Zu diesem Zweck ist auf gleich starke Impfung, Verhinderung des Myzelwachstums an der Kolbenwand und gleiche Schüttelbedingungen zu achten. Trotz diesen Maßnahmen treten Unterschiede im Wachstum auf, was auch nicht verwunderlich ist, da es sich um einen lebendigen Organismus handelt. Diese Differenzen können dadurch ausgeglichen werden, daß man den Mittelwert aus Messungen von mehreren Kulturen bildet. Dabei kommt es auch noch auf die Auswahl der Kolben an. Man könnte sie absolut willkürlich aussuchen. Dies scheint auf den ersten Blick am objektivsten. Dabei könnte es jedoch geschehen, daß man einmal zufällig das Mittel aus drei stark gewachsenen Kulturen, ein anderesmal aus drei schwach gewachsenen Kulturen bilden würde. Dadurch würden Unterschiede vorgetäuscht, die in Wirklichkeit gar nicht existieren. Um dies zu vermeiden, müßte man das Mittel aus einer größeren Zahl von Messungen bilden. Für die praktische Ausführung ist das hingegen nicht günstig, weil eine größere Zahl von Analysen mehr Zeit beanspruchen würde, als zwischen zwei Meßtagen zur Verfügung steht. Deshalb wurden zur Bildung des Mittelwertes jeweils drei Kolben verwendet, diese aber so ausgesucht, daß eine schwach, eine mittel und eine stark gewachsene Kultur darunter war.

Tabelle 2

Unterschiedliche Entwicklung in gleich behandelten Kulturen

	mg Trockengewicht	mg Milchsäure/cm³
Maximum	352	14,9
Mittelwert = M	267	12,1
Minimum	205	8,4
Standardabw. = σ	43,2 mg = 16,2 % v. M	1,64 mg/cm³ = 13,5 % v. M

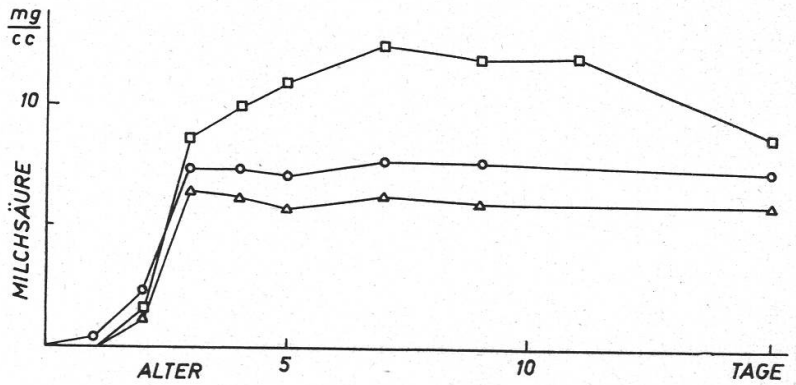
Zur Berechnung der Streuung wurden bei 16 gleich behandelten Kulturen (35° C, 7 Tage alt, 350 Sporen/cm³ geimpft) das Trockengewicht und die Milchsäurebildung bestimmt (Tabelle 2). Schon das Aussehen der Kulturen war verschieden: die Zahl der Myzelstücke schwankte zwischen zwei und zehn; teils waren es Kugeln, teils zylindrische Stücke, in einem Fall sogar eine faserige, gleichförmige Masse. Entsprechend zeigten sich auch Unterschiede in Trockengewicht und Milchsäurebildung. Als Maß für die Streuung diente die Standardabweichung σ.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$$

Der Vergleich der beiden Standardabweichungen zeigt, daß die Streuung bei der Milchsäurebildung geringer ist als beim Trockengewicht. Diese Erscheinung wurde auch durch spätere Versuche wiederholt bestätigt. Die wirkliche Streuung bei der Milchsäurebildung ist wohl noch geringer, denn die Genauigkeit der Bestimmungsmethode ist hier kleiner als beim Trockengewicht. Durch kleine, unkontrollierbare Differenzen der Kulturbedingungen wird die Milchsäurebildung also weniger beeinflußt als das Trockengewicht.

Um zu zeigen, wie stark die Streuung der Milchsäurebestimmungsmethode die Kurven der Milchsäurebildung beeinträchtigt, wurde bei drei Kulturen die Milchsäure fortlaufend bestimmt (Figur 3). Zu diesem Zweck mußten jeweils nur 2 cm³ Nährlösung steril entnommen werden. Der gleichmäßige Verlauf der Kurven zeigt die geringe Streuung der Bestimmungen. In andern Figuren treten oft größere Unregelmäßigkeiten auf, doch handelt es sich dort um Mittelwerte, bei denen sich Ungleichheiten des Wachstums zeigen.

Meder (1952) fand, daß die *Placierung der Kolben* im Schüttelkorb die Fumarsäurebildung bei *Rh. japonicus* beeinflußt, während das Trokkengewicht von der Lage unabhängig war; an den Eckplätzen wurde weniger Fumarsäure gebildet. Es wurde deshalb untersucht, ob bei der Milchsäurebildung durch *Rh. chinensis* etwas Ähnliches zu bemerken sei, doch konnte eine Sonderstellung irgendwelcher Plätze nicht festgestellt werden. Beim Trockengewicht zeigten sich Unterschiede zwischen ver-



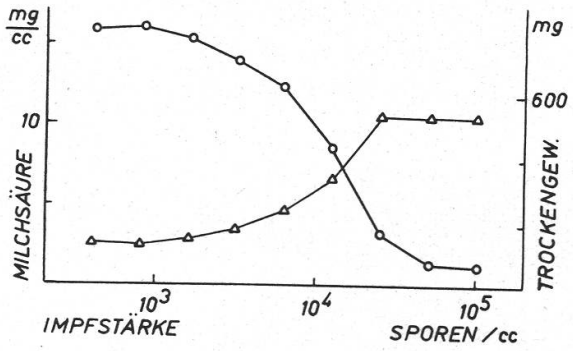
Figur 3
Milchsäurebildung dreier Parallelkulturen während 15 Tagen
5 % Glukose, Marmor, 30° C

schiedenen Reihen (Linien senkrecht zur Schüttelrichtung), die zunächst beim Fenster liegende Reihe wies ein größeres mittleres Trockengewicht auf als die übrigen; um dies zu verhindern, wurden die Plätze gelegentlich gewechselt.

Physiologie der Milchsäurebildung

Einfluß der Impfstärke

Die Zahl der geimpften Sporen beeinflußt das Wachstum und die Milchsäurebildung. Bevor die Wirkung anderer Faktoren untersucht werden kann, muß festgestellt werden, in welchem Maße der Stoffwechsel des Pilzes von der Impfung abhängt. Die verwendete Nährlösung enthielt



Figur 4
Einfluß der Impfstärke auf Milchsäurebildung und Wachstum
—○— Milchsäurekonzentration
—△— Trockengewicht
3 % Glukose, 30° C, 7 Tage alt

3 % Glukose; nach 7 Tagen war diese völlig verbraucht und die Milchsäurebildung abgeschlossen. In diesem Moment wurden Trockengewicht und Milchsäurekonzentration bei verschieden stark geimpften Kolben bestimmt (Figur 4). Betrachtet man die Abhängigkeit der gemessenen Größen von der Impfstärke, so bemerkt man drei verschiedene Bereiche:

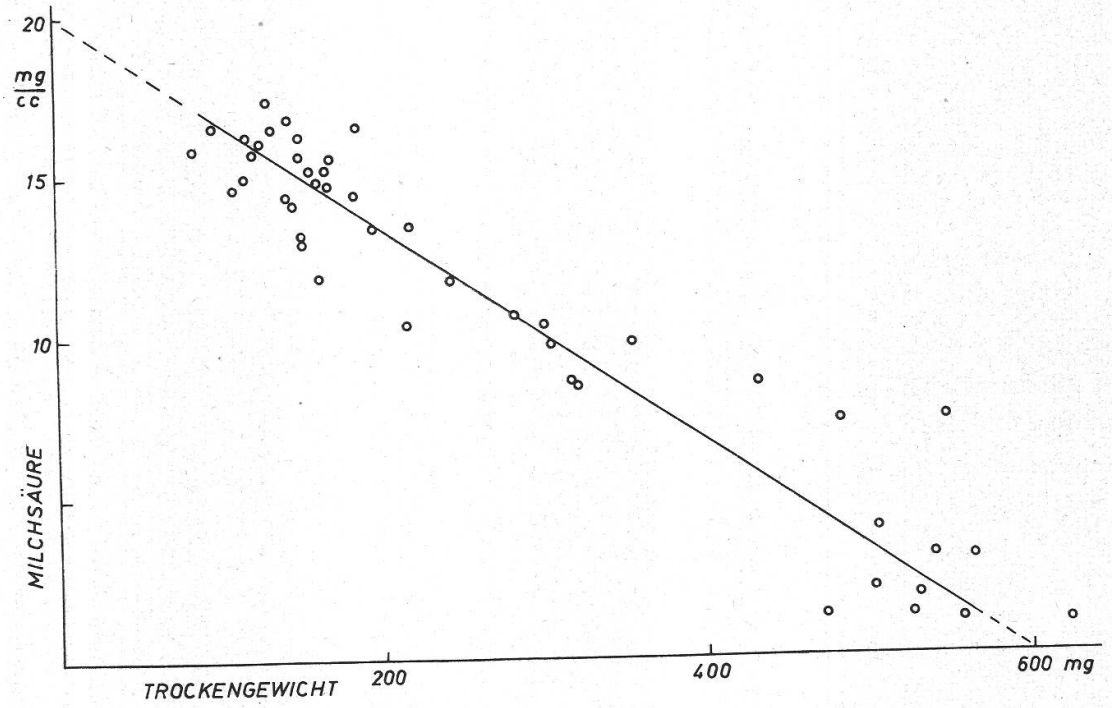
1. Schwache Impfung (400 bis 1600 Sp/cm³): wenig Trockengewicht, viel Milchsäure, geringer Einfluß der Impfstärke.

2. Mittelstarke Impfung (1600 bis 50000 Sp/cm³): wechselnde Mengen Trockengewicht und Milchsäure, starker Einfluß der Impfstärke.
3. Starke Impfung (über 50000 Sp/cm³): viel Trockengewicht, wenig Milchsäure, geringer Einfluß der Impfstärke.

Für Serienversuche sind die Bereiche 1 und 3 günstig, weil dort Schwankungen der Impfstärke eine minimale Wirkung ausüben. Da in der vorliegenden Arbeit die Milchsäurebildung im Zentrum des Interesses steht, wurde der Bereich 1 gewählt; hier tritt eine maximale Milchsäurebildung auf. Der geringe Einfluß der Impfstärke konnte eliminiert werden, indem immer möglichst gleiche Sporenmengen geimpft wurden.

Korrelation Trockengewicht – Milchsäure

Nachdem gezeigt wurde, daß Trockengewicht und Milchsäure Funktionen der Impfstärke sind, soll nun die Beziehung dieser beiden Größen zueinander genauer betrachtet werden. Diese läßt sich kurz so ausdrücken:



Figur 5

Korrelation Trockengewicht – Milchsäurekonzentration
3% Glukose, 30° C, 7 Tage alt

—— Gerade $y = 20 - \frac{1}{30} x$

Die Punkte stellen Einzelwerte dar

Wenn viel Trockensubstanz gebildet wird, tritt wenig Milchsäure auf und umgekehrt. Dies stimmt mit Beobachtungen von Waksman and Foster (1938) an *Rhizopus arrhizus* überein, die mitteilen, daß für das Wachstum

günstige Bedingungen für die Milchsäureanhäufung ungünstig seien. Es ist möglich, den Zusammenhang zwischen den beiden Größen numerisch zu erfassen; es handelt sich hier um eine Korrelation. Für die Milchsäure kommen dabei zwei Maße in Frage: die in der Kulturlösung erreichte Milchsäurekonzentration (oder die total gebildete Milchsäuremenge, welche dieser proportional ist) und die durch 1 mg Trockensubstanz gebildete Milchsäuremenge.

Figur 5 zeigt die Korrelation *Trockengewicht – Milchsäurekonzentration* bei 7 Tage alten Kulturen. An 46 Wertepaaren wurde ein gutes Bild gewonnen. Die Punkte häufen sich längs einer Geraden mit negativer Steigung; diese kann empirisch so ermittelt werden, daß gleich viele Punkte auf beiden Seiten liegen. Extrapoliert man sie, so erhält man als Achsenabschnitte ungefähr die Werte $x_0 = 600$ mg und $y_0 = 20$ mg/cm³. Daraus läßt sich ihre Gleichung berechnen. Die Einheiten sind auf der X-Achse mg Trockengewicht, auf der Y-Achse mg Milchsäure pro cm³. Man verschiebt das Koordinatensystem in der X-Richtung, so daß $x_0/0$ der neue Nullpunkt ist. Dann ist $\overline{x} = x - x_0$ $\overline{y} = y$. Die Geradengleichung lautet

$$\overline{y} = -\frac{y_0}{x_0}\overline{x}$$

Zurücktransformiert:

$$y = y_0 - \frac{y_0}{x_0}x$$

Eingesetzt:

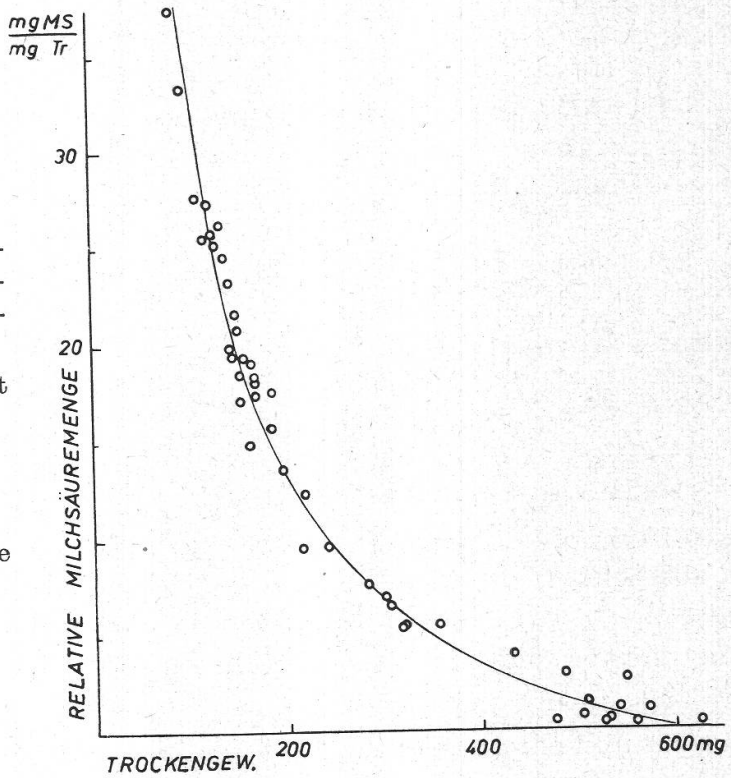
$$y = 20 - \frac{1}{30}x \qquad (85 < x < 580) \qquad (3)$$

Um diese Gerade (die nur für Schüttelkultur gilt) scharen sich die Punkte. Sie besagt, daß die unter den vorliegenden Bedingungen maximal erreichbare Milchsäurekonzentration 20 mg/cm³ beträgt; die Differenz zwischen diesem Maximalwert und der tatsächlich gebildeten Milchsäure ist dem Trockengewicht proportional; je größer also das Trockengewicht, um so tiefer liegt die Milchsäurekonzentration unter 20 mg/cm³. Setzt man zwei Wertepaare ($x_1 < x_2$ / $y_1 > y_2$) in die Gleichung ein und subtrahiert, so folgt

$$\triangle y = \frac{1}{30}\triangle x \qquad (\triangle x = x_2 - x_1 / \triangle y = y_1 - y_2) \quad (4)$$

Das heißt: vergleicht man eine stärker gewachsene Kultur mit einer schwächer gewachsenen, so ist die Abnahme der Milchsäurekonzentration proportional der Zunahme des Trockengewichts.

Trägt man auf der Y-Achse statt der Milchsäurekonzentration die *relative* (d. h. von 1 mg Myzel gebildete) *Milchsäuremenge* ein, so folgt die zugehörige Punkteschar nicht mehr einer Geraden, sondern einem Hyperbelast (Figur 6). Bei kleinen Myzelien ist also nicht nur die absolute, sondern erst recht auch die relative Milchsäuremenge größer als bei großen Myzelien. Daß hier gerade eine Hyperbel entsteht, läßt sich aber rein



Figur 6
Korrelation zwischen Trockengewicht und relativer Milchsäuremenge (pro mg Myzel gebildete Milchsäuremenge)
3 % Glukose, 30° C, 7 Tage alt
— Hyperbel
$x' \, (y' + 6\frac{2}{3}) = 4000$
Die Punkte stellen Einzelwerte dar

formal erklären. Figur 6 folgt aus Figur 5, indem die Milchsäurekonzentration y durch die relative Milchsäuremenge $\frac{200\,y}{x}$ ersetzt wird (Volumen der Nährlösung: 200 cm³). Die neuen Koordinaten lauten dann:

Trockengewicht: $x' = x$

Relative Milchsäuremenge: $y' = \frac{200\,y}{x}$

Gleichung (3) geht dann über in $\frac{x'\,y'}{200} = 20 - \frac{x'}{30}$

umgeformt: $$x' \, (y' + 6\frac{2}{3}) = 4000 \quad (x' > 0, \, y' > 0) \qquad (5)$$

Diese Gleichung eines Hyperbelastes wurde auf rein mathematischem Weg aus der Geradengleichung hergeleitet. Figur 6 ist also nur eine andere Darstellung der in Figur 5 gezeigten Beziehung. Die Hyperbelgleichung läßt aber zusätzlich erkennen, daß Trockengewicht und relative Milchsäuremenge in einem reziproken Verhältnis stehen.

Für die *statistische Berechnung* der Korrelation (Fisher, 1946; Linder, 1951) benützt man aber besser die Milchsäurekonzentration als Maß für die Milchsäurebildung, denn die Korrelation ist hier linear (Figur 5). Der Mittelpunkt der 46 Wertepaare (x = Trockengewicht, y = Milchsäurekonzentration) ist

$$x_m = \frac{1}{n} \Sigma x = 272 \text{ mg} \qquad y_m = \frac{1}{n} \Sigma y = 11{,}2 \text{ mg/cm}^3$$

Das Koordinatensystem wird nun so transformiert, daß dieser Mittelpunkt der neue Nullpunkt ist; dann erfolgt die Berechnung der beiden Regressionskoeffizienten

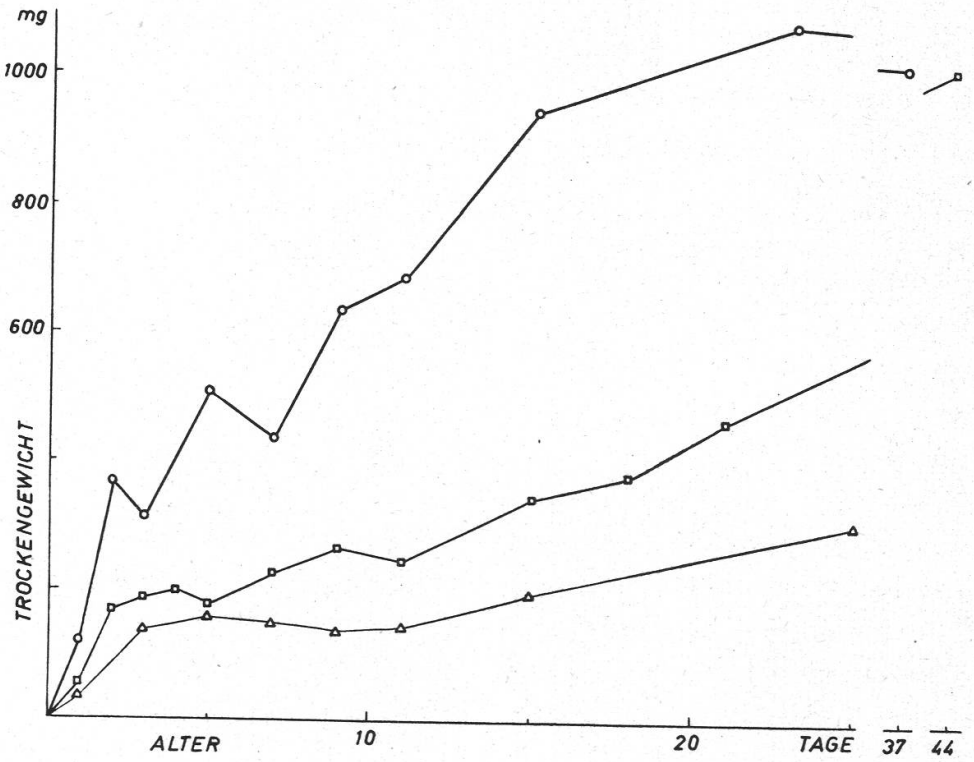
$$m_1 = \frac{\Sigma xy}{\Sigma x^2} = -0{,}0303 \qquad m_2 = \frac{\Sigma y^2}{\Sigma xy} = -0{,}0334$$

und des Korrelationskoeffizienten

$$r = \frac{\Sigma xy}{\sqrt{\Sigma x^2 \cdot \Sigma y^2}} = -0{,}9526$$

Er unterscheidet sich nur wenig vom idealen Wert —1. Die Korrelation ist also sehr straff; sie ist linear und negativ. Überhöht man (wie in Figur 5) die y-Werte zwanzigfach, so bilden die beiden Regressionsgeraden Winkel von 148°46′ und 146°16′ zur X-Achse.

Alle bisherigen Untersuchungen betrafen 7 Tage alte Kulturen. Es wurde nun aber auch untersucht, wie sich verschieden starke Impfung auf



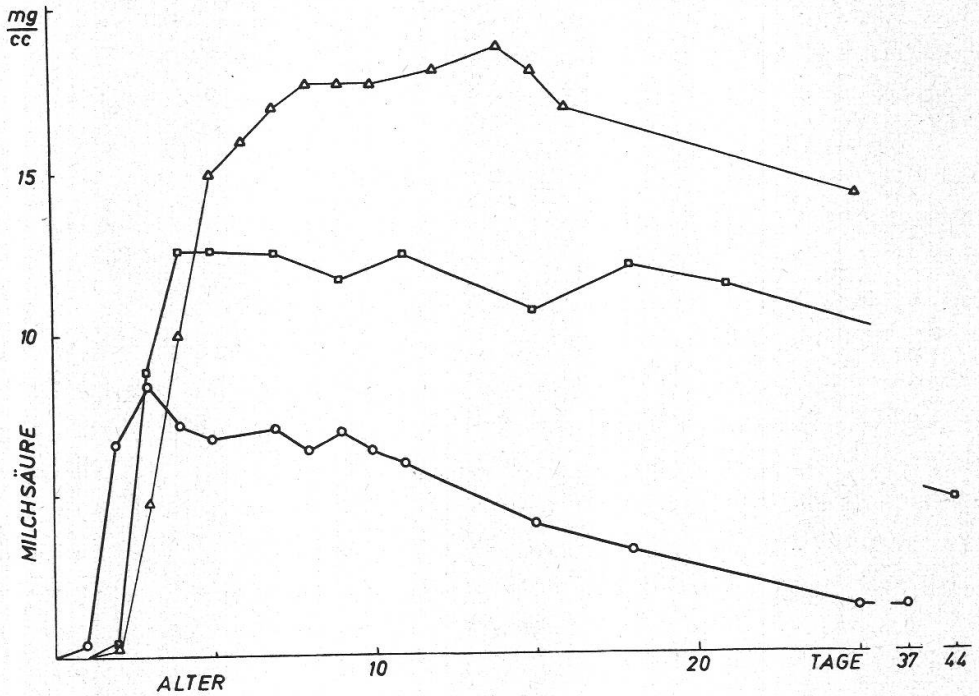
Figur 7

Zeitlicher Verlauf des Wachstums bei verschieden stark geimpften Kulturen

——△—— 800 Sporen/cm³ ——□—— 2000 Sporen/cm³

——○—— 17 500 Sporen/cm³

den *gesamten Kulturverlauf* auswirkt. Figuren 7 und 8 zeigen, daß die festgestellte Abhängigkeit vom 5. Tage an besteht und während der ganzen weiteren Kulturdauer erhalten bleibt. Die an 7 Tage alten Kulturen ge-

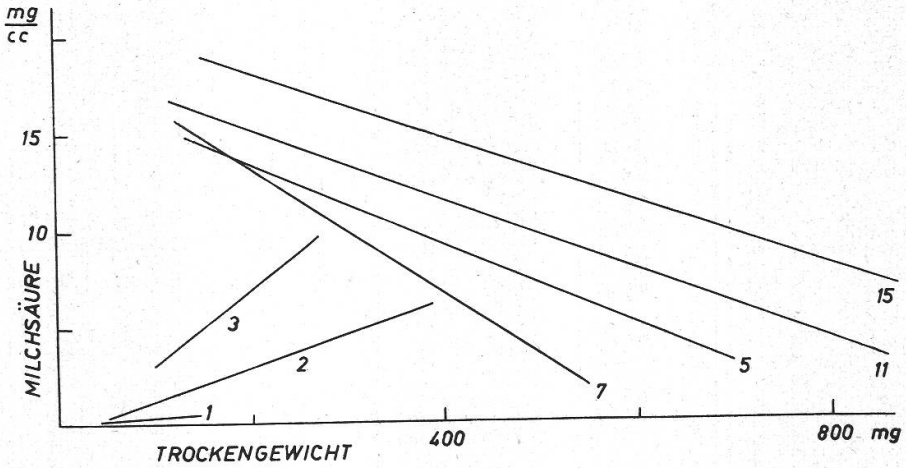


Figur 8

Zeitlicher Verlauf der Milchsäurebildung bei verschieden stark geimpften Kulturen

—△— 800 Sporen/cm³ —□— 2000 Sporen/cm³

—○— 17 500 Sporen/cm³



Figur 9

Korrelation Trockengewicht – Milchsäurekonzentration bei 1 bis 15 Tage alten Kulturen

Lage der Geraden empirisch ermittelt

wonnenen Erkenntnisse haben also allgemeine Gültigkeit für Kulturen, die mindestens 5 Tage alt sind. Die Verhältnisse an den ersten Tagen verlangen noch eine genauere Abklärung. Erweitert man die Messungen über die Korrelation Trockengewicht – Milchsäurekonzentration auf 1 bis 15 Tage alte Kulturen, so kann man die zugehörigen Geraden nach ihrer Richtung in zwei Gruppen einteilen (Figur 9): Am 1. bis 3. Tag ist die Steigung positiv, d. h. die Milchsäurekonzentration ist ungefähr proportional dem Trockengewicht. Erst vom 5. Tag an wird die Korrelation in der beschriebenen Art beobachtet, d. h. die Geradensteigung ist negativ. In den folgenden 10 Tagen ändert sich dies nicht wesentlich, die Gerade verschiebt sich aber langsam nach rechts.

Sucht man nach einer *Erklärung* dieser Verhältnisse, so ist auch zu beachten, daß bei der vorliegenden Glukosekonzentration (3 %) der Glukoseverbrauch und die Milchsäurebildung am 4. Tag im wesentlichen abgeschlossen sind. Das ist aber gerade der Tag, an welchem der Übergang von positiven zu negativen Geradensteigungen stattfindet. Die Korrelation stellt sich also erst dann ein, wenn die Nährlösung keine nennenswerten Glukosemengen mehr enthält. Gleichung (4) läßt erwarten, daß als Ursache für die geringe Milchsäurebildung bei großen Myzelien ein Faktor in Frage kommt, dessen Größe ebenfalls proportional der Trockengewichtszunahme ist. Dies trifft für den Nährstoffverbrauch, insbesondere für den Glukoseverbrauch zu. Die Vermutung liegt nahe, daß stärkere Impfung stärkeres Wachstum und damit stärkeren Glukoseverbrauch verursacht, so daß für die Milchsäurebildung entsprechend weniger Glukose zur Verfügung steht. Zur weiteren Prüfung dieser Vermutung werden gleich schwere Myzelien betrachtet, die bei verschiedenem Glukosegehalt gewachsen sind. Diese müssen nicht absolut gleich alt sein, sie müssen sich aber im gleichen Entwicklungsstadium befinden (d. h. die Milchsäurekonzentration hat das Maximum erreicht, das Wachstum ist zum Still-

Tabelle 3

Milchsäurebildung durch annähernd gleich schwere Myzelien bei verschiedener Glukosekonzentration

Trockengewicht mg	Milchsäure (am Schluß) mg/cm³	Glukose (am Anfang) %	Alter Tage
228	7,6	1,5	10
249	6,9	1,5	10
244	11,8	3	7
224	26,8	6	6
301	10,4	3	7
292	28,1	12	8
503	2,1	3	7
495	26,3	12	8

stand gekommen). Tabelle 3 zeigt, daß gleich schwere Myzelien um so mehr Milchsäure bilden, je mehr Glukose zur Verfügung steht. Das bestätigt die Vermutung, daß die geringe Milchsäurebildung bei großen Myzelien durch Glukosemangel hervorgerufen wird. Damit ist auch erklärt, warum die Korrelation erst vom 5. Tage an beobachtet wird, denn von diesem Tage an ist die Glukose aufgebraucht. Bei Kulturen mit 6 % oder mehr Anfangsglukosekonzentration wird die Korrelation tatsächlich nicht mehr festgestellt; größere Myzelien erzeugen hier oft größere Milchsäuremengen, noch häufiger ist aber hier überhaupt keine gesetzmäßige Beziehung zwischen Trockengewicht und Milchsäurebildung zu erkennen.

Die beschriebene Korrelation ist also bezeichnend für ungenügende Glukoseversorgung. Sie zeigt, daß in diesem Falle Milchsäurebildung und Wachstum nicht im gleichen Verhältnis reduziert werden, sondern daß bei Glukosemangel das Wachstum (sofern es durch hinreichend starke Impfung ermöglicht wird) gegenüber der Milchsäurebildung bevorzugt wird. Wird es aber durch schwache Impfung gedrosselt, so werden trotz Glukosemangel beträchtliche Milchsäuremengen gebildet.

Es ergibt sich schon hier eine Möglichkeit, abzuschätzen, wieviel Glukose in Milchsäure umgesetzt werden kann. Die Nährlösung enthält (nach Abzug des Wassergehaltes) 27 mg/cm³ reine Glukose. Würde überhaupt kein Wachstum stattfinden, so könnten laut Gleichung (3) maximal 20 mg/cm³ Milchsäure gebildet werden. Dies würde einer maximalen Milchsäureausbeute von 74 % der Glukose entsprechen. Später beschriebene Versuche über den Betriebsstoffwechsel (unter Verhinderung des Wachstums) bestätigen dieses Resultat.

Einfluß der Temperatur

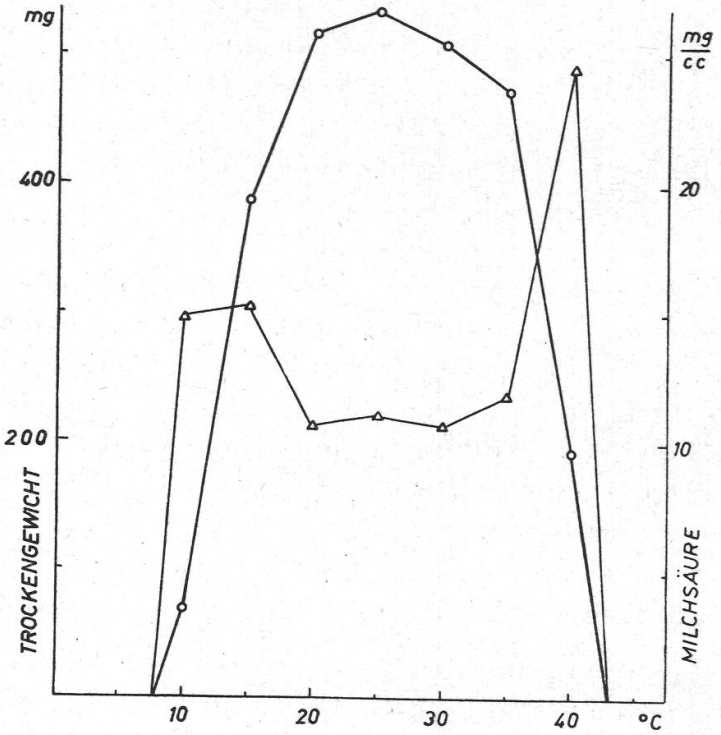
Rhizopus chinensis wird in der Literatur als ausgesprochen thermophiler Pilz beschrieben, dessen Kardinalpunkte höher liegen als bei allen andern *Rhizopus*-Arten; die zahlenmäßigen Angaben darüber sind aber unterschiedlich. Weimer und Harter (1923) zitieren folgende Optimalwerte für das Wachstum:

Weimer und Harter:	37,5° — 40,5° C
Hanzawa:	38° — 42° C
Lendner:	30° — 40° C

Ferner nennen sie als Minimum für das Wachstum: 10,4° C
Maximum für das Wachstum: 49° C

Eigene Versuche ergaben, daß die Lage der Kardinalpunkte keine rein konstitutionelle Eigenschaft des Pilzes ist, sondern auch durch die Kulturbedingungen beeinflußt wird. So wird beispielsweise das Maximum durch die Nährlösung mitbedingt; in peptonhaltiger Nährlösung liegt es höher als in mineralischer mit Glukose. Das dürfte der Grund für die unterschiedlichen Literaturangaben sein.

Zur Gewinnung eines Überblicks werden mit Vorteil Kulturen verwendet, in denen nicht nur bei optimalen, sondern bei möglichst vielen Temperaturen die gesamte Glukosemenge verbraucht ist. Dies ist bei *21 Tage* alten Kulturen mit 6% Glukose der Fall; hier sind einzig bei 15° C noch Spuren und bei 10° C noch die Hälfte der Glukose vorhanden. Figur 10 zeigt die durch völligen Glukoseabbau bei verschiedenen Temperaturen entstandenen Milchsäure- und Trockengewichtsmengen. Bei 45° C ist kein *Wachstum* mehr möglich, auch nicht unter andern Kulturbedingungen. Bei 40° C ist es noch sehr stark. Das Maximum liegt bei 42° bis 44° C. Das Minimum beträgt für das Wachstum 6° bis 9° C, für die



Figur 10
Temperaturabhängigkeit von Wachstum und Milchsäurebildung
21 Tage alte Kulturen
Glukosevorrat erschöpft
——○—— Milchsäure
——△—— Trockengewicht

Sporenkeimung 5° C. Unter den vorliegenden Bedingungen beträgt das Optimum für das Wachstum 40° C. Zum Vergleich sei bemerkt, daß es in einer Deckenkultur auf peptonhaltiger Nährlösung nur 25° C beträgt. Man erkennt an diesem Beispiel den starken Einfluß der Kulturbedingungen. Differenzen gegenüber der Literatur bestehen vor allem beim Maximum, das tiefer als angegeben liegt; auch das Minimum liegt etwas tiefer. Bei allen Temperaturen, bei denen der Pilz wächst, wird auch *Milchsäure* gebildet. Maximum und Minimum der Milchsäurebildung sind daher mit den entsprechenden Werten für das Wachstum identisch. Während aber für das Wachstum hohe Temperaturen optimal sind, liegt das Optimum für die Milchsäurebildung bei mittleren Temperaturen (20° bis 35° C), am meisten Milchsäure wird bei 25° C gebildet. Neben der Kurve der Milchsäurebildung, die eine einfache Temperaturabhängigkeit zeigt, wirkt die

Kurve des Trockengewichts mit ihren zwei Maxima zunächst etwas seltsam. Doch ist dies durch eine ähnliche Korrelation wie die im vorhergehenden Kapitel beschriebene zu erklären: Wo viel Milchsäure gebildet wird, ist die Trockengewichtsbildung gering und umgekehrt. Es ist jedoch nicht ohne weiteres einleuchtend, weshalb das Wachstum von der Milchsäurebildung abhängen soll und nicht umgekehrt, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben.

Zur genaueren Untersuchung werden *7 Tage* alte Kulturen verwendet. Hier ist bei keiner Temperatur die Glukose völlig aufgebraucht. Der Glukoseverbrauch gewährt aber einen genaueren Einblick in den Stoffwechsel. Dazu werden noch zwei Begriffe gebraucht: der ökonomische Koeffizient und die Milchsäureausbeute.

Der Begriff «ökonomischer Koeffizient» wurde von Pfeffer (1895) für das Verhältnis des Zuwachses zur Menge der verbrauchten Stoffe eingeführt[1].

Er wird hier im Pfefferschen Sinne für das Verhältnis

$$\frac{\text{Gramm gebildetes Trockengewicht}}{\text{Gramm verbrauchte Glukose}}$$

verwendet. Er wird meist in Prozent ausgedrückt und gibt einen Anhaltspunkt dafür, wieviel von der verbrauchten Glukose für die Trockengewichtsbildung verwendet wurde.

Die *Milchsäureausbeute* (von Foster, 1949, «conversion efficiency» genannt) wird dargestellt durch das Verhältnis

$$\frac{\text{Gramm gebildete Milchsäure}}{\text{Gramm verbrauchte Glukose}}$$

Er gibt an, wie viele Prozent der Glukose in Milchsäure verwandelt werden.

Figur 11 zeigt diese Werte für 7 Tage alte Kulturen (mit 6 % Glukose). Der Kurvenverlauf der Milchsäure und des Trockengewichts ist gleich wie bei Figur 10; doch sind die erreichten Werte, besonders bei tiefen Temperaturen, noch etwas geringer. Die Kurve des Glukoseverbrauchs zeigt, daß der Stoffwechsel zwischen 25° und 35° C am intensivsten ist; das Maximum liegt bei 30° C. Prüft man, wie sich die verbrauchte Glukose

[1] Foster (1949) verwendet diesen Begriff ebenfalls, bezeichnet aber mit «economic coefficient» zwei verschiedene Dinge. Auf S. 43, 143, 148 und 149 meint er damit das Verhältnis

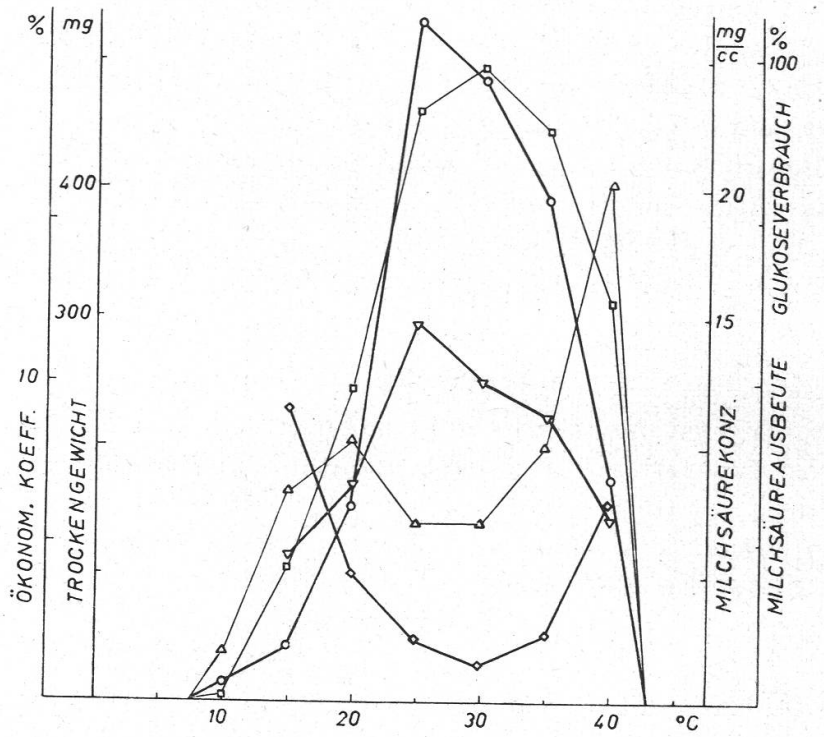
$$\frac{\text{Gramm gebildetes Myzeltrockengewicht}}{\text{Gramm verbrauchte Kohlehydrate}}$$

und bezeichnet dies etwa genauer als ökonomischen Koeffizienten der Zellsynthese. Auf S. 272 und 289 verwendet er dasselbe Wort «economic coefficient» für das reziproke Verhältnis, nämlich für

$$\frac{\text{Gramm verbrauchter Zucker}}{\text{Gramm Trockengewicht}}$$

und denkt dabei wohl an die Oekonomie des Zuckerverbrauchs. Nur aus Fußnoten ist jeweils zu erkennen, was mit dem Wort gemeint ist.

auf Wachstum und Milchsäurebildung verteilt, so erkennt man aus dem minimalen ökonomischen Koeffizienten und aus der maximalen Milchsäureausbeute, daß bei 25° bis 30° C ein maximaler Bruchteil der Glukose für die Milchsäurebildung und ein minimaler Bruchteil für das Wachstum verwendet wird. Da hier der Stoffwechsel am intensivsten ist, kann angenommen werden, daß hier auch die Aktivität der glukoseabbauenden Fermente am größten ist. Daher werden bei diesen Temperaturen wohl



Figur 11

Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels

7 Tage alte Kulturen, Glukosevorrat noch nicht erschöpft

—○— Milchsäurekonzentration —△— Trockengewicht

—◇— Ökonomischer Koeffizient —▽— Milchsäure-ausbeute

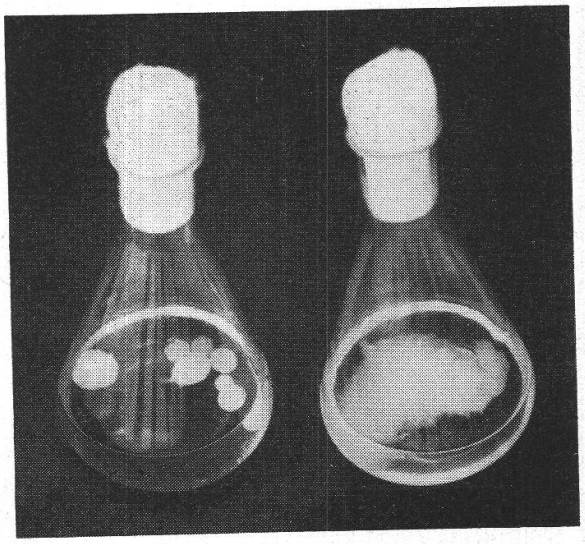
—□— Glukoseverbrauch (% der Anfangskonzentration)

schon durch relativ kleine Myzelien große Milchsäuremengen gebildet; dies führt zu einem weitgehenden Verbrauch der Glukose und damit zu einer Verminderung des weiteren Wachstums. Die hier auftretende Korrelation zwischen Trockengewicht und Milchsäurebildung gleicht zwar der früher beschriebenen, entsteht aber aus andern Ursachen: Früher entstand wenig Milchsäure infolge Förderung des Wachstums durch optimale Impfung; hier zeigt sich geringes Wachstum infolge Begünstigung der Milchsäurebildung durch optimale Temperatur. Aus diesem Grunde weist die Kurve des Trockengewichts als Funktion der Temperatur im

Bereich der starken Milchsäurebildung ein relatives Minimum, in den Gebieten der schwachen Milchsäurebildung zwei Maxima (relatives bei 20° C und absolutes bei 40° C) auf.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Gibt man keine neutralisierenden oder puffernden Substanzen in die Nährlösung, so sinkt infolge der Säurebildung das *p*H ziemlich rasch auf Werte, die für das Wachstum (Foster, 1949) und vor allem für die Milchsäurebildung (Waksman and Hutchings, 1937) ungünstig sind. Der Nährlösung wurde deshalb versuchsweise Marmor, Kaliumphosphat- und Natriumzitratpuffer zugesetzt. Bei Verwendung von Marmor zeigt sich unregelmäßiges Wachstum: oft entstehen große Klumpen, oft lange, wurstartige Gebilde. Zur Erzielung homogenen Kugelmyzels ist Natriumzitrat-

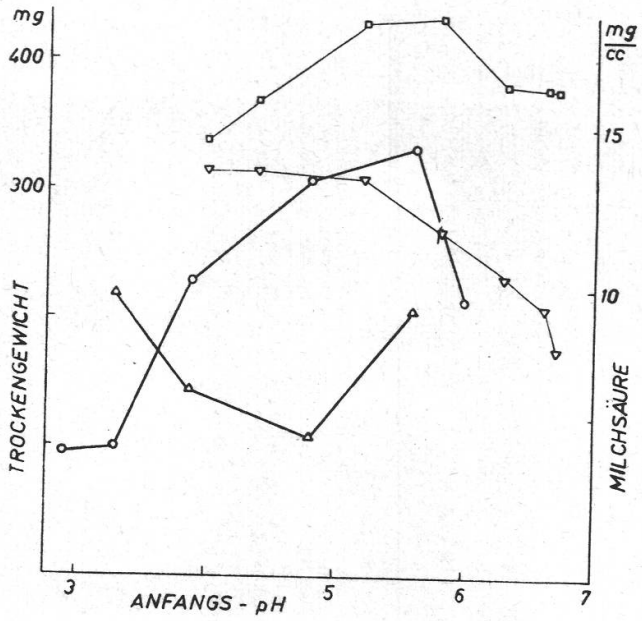


Figur 12
Beeinflussung der Wachstumsform
Links: Natriumzitratpuffer
Rechts: Marmor

puffer am besten geeignet (s. a. Meder, 1952). Figur 12 zeigt das darin entstehende Myzel. Dieser Puffer wurde deshalb am meisten verwendet. Nur wo es sich darum handelte, die Eignung von Kohlenstoffquellen für den Stoffwechsel zu untersuchen, wurde Marmor zur Neutralisation benützt, denn beim Fehlen von günstigeren Kohlenstoffverbindungen kann der Pilz auch die Zitronensäure verwerten. In glukosehaltigen Nährlösungen geschieht dies allerdings nie, auch nicht nach dem Verbrauch der Glukose.

Untersucht man den Einfluß verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen, so hängt das Resultat auch teilweise vom verwendeten Puffer ab, da auch die Puffersubstanzen in ihren wechselnden Verhältnissen den Pilz beeinflußen können. Der Einfluß des *p*H wurde deshalb unter Verwendung von zwei verschiedenen Puffern beobachtet (Figur 13). In *Phosphatpuffer* ist *p*H 4 bis 5 für das Wachstum optimal, höhere Werte sind weniger günstig. Bei allen untersuchten Werten wurde relativ viel Milchsäure gebildet, das Optimum liegt bei *p*H 5,2 bis 5,8. In *Zitratpuffer* hängt

die Milchsäurebildung stärker vom *p*H ab. Optimal ist hier *p*H 5,7. Geht das *p*H auf 3 zurück, so sinkt die Milchsäurebildung auf einen Fünftel des Wertes bei optimalem *p*H. Die Kurve des Trockengewichts zeigt bei *p*H 4,9 ein relatives Minimum, welches an dasjenige von Figur 11 erinnert und wohl auch eine ähnliche Ursache hat. *p*H-Werte, welche geringere Milchsäurebildung verursachen, erlauben dafür stärkeres Wachstum. Beiden Puffern gemeinsam ist die Tatsache, daß *p*H 5,7 für die Milchsäurebildung optimal ist. Für die weiteren Versuche wurde Natriumzitratpuffer benützt, der zusammen mit der Nährlösung *p*H 4,9 ergab. Hier bildete der Pilz auch immer homogenes Kugelmyzel; die Kugeldurchmesser betrugen meist 1 bis 2 cm.



Figur 13

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Wachstum und Milchsäurebildung

—○— Milchsäure } in natriumzitrathaltiger Nährlösung
—△— Trockengewicht } in natriumzitrathaltiger Nährlösung

—□— Milchsäure } in phosphatpufferhaltiger Nährlösung
—▽— Trockengewicht } in phosphatpufferhaltiger Nährlösung

Einfluß des Zinks

Foster (1949) und Waksman and Foster (1938) beschreiben einen auffälligen Einfluß des Zinks auf den Stoffwechsel; ein Zusatz von 10 bis 50 mg/Liter ist optimal (Lockwood et al., 1936). Seine Wirkung besteht in einer Steigerung von Wachstum und Glukoseverbrauch und in einer Herabsetzung der Milchsäureausbeute und des reziproken ökonomischen Koeffizienten[1] (im gleichen Verhältnis) sowie der Milchsäurebildung.

---

[1] Schon auf Seite 83 (Fußnote) wurde auf die unkonsequente Verwendung des Begriffs «ökonomischer Koeffizient» bei Foster (1949) hingewiesen. Hier wird damit das Verhältnis

$$\frac{\text{Gramm Trockengewicht}}{\text{Gramm Glukose}}$$

bezeichnet, während der reziproke Wert davon «reziproker ökonomischer Koeffizient» genannt wird.

In eigenen Versuchen wurde die übliche Nährlösung mit Dithizon möglichst gut von Zinkspuren gereinigt (Vöchting, 1953), dann erfolgte Zugabe von Zink in verschiedenen Konzentrationen. Mengen über 1 g/l wirken toxisch, und bei mehr als 5,6 g/l ist kein Wachstum mehr möglich. Im Bereich des normalen Wachstums ist aber kein wesentlicher Einfluß der Zinkkonzentration auf Wachstum, Glukoseverbrauch, Milchsäurebildung, Milchsäureausbeute und reziproken ökonomischen Koeffizienten[1] zu bemerken; nur die zinkfreie Nährlösung zeigt etwas geringere Werte. Es stellt sich nun die Frage, ob das Ausbleiben des «Zinkeffekts» vielleicht durch ungeeignete Versuchsbedingungen verursacht wurde. Es wäre denkbar, daß das zugefügte Zink durch irgendwelche Komponenten der Nährlösung (z. B. Zitronensäure) in eine Form übergeführt wurde, in der es nicht aufgenommen werden konnte.

Zur weiteren Untersuchung wurde dieselbe Nährlösung benützt, die Waksman and Foster (1938) verwendet hatten. Diese enthielt in 1 Liter: 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,1 g $Fe_2(SO_4)_3$, 60 g Glukose. Die Zugabe von Marmor mußte unterbleiben, da sich zeigte, daß dieser erhebliche Zinkspuren enthält. Zur Stabilisierung des *p*H wurde an seiner Stelle ein Puffergemisch aus KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 zugefügt. In dieser Nährlösung zeigt sich tatsächlich ein deutlicher Einfluß des Zinks (Tabelle 4). Bei Zinkzusatz erfolgt hier eine Vergrößerung des Wachstums

Tabelle 4

Einfluß des Zinks auf den Stoffwechsel von *Rhizopus chinensis*
Nährlösung mit Phosphatpuffer

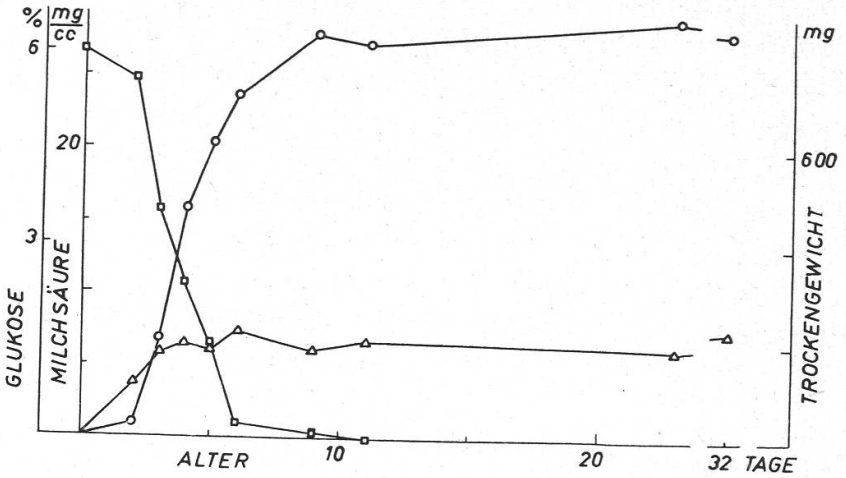
	Nährlösung		
	Von Zink gereinigt	Ungereinigt	Zusatz: 10 mg Zn/l
Trockengewicht	277 mg	384 mg	688 mg
Glukoseverbrauch	2,96 g	5,62 g	8,70 g
Milchsäurebildung	1,79 g	1,81 g	1,12 g
Milchsäureausbeute	60,4 %	32,2 %	12,9 %
Reziproker ökonomischer Koeffizient	10,7	14,5	12,6

und des Glukoseverbrauchs sowie eine Verkleinerung der Milchsäurebildung und -ausbeute, ähnlich wie Foster (1949) dies mitteilt. In Abweichung von dessen Feststellungen bleibt aber der ökonomische Koeffizient im wesentlichen unverändert! Daß er auf den gleichen Bruchteil wie die Milchsäureausbeute reduziert werde, trifft also nicht zu. Während die Zugabe von Zink bei *Rh. chinensis* zu einer Steigerung des Trockengewichts und des Glukoseverbrauchs führt, ist die zur Bildung einer Einheit Zellsubstanz nötige Glukosemenge von der Anwesenheit des Zinks unabhängig; dagegen wird beim Fehlen von Zink aus einer Einheit Glukose die 4- bis 5fache Milchsäuremenge gebildet wie bei Gegenwart von 10 mg Zn/l.

[1] Siehe Fußnote auf Seite 86.

Wachstum, Glukoseabbau und Milchsäurebildung

Zur Gewinnung eines Überblicks über die physiologischen Vorgänge in den Kulturen von *Rh. chinensis* sei der zeitliche Verlauf von Trockengewicht, Glukose- und Milchsäurekonzentration verglichen. Als erstes Beispiel dient eine Kultur mit *6% Glukose* bei 30° C (Figur 14). Die Milchsäurebildung ist in den ersten Tagen ungefähr proportional der Zeit, dann wird sie plötzlich verlangsamt, und in dem Moment, in welchem alle Glukose verbraucht ist, wird die Milchsäurebildung eingestellt, und die Milchsäurekonzentration bleibt von nun an konstant. Man erkennt hier, daß der Glukoseabbau die Voraussetzung für die Milchsäurebildung ist;



Figur 14

Zeitlicher Verlauf von Wachstum, Milchsäurebildung und Glukoseverbrauch (Anfangskonzentration: 6%)

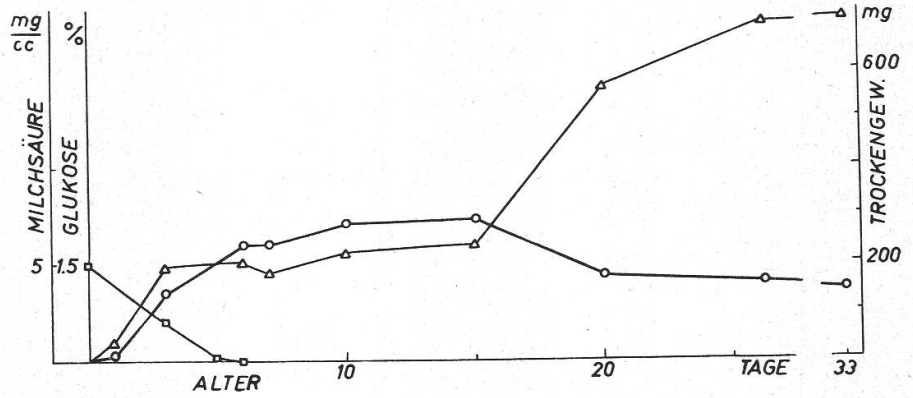
—△— Trockengewicht —○— Milchsäure

—□— Restglukose

außerdem weist die genaue Entsprechung der beiden Kurven darauf hin, daß keine weiteren Stoffe (z. B. Zitronensäure) für die Milchsäurebildung verwendet werden. Die Trockengewichtsbildung hört schon auf, wenn erst die Hälfte bis zwei Drittel der Glukose verbraucht sind. Möglicherweise wirkt hier auch die Impfstärke als begrenzender Faktor.

Das zweite Beispiel ist eine Kultur mit *1,5% Glukose* (Figur 15). Betrachtet man nur die ersten 10 Tage, so findet man analoge Verhältnisse wie bei Figur 14. Doch beobachtet man hier einige Tage nach dem totalen Verbrauch der Glukose ein erneutes Wachstum, verbunden mit einer Abnahme der Milchsäure. Dies dauert etwa zehn Tage, dann stellt sich ein stabiler Endzustand ein, und beide Werte bleiben konstant. Die vorher ausgeschiedene Milchsäure wird also erneut in den Stoffwechsel einbezogen, bildet die Kohlenstoffquelle für erneutes Wachstum und wird dabei weiter abgebaut. Der Glukoseabbau findet hier in zwei zeitlich getrennten Etap-

pen statt: zuerst vollständiger Abbau zu Milchsäure, später weiterer Abbau eines Teils der Milchsäure. Dies stimmt mit Beobachtungen von Waksman and Hutchings (1937) an *Rhizopus MX* überein, wo nach dem Verbrauch der gesamten Zuckermenge ein Teil der Milchsäure zu niedrigeren Säuren weiteroxydiert wurde. Die Milchsäure ist also ebenfalls eine geeignete Kohlenstoffquelle für den Baustoffwechsel (s. a. S. 96 ff.).



Figur 15

Zeitlicher Verlauf von Wachstum, Milchsäurebildung und Glukoseverbrauch (Anfangskonzentration: 1,5 %)

——△—— Trockengewicht ——○—— Milchsäure

——□—— Restglukose

Da *Rhizopus*-Arten heterofermentative Milchsäurebildung zeigen, wurde auch für *Rh. chinensis* orientierend untersucht, ob außer Milchsäure noch andere Gärungsprodukte auftreten (Tabelle 5).

Die Bestimmung des Äthylalkohols geschah im Labor des Kantonschemikers (Dr. R. Müller), die polarographische Bestimmung der Fumarsäure im Botanischen Institut durch Dr. H. Schoch, der die Fumarsäurebildung an andern *Rhizopus*-Arten untersuchte. Für die Durchführung dieser Analysen danke ich den beiden Herren bestens.

Tabelle 5

Bildung verschiedener Stoffwechselprodukte durch *Rh. chinensis* (Heterofermentative Milchsäuregärung)

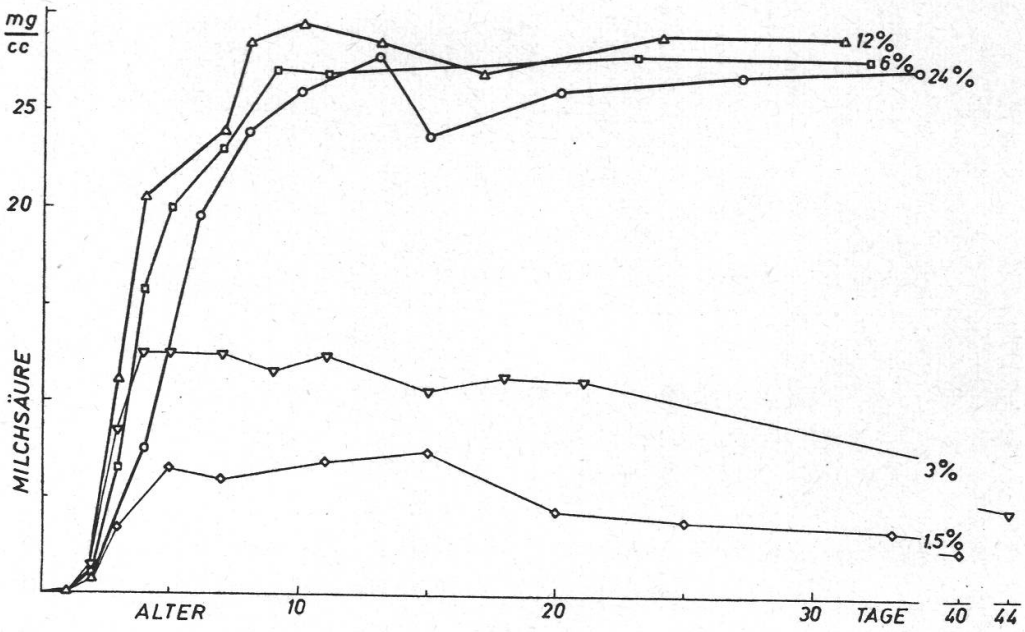
Stoffwechselart	Milchsäure	Fumarsäure	Alkohol
a) Gesamtstoffwechsel	+ + +	Spur	+
b) Reiner Betriebsstoffwechsel	+ + +	Spur	+
c) Reiner Betriebsstoffwechsel mit Zn-Zusatz	+ + +	Spur	+

Einfluß der Glukosekonzentration

Als Kohlenstoffquelle für die Milchsäuregärung wurde in der Regel Glukose verwendet. Der Einfluß ihrer Anfangskonzentration auf den

Stoffwechsel ist sehr auffällig. Die Figuren 16 bis 18 zeigen den zeitlichen Verlauf von Milchsäurebildung, Glukoseverbrauch und Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen.

Die *Milchsäurebildung* (Figur 16) ist in den ersten beiden Tagen sehr gering. Bei kleinen Glukosekonzentrationen setzt sie erst richtig ein, wenn das Wachstum schon fast zu einem (vorübergehenden) Abschluß gelangt ist. Dies deutet darauf hin, daß die Milchsäure vor allem ein Produkt des Betriebsstoffwechsels ist. Der bereits genannte Zusammenhang zwischen totalem Verbrauch der Glukose und dem Aufhören der Milchsäurebildung



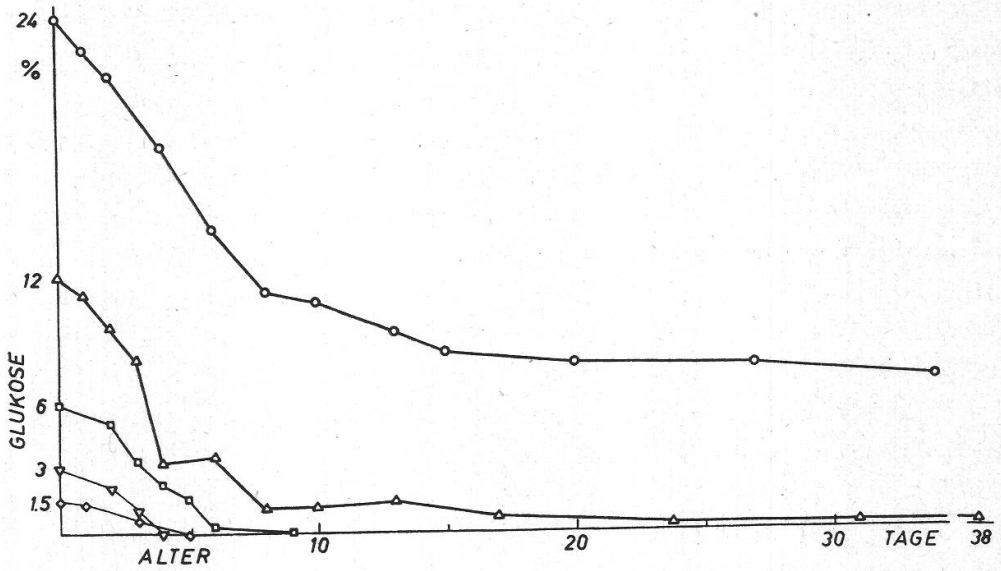
Figur 16

Zeitlicher Verlauf der Milchsäurebildung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

—◇— 1,5 % Glukose —▽— 3 % Glukose —□— 6 % Glukose
—△— 12 % Glukose —○— 24 % Glukose

ist bei allen Glukosekonzentrationen zu erkennen. Dort wo diese so groß ist, daß kein vollständiger Abbau der Glukose erfolgt, hört die Milchsäurebildung gleichzeitig mit dem Glukoseverbrauch auf. Eine Steigerung der Glukosekonzentration verursacht eine Erhöhung der Milchsäurebildung. Bei der optimalen Konzentration von 12 % Glukose erreicht man als maximale Milchsäurekonzentration 29 mg/cm³. Bei weiterer Steigerung der Glukose geht die Milchsäurebildung wieder leicht zurück.

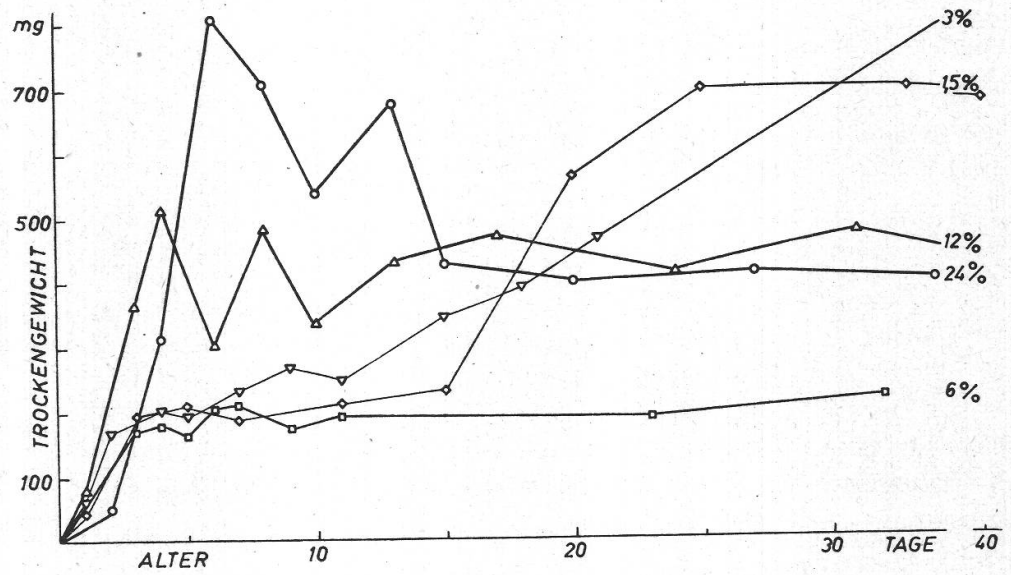
Figur 17 zeigt die Abnahme der *Glukosekonzentration* in der Kulturlösung bei verschiedener Anfangskonzentration. Der Glukoseverbrauch verläuft so, daß Mengen bis 6 % bei 30° C in 5 bis 11 Tagen völlig aufgebraucht werden; größere Mengen werden auch bei langer Kulturdauer nur teilweise abgebaut. Nun lassen sich auch die im vorhergehenden



Figur 17

Gehalt an Restglukose in der Kulturlösung
Anfangskonzentration an Glukose:

—◇— 1,5 % —▽— 3 % —□— 6 % —△— 12 %
—○— 24 %



Figur 18

Zeitlicher Verlauf des Wachstums bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

—◇— 1,5 % Glukose —▽— 3 % Glukose —□— 6 % Glukose
—△— 12 % Glukose —○— 24 % Glukose

Kapitel beschriebenen Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturen erklären: Gibt man weniger als 6% Glukose, so gerät nach einiger Zeit die Kohlenstoffquelle ins Minimum, und nach dem völligen Verbrauch der Glukose wird die vorher ausgeschiedene Milchsäure erneut in den Stoffwechsel einbezogen und weiter abgebaut. Sie stellt also für den Pilz eine Kohlenstoffreserve dar, die aber nur angegriffen wird, wenn günstigere C-Quellen (z. B. Glukose) nicht (mehr) vorhanden sind. Das durch den Milchsäureabbau ermöglichte Wachstum dauert allerdings nicht bis zum völligen Verbrauch der Säure, sondern wird schließlich durch das Aufbrauchen anderer Nährstoffe begrenzt. Gibt man 6% oder mehr Glukose, so unterbleibt der Milchsäureabbau, weil dann die Glukose nie ins Minimum gerät.

Das *Wachstum* (Figur 18) beginnt (im Gegensatz zur Milchsäurebildung) sofort nach der Impfung. Es wird ebenfalls durch die gebotene Glukosemenge beeinflußt. Daneben sind jedoch auch noch andere Faktoren wirksam. Wie früher gezeigt, kann das Wachstum bei konstanter Glukosekonzentration durch stärkere Impfung verstärkt werden. Bei den vorliegenden Versuchen wurde überall möglichst gleich stark geimpft. Trotzdem ist das Wachstum keine eindeutige Funktion der Glukosekonzentration. Durch Steigerung der Glukosemenge wird das Trockengewicht

Tabelle 6

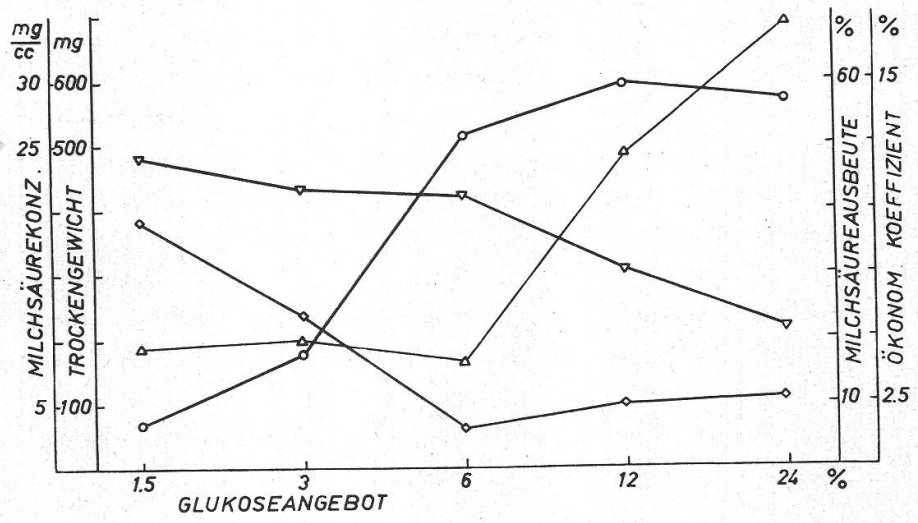
Glukoseverbrauch bis zum Abschluß des Wachstums[1]

Glukose-Angangskonzentration in der Nährlösung	1,5%[1]	3%[1]	6%	12%	24%
Tag von dem an das Trockengewicht konstant bleibt[1]	3. T.	3. T.	4. T.	4. T.	6. T.
Bis zu diesem Tag verbrauchter Prozentsatz der ursprünglichen Glukosemenge	60,6%	75%	60%	72,6%	41,4%

[1] Bei niederen Glukosekonzentrationen wird der Restzucker für die Milchsäurebildung verbraucht, anschließend findet unter Abbau der Milchsäure ein erneutes Wachstum statt, das hier aber nicht berücksichtigt wird.

erhöht; das scheint darauf hinzudeuten, daß die Glukosekonzentration in der vorliegenden Nährlösung der einzige wachstumsbegrenzende Faktor ist; andrerseits wird aber die gebotene Glukosemenge für das Wachstum gar nicht restlos ausgenützt. Tabelle 6 zeigt: Das Wachstum (bei 1,5% und 3%: die erste Wachstumsphase) wird schon eingestellt, wenn erst 60% bis 75% (bei 24% Glukose sogar erst 41%) der gebotenen Glukose verbraucht sind; der Rest wird teils für den Betriebsstoffwechsel, teils überhaupt nicht verwendet. Das Trockengewicht erreicht das Maximum schneller als die Milchsäure: Schon nach 3 bis 6 Tagen wird das Wachstum (vorläufig oder definitiv) eingestellt.

Die *Milchsäureausbeute* und der *ökonomische Koeffizient* hängen ebenfalls vom Glukoseangebot ab. Ein Vergleich von Kulturen mit verschiedener Anfangs-Glukosekonzentration an einem bestimmten Tage wäre unzulässig, weil sich dann nicht alle Kulturen im gleichen Entwicklungsstadium befinden würden. Als vergleichbarer Zeitpunkt eignet sich vielmehr der Moment kurz vor dem Aufhören des Glukoseverbrauchs; dann haben meist auch die Milchsäure und das Trockengewicht ihr Maximum erreicht. Figur 19 zeigt alle gemessenen Werte an diesem Tag als Funktion der Glukosekonzentration. Während die absolut gebildeten Milchsäuremengen bei hoher Glukosekonzentration am größten sind, zeigt die Milchsäureausbeute bei geringem Glukoseangebot maximale Werte (48,8 % bei 1,5 % Glukose), nimmt mit steigender Glukosekonzentration kontinuierlich ab und beträgt bei 24 % Glukose noch 21,4 %.



Figur 19

Stoffwechsel in Abhängigkeit vom Glukoseangebot

—○— Milchsäurekonzentration —▽— Milchsäureausbeute

—△— Trockengewicht —◇— Ökonomischer Koeffizient

Auch der ökonomische Koeffizient ist bei 1,5 % Glukose am größten (9,7 %). Mit steigender Glukosekonzentration nimmt er rasch ab, und bei mehr als 6 % Glukose ist er von der Glukosekonzentration weitgehend unabhängig.

Die Ausnützung der Glukose für die Milchsäurebildung und für das Wachstum ist bei geringer Konzentration (1,5 %) am besten. Zur Erzielung großer Milchsäuremengen sind 12 %, für großes Trockengewicht sind 24 % Glukose optimal.

Vergleich zwischen Schüttelkultur und Deckenkultur

Bei beiden Kulturarten findet das Wachstum in sehr verschiedener Form statt. In Deckenkulturen sind die Bedingungen, denen die einzelnen

Myzelteile ausgesetzt sind, sehr unterschiedlich: Der untere Teil ist in der Nährlösung untergetaucht und verfügt über weniger Sauerstoff; der obere Teil hat kaum Kontakt mit der Nährlösung, hat aber genügend Sauerstoff zur Verfügung. In Schüttelkulturen ist das Myzel dagegen sehr homogen und überall gleichen Bedingungen ausgesetzt: Alle Teile sind in die Nährlösung getaucht, doch ist durch das ständige Schütteln und durch das Fehlen einer Decke eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet. Diese beiden Faktoren sind für die Milchsäurebildung besonders wichtig. Die vorliegenden Stoffwechseluntersuchungen wurden ausschließlich in Schüttelkulturen durchgeführt. Vergleichshalber wurden aber auch Deckenkulturen angelegt.

In *Deckenkultur* wird bis zum 2. Tag nur submerses Myzel gebildet, dann beginnt die Deckenbildung. Etwa am 7. Tag füllt die Decke den ganzen Kolben aus. Die Sporenbildung war bei dieser Kultur spärlich. Dies hängt mit der Jahreszeit zusammen, in welcher der Versuch durchgeführt wurde. In den Monaten November bis Februar ist die Sporenbildung schwächer als in der übrigen Zeit des Jahres. Es konnte auch kein Mittel gefunden werden, um sie zu steigern. In den Sommermonaten findet auch im Thermostat, also bei Dunkelheit, eine stärkere Sporenbildung statt. Am 15. Tag war alle Glukose verbraucht, am 19. Tag erfolgte Sporenbildung, und gleichzeitig nahm das Gewicht ab, auch begann die Decke zu versinken. Vom 24. Tag an war sie ganz untergetaucht.

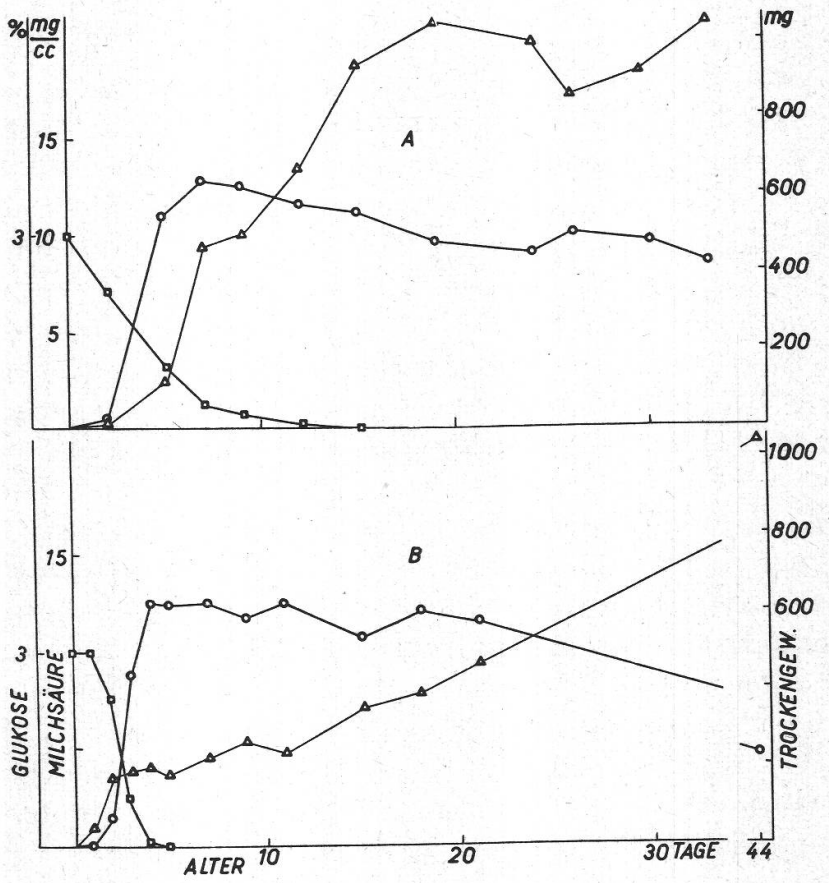
Figur 20 zeigt den zeitlichen Verlauf bei beiden Kulturarten. Das *Wachstum* ist bei Deckenkultur in den ersten 5 Tagen geringer. Dann ist eine Decke vorhanden, die einen großen Teil der Oberfläche ausfüllt. Nun wächst der Pilz viel stärker als in Schüttelkultur und erreicht nach 19 Tagen das Maximum des Gewichtes. In Schüttelkultur wächst der Pilz langsamer, aber dafür länger. Er erreicht aber nach 44 Tagen das gleiche Gewichtsmaximum (1040 mg). Man könnte ein rascheres Erreichen des Maximums in Schüttelkultur dadurch hervorrufen, daß die zehnfache Sporenmenge geimpft würde als in Deckenkultur. In diesem Falle wird das Gewichtsmaximum schon nach 25 Tagen erreicht. Sein Betrag ist aber immer ungefähr gleich; er hängt nicht von den äußeren Bedingungen, sondern von der Nährlösung ab.

Obwohl der Pilz in Deckenkultur rascher wächst, erreicht die *Milchsäure* das Maximum später (nach 7 Tagen) als in Schüttelkultur (nach 4 Tagen). Die Werte der beiden Maxima sind jedoch gleich, nämlich 12,7 mg Milchsäure pro cm^3 Nährlösung. Nach Erreichen des Maximums erfolgt die Abnahme in beiden Kulturen in ähnlicher Weise.

Die gebotene *Glukose* (3 %) wird in Deckenkultur langsamer abgebaut und ist nach 15 Tagen verbraucht, während in Schüttelkultur dafür nur 5 Tage nötig sind.

Zusammenfassend ist festzustellen: Die Quantität der gebildeten und verbrauchten Substanzen ist bei beiden Kulturarten gleich, doch sind die

benötigten Zeiten verschieden. In Deckenkultur verläuft das Wachstum rascher, die Milchsäurebildung und der Glukoseverbrauch langsamer als in Schüttelkultur.



Figur 20

Wachstum, Milchsäurebildung und Glukoseverbrauch (30° C, 3 % Glukose)

A: bei Deckenkultur *B:* bei Schüttelkultur

——△—— Trockengewicht ——○—— Milchsäure

——□—— Restglukose

Weitere Kohlenstoffquellen

Saito (1904, 1911) und Waksman and Foster (1938) geben verschiedene Kohlenstoffquellen an, die als Substrat für *Rh. chinensis* geeignet sind. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: aus den einen wird Milchsäure gebildet, aus den andern nicht. Für die Milchsäurebildung gab ich immer Glukose, deren Einfluß im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde. Es sind aber hier noch zwei andere Kohlenstoffverbindungen als Nährstoffe für Wachstum und Stoffwechsel von besonderem Interesse: Zitronensäure und Milchsäure. Die Zitronensäure wird in der Literatur nicht erwähnt, über die Milchsäure schreiben Waksman and

Foster (1938), daß sie als einzige Energiequelle für das Wachstum ungeeignet sei. Eine Untersuchung des Einflußes dieser Säuren wurde vorgenommen, weil beide in der Kulturflüssigkeit vorhanden sind, die eine von Anfang an als Puffer, die andere vom 2. Tage an als Metabolit.

Außer der Glukose, welche als Kohlenstoffquelle in der Nährlösung ist, enthält diese eine weitere C-Verbindung, nämlich die *Zitronensäure* des Zitratpuffers. Es mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß diese dem Pilz ebenfalls als Nährstoff dient und eventuell sogar als Substrat für die Milchsäurebildung in Frage kommen könnte. Wie schon gezeigt wurde, tritt dies in glukosehaltiger Nährlösung nicht ein. Zur genaueren Abklärung dieser Frage wurde *Rhizopus* in eine Nährlösung geimpft, die keine Glukose enthielt und in der sich als einzige C-Verbindung die Zitronensäure des Puffers befand. Dieser Versuch ergab: In einer Nährlösung, die als einzige C-Quelle Zitronensäure aufweist, wächst der Pilz ziemlich gut. In den ersten 12 Tagen steigt das Trockengewicht proportional dem Alter und bleibt nachher konstant auf etwa 200 mg. Die Tatsache, daß in glukosehaltigen Nährlösungen dieser Wert schon nach 4 Tagen erreicht ist, und die festgestellten Zusammenhänge zwischen Glukoseverbrauch und Wachstum und zwischen Milchsäureabbau und Wachstum lassen es als sehr wahrscheinlich erscheinen, daß dort die Zitronensäure nicht oder höchstens minim angegriffen wird. Milchsäurebestimmungen wurden in den ersten 25 Tagen alle 2 bis 3 Tage durchgeführt; während dieser ganzen Zeit wurde nie Milchsäure festgestellt. *Rh. chinensis* kann also aus Zitronensäure keine Milchsäure bilden. Es ist daher nicht möglich, daß die Zitronensäure bei der Untersuchung der Milchsäurebildung aus Glukose störend in Erscheinung tritt.

Wie früher genannte Versuche zeigen, ist *Rh. chinensis* in der Lage, nach Verbrauch der Glukose die vorher gebildete *Milchsäure* als C-Quelle zu benützen und weiter abzubauen. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob der Pilz auch wachsen kann, wenn ihm überhaupt nur Milchsäure zur Verfügung steht. Waksman and Foster (1938) verneinen dies für *Rhizopus arrhizus* oder *Rh. nodosus* und berichten, daß weder Sporen noch junge Decken irgendwie wachsen konnten, wenn Milchsäure als einzige Energiequelle gegeben wurde. Für diese Untersuchung mußte in meiner Nährlösung der Natriumzitratpuffer durch Marmor ersetzt werden, da sonst die Zitronensäure als C-Quelle benützt werden könnte. Als einzige C-Quelle wurde zur Nährlösung die im Handel käufliche Milchsäure gegeben, die wahrscheinlich aus Bakterienkulturen gewonnen wurde. In einem ersten Versuch wurden der Nährlösung verschiedene Milchsäuremengen zugesetzt, so daß die Konzentration zwischen 1 und 25 mg/cm^3 betrug; dann wurden Sporen geimpft. Der Pilz wuchs tatsächlich, doch nur sehr schwach. Meist umgab das Myzel als fetzenartiges Gebilde die Marmorstücklein; nur dort, wo durch die starke Milchsäurekonzentration aller Marmor aufgelöst worden war, bildeten sich kleine Myzelkügelchen.

Die optimale Milchsäurekonzentration war 10 mg/cm³, doch betrug das Trockengewicht nach 10 Tagen nur 21 mg. Dieser Versuch zeigt aber, daß Milchsäure als einzige C-Quelle grundsätzlich geeignet ist und daß auf diesem Substrat auch Sporen keimen und Myzel bilden können. Andrerseits erkennt man aber auch, daß dieses Milieu für die Ausbildung größerer Myzelmassen wenig günstig ist. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch keine Sporen geimpft, sondern es wurde 5 Tage altes Myzel verwendet, das in glukosehaltiger Nährlösung (3 %) mit Marmor gewachsen war. Diese Nährlösung wurde samt der bisher gebildeten Milchsäure ausgegossen, die Myzelien gespült und dann neue Nährlösung aseptisch zugegeben; sie enthielt 10,7 mg Milchsäure/cm³. Hier zeigte sich ein viel besseres Wachstum als beim vorhergehenden Versuch. Das Trockengewicht nahm in 13 Tagen um 249 mg zu und blieb dann konstant (Figur 21). Die Milchsäure nahm in der gleichen Zeit von 10,7 mg/cm³ auf 6,3 mg/cm³ ab.

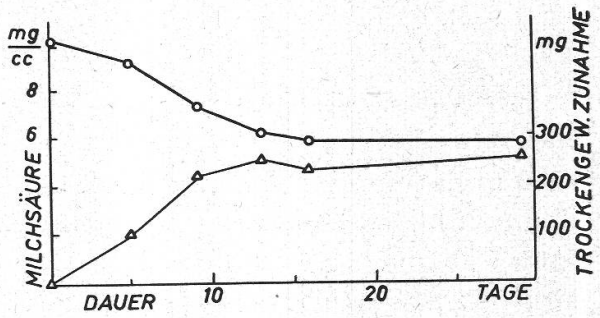
Figur 21

Wachstum mit Milchsäure als einziger C-Quelle

Der Pilz wurde zuerst 5 Tage in normaler Nährlösung (mit 3 % Glukose) gezüchtet; nachher wurde diese durch eine andere mit 10,5 mg/cm³ Milchsäure ersetzt

——△—— Trockengewichtszunahme

——○—— Milchsäure



Dies gibt für den ökonomischen Koeffizienten den Wert 28,3 %. Dieser Wert ist fast das dreifache des optimalen ökonomischen Koeffizienten beim Glukoseabbau. Die Milchsäure wird also viel besser ausgenützt als die Glukose. Nach dem Aufhören des Wachstums wurden weiter kleine Milchsäuremengen für den Betriebsstoffwechsel verwendet. Die Milchsäure ist also als C-Quelle für den Bau- und Betriebsstoffwechsel verwendbar.

Ausnützung der Glukose im Betriebsstoffwechsel

Nach Gleichung (2) können bei der heterofermentativen Milchsäuregärung unter aeroben Verhältnissen aus 2 Molekülen Glukose 3 Moleküle Milchsäure entstehen; dies bedeutet eine Ausbeute von 75 %. Im Abschnitt über den Einfluß der Glukosekonzentration wurde gezeigt, daß bei den üblichen Kulturen die maximal erreichte Ausbeute 48,8 % betrug. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß ein Teil der Glukose für die Bildung des Myzels verwendet wird.

Es ist möglich, eine größere Milchsäureausbeute zu erhalten, indem man den Baustoffwechsel ausschaltet und den Betriebsstoffwechsel allein be-

trachtet. Zu diesem Zweck wird bei einer ausgewachsenen (10 Tage alten) Kultur die Nährlösung samt der gebildeten Milchsäure entfernt und aseptisch durch eine neue Nährlösung ersetzt, die keine Stickstoffverbindungen enthält; dadurch wird weiteres Wachstum verhindert. Dann bringt man die Kultur auf die für die Milchsäurebildung optimale Temperatur (25° C). Solange Glukose vorhanden ist, wird sie nun im reinen Betriebsstoffwechsel zu Milchsäure abgebaut (Tabelle 7). Dieser Abbau verläuft in den

Tabelle 7

Glukoseabbau im reinen Betriebsstoffwechsel (Myzelwachstum verhindert)

Dauer (Tage)	Milchsäure-bildung (mg)	Glukosever-brauch (mg)	Milchsäure-ausbeute (%)
1	744	1780	57,2
2	2200	2600	69,4
4	5820	7560	77,0
8	6720	9520	70,5
16	7140	9740	73,5

Mittelwerte aus je drei Kulturen bei 25° C.

ersten Tagen ziemlich rasch, verlangsamt sich aber nach 8 Tagen, weil dann rund 90% der Glukose abgebaut sind. Der Mittelwert für 1 Tag ist etwas abweichend, möglicherweise weil wegen der geringen gemessenen Mengen der relative Fehler der Messungen ziemlich groß ist. Zwischen den Ausbeuten an den andern Tagen bestehen keine signifikanten Differenzen. Der Durchschnitt dieser vier Mittelwerte beträgt 72,6% ($\sigma = 3{,}4\%$). Dieser experimentell gewonnene Wert unterscheidet sich nicht wesentlich vom theoretischen Wert 75%. Während also beim Gesamtstoffwechsel die Milchsäureausbeute je nach den Bedingungen 21,4% bis 48,8% beträgt, erreicht sie bei Ausschaltung des Baustoffwechsels im reinen Betriebsstoffwechsel unter optimalen Bedingungen den Wert 72,6%. Dieser ändert sich im Laufe der Kulturdauer nicht wesentlich.

Nachdem sich gezeigt hat, daß die Milchsäureausbeute von der Kulturdauer unabhängig ist, genügt für die Feststellung des *Temperatureinflusses* die Untersuchung einer Anzahl gleichaltriger Kulturen (Tabelle 8). Bei Glukoseverbrauch und Milchsäurebildung besteht eine starke Temperaturabhängigkeit, während die Ausbeute bei allen Temperaturen ungefähr gleich ist. Die Temperatur beeinflußt also die Quantität der Stoffwechselprodukte, läßt aber die Qualität der Milchsäuregärung unverändert. Der Durchschnitt der drei Mittelwerte für die Ausbeute beträgt 75,4% und liegt also sehr nahe am theoretischen Wert 75%.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Betrachtet man nur den Betriebsstoffwechsel, so erkennt man bei Glukoseverbrauch und Milchsäurebildung je nach den Bedingungen große Unterschiede, doch beträgt die

Tabelle 8

Glukoseabbau im reinen Betriebsstoffwechsel bei verschiedenen Temperaturen
Versuchsperiode: 4 Tage

Temperatur (° C)	Milchsäure-bildung (mg)	Glukosever-brauch (mg)	Milchsäure-ausbeute (%)	
			Mittel	σ
10°	1036	1320	77,6	15,8
25°	5820	7560	77,0	0,5
40°	2720	3820	71,6	7,0

Milchsäureausbeute jederzeit und bei jeder Temperatur rund 75%. Der Glukoseabbau im Betriebsstoffwechsel verläuft also auch bei *Rhizopus chinensis* in der durch Foster (1949) dargestellten Weise: Aus zwei Glukosemolekülen entstehen drei Milchsäuremoleküle (Gleichung 2), und zwar unabhängig von den äußeren Bedingungen.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

1. In Schüttelkulturen von *Rhizopus chinensis* Saito werden Milchsäurebildung, Wachstum und Glukoseverbrauch während der ganzen Kulturdauer (10 bis 40 Tage) bestimmt.
2. Die Milchsäurebestimmung erfolgt nach der Mikromethode von Lang und Pfleger mit einem mittleren Fehler von maximal 4,4%.
3. Bei spärlicher Glukoseversorgung (weniger als 6%) wird die vorhandene Glukose in erster Linie für das Wachstum verwendet, während die Milchsäurebildung gering bleibt. Wird das Wachstum jedoch durch schwache Impfung zurückgedämmt, so wird mehr Glukose für die Milchsäurebildung verwendet. Kleine Myzelien bilden daher relativ und absolut mehr Milchsäure als große.
4. Die Lage der Kardinalpunkte der Temperatur für das Wachstum ist keine rein konstitutionelle Eigenschaft des Pilzes, sondern wird durch die Kulturbedingungen mitbestimmt. Unter den vorliegenden Bedingungen betragen für das Wachstum: das Minimum 6° bis 9° C, das Optimum 40° C und das Maximum 42° bis 44° C.
5. Minimum und Maximum für die Milchsäurebildung sind dieselben wie für das Wachstum; das Optimum liegt jedoch bei 25° C.
6. Maximaler Glukoseverbrauch findet bei 25° bis 30° C statt. Hier tritt eine maximale Milchsäureausbeute und ein minimaler ökonomischer Koeffizient auf. Diese Temperaturen begünstigen die Milchsäurebildung auf Kosten des Wachstums.
7. Für die Milchsäurebildung ist *p*H 5,2 bis 5,8 optimal.

8. Wünscht man Kugelmyzel, so ist für die Abstumpfung der gebildeten Milchsäure Natriumzitratpuffer am besten geeignet; verwendet man Marmor, so wird faseriges Myzel gebildet.
9. Gibt man Natriumzitrat als Puffer, so hat das Zink im Bereich des normalen Wachstums keinen Einfluß auf den Stoffwechsel. Gibt man jedoch Phosphatpuffer, so bewirkt die Zugabe von Zink eine Erhöhung des Trockengewichts und des Glukoseverbrauchs sowie eine Herabsetzung der Milchsäurebildung und -ausbeute, beeinflußt aber den ökonomischen Koeffizienten nicht. Die zur Bildung einer Einheit Zellsubstanz nötige Glukosemenge ist also von der Anwesenheit des Zinks unabhängig; dagegen wird beim Fehlen von Zink aus einer Einheit Glukose die 4- bis 5fache Milchsäuremenge gebildet wie bei dessen Anwesenheit.
10. Wird weniger als 3% Glukose geboten, so wird nach ihrem Verbrauch die vorher gebildete Milchsäure als Energiequelle in den Stoffwechsel einbezogen und weiter abgebaut. Gibt man mehr als 6% Glukose, so wird diese nicht mehr vollständig abgebaut.
11. Bei geringen Glukosekonzentrationen (1,5%) sind Milchsäureausbeute und ökonomischer Koeffizient am größten. Für die Bildung großer Milchsäuremengen sind unter den gewählten Bedingungen 12%, für viel Trockengewicht 24% Glukose optimal.
12. In Deckenkultur werden gleiche Quantitäten Milchsäure und Trokkenmasse gebildet wie in Schüttelkultur, doch verlaufen in Deckenkultur Glukoseabbau und Milchsäurebildung langsamer, das Wachstum rascher.
13. Zitronensäure allein ist als Kohlenstoffquelle für das Wachstum geeignet, doch wird daraus keine Milchsäure gebildet.
14. Gibt man die im Handel käufliche Milchsäure als alleinige Kohlenstoffquelle, so wird diese sowohl im Bau- als auch im Betriebsstoffwechsel verwendet, besonders wenn man junge Myzelien benützt, die vorher in glukosehaltiger Nährlösung gewachsen sind. Der ökonomische Koeffizient ist beim Milchsäureabbau mindestens dreimal so groß wie beim Glukoseabbau.
15. Milchsäure wird im Gesamt- wie auch im reinen Betriebsstoffwechsel gebildet.
16. Während im reinen Betriebsstoffwechsel *Glukoseverbrauch* und *Milchsäurebildung* je nach Kulturdauer und Temperatur sehr variieren, ist die *Milchsäureausbeute* zeitlich konstant und von der Temperatur unabhängig.
17. Beim Gesamtstoffwechsel überschreitet die Milchsäureausbeute 50% nicht; im reinen Betriebsstoffwechsel erreicht sie unter optimalen Bedingungen 75%, d. h. aus 2 Glukosemolekülen entstehen 3 Milchsäuremoleküle, wie Gleichung (2), S. 65, besagt.

Die vorliegende Arbeit entstand im *Botanischen Institut der Universität Basel* auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber. Ich möchte ihm an dieser Stelle dafür danken, daß er meine Arbeit stets mit Interesse verfolgt und mir die Mittel des Instituts in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt hat.

Da ich diese Untersuchungen neben meiner Tätigkeit als Lehrer ausführte, stand mir nur eine beschränkte Arbeitszeit zur Verfügung. Ich bin daher Herrn Prof. Geiger-Huber zu besonderem Dank verpflichtet, daß er mir Laborantinnen zur Mithilfe bei Serienversuchen zur Verfügung gestellt hat, so daß die Arbeit innert nützlicher Frist beendet werden konnte. Den Laborantinnen Frl. I. Siefert, H. Lehmann, H. Hofstetter und E. Rudin danke ich für ihre Mitarbeit. Ebenso danke ich dem Techniker des Instituts, Herrn H. Müller, für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Zitierte Literatur

Bamann, E., und Myrbäck, K., 1941. Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig.

Bernhauer, K., Rauch, J., und Miksch, J. N., 1950. Über die Säurebildung durch Rhizopusarten. Biochem. Ztschr., **320**, 178–188.

Biological abstracts, **16**, 1942; **26**, 1952; **27**, 1953. Menasha.

Carson, S. F., Foster, J.W., Jefferson, W.E., Phares, E.F., Anthony, D.S., 1951. Oxidative Formation of Lactic Acid by a Fungus. Arch. Biochem. Biophys., **33**, 448–458.

Diemair, W., Riffart, H., Mollenkopf, K., 1940. Die stufenphotometrische Bestimmung von Milchsäure und Glycerin in Wein. Ztschr. analyt. Chem., **119**, 189–201.

Fisher, R.A., 1946. Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh.

Foster, J.W., 1949. Chemical Activities of Fungi, 282–295. New York.

Fuchs, H.J., 1930. Einige Verbesserungen der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung nach Mendel-Goldscheider. Biochem. Ztschr., **217**, 405–408.

Gibbs, M., and Gastel, R., 1953. Glucose dissimilation by Rhizopus. Arch. Biochem. Biophys., **43**, 33–38.

Haehn, H., 1952. Biochemie der Gärungen, 412–422. Berlin.

Hansen, A., und Riesser, O., 1932. Zur Methodik der Milchsäurebestimmung im Muskel nach Mendel-Goldscheider. Biochem. Ztschr., **246**, 470–481.

Hinsberg, K., und Lang, K., 1951. Medizinische Chemie, 2. Aufl., 116–117. München.

Kitahara, K., and Fukui, S., 1951. The lactic acid formation by Rhizopus group, Part III. J. Ferment. Technol., **28**, 7–10.

Klein, G., 1932. Handbuch der Pflanzenanalyse, **2**. Wien.

Kluyver, A.J., and Donker, H.J.L., 1925. The unity in the chemistry of the fermentative sugar dissimilation process of microbes. Proc. Acad. Sci. Amsterdam, **28**, 297 bis 313.

— und Perquin, L.H.C., 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchungen. Biochem. Ztschr., **266**, 68–81.

Lang, K., 1939. Eine einfache Destillationsapparatur für die chemische Mikromethodik. Klin. Wochenschr., **18**[I], 913.

— und Pfleger, K., 1951. Zur Mikrobestimmung der Milchsäure. Mikrochemie, **36/37**, 1174–1176.

Lilly, V.G., and Barnett, H.L., 1951. Physiology of the fungi. New York.

Linder, A., 1951. Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure. Basel.

Lockwood, L.B., Ward, G.E., and May, O.E., 1936. The physiology of Rhizopus oryzae. J. agr. Res., **53**, 849–857.

Mauer, H., 1948/49. Die stufenphotometrische Bestimmung der Milchsäure. Biochem. Ztschr., **319**, 533–560.

Meder, H., 1952. Über die Bedingungen der Bildung von Fumarsäure als Endprodukt des Stoffwechsels bei Rhizopus-Arten. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **62**, 164–204 (Diss. Basel).

Mendel, B., 1928. Zur Methode der kolorimetrischen Milchsäurebestimmung. Biochem. Ztschr., **202**, 390.

— und Goldscheider, I., 1925. Eine kolorimetrische Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure im Blut. Biochem. Ztschr., **164**, 163–174.

Oppenheimer, C., und Pincussen, L., 1929. Die Methodik der Fermente. 1256 bis 1278. Leipzig.

Orla-Jensen, S., 1919. The lactic acid bacteria. D. kgl. Danske Videnskab. Selsk. Skrifter, Afd. 8, Raekke V. 2, 79–197.

Paech, K., und Tracey, M.V., 1955. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, **2**, 492. Berlin.

Pfeffer, W., 1895. Über Election organischer Nährstoffe. Jahrb. wiss. Bot., **28**, 205–268.

Saito, K., 1904. Eine neue Art der «Chinesischen Hefe». Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **13**, 153–161.

— 1911. Ein Beispiel von Milchsäurebildung durch Schimmelpilze. Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **29**, 289–290.

Sakaguchi, K., Asai, T., and Munekata, H., 1941. Studies on the Acid Fermentation by Rhizopus Species. J. Agric. Chem. Soc. Japan, **17**, 19–22.

— — — 1942. On the Chemistry of the Acid Fermentation by Rhizopus Species. Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **105**, 161–165.

— Takahashi, H., and Kataoka, J., 1951. The Acid Fermentation of Rhizopus Species. J. Agric. Chem. Soc. Japan, **25**, 180–185.

Schoch, H., 1958. Über geschlechtsbedingte Unterschiede im Wachstum und Fumarsäurestoffwechsel von Rhizopus-Arten. Diss. Basel (im Druck).

Takahashi, T., and Sakaguchi, K., 1925. J. Agric. Chem. Soc. Japan, **1**, 46.

Vöchting, A., 1953. Über die Zinkaufnahme von Zea Mays L. und Aspergillus niger v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **63**, 103–161 (Diss. Basel).

Waksman, S., and Foster, J.W., 1938. Respiration and Lactic Acid Production by a Fungus of the Genus Rhizopus. J. agric. Res., **57**, 873–899.

— and Hutchings, I.J., 1937. Lactic Acid Production by Species of Rhizopus. J. Am. Chem. Soc., **59**, 545–547.

Ward, G.E., Lockwood, L.B., May, O.E., Herrick, H.T., 1936. Biochemical Studies in the Genus Rhizopus. J. Am. Chem. Soc., **58**^{II}, 1286–1288.

— Lockwood, L.B., Tabenkin, B., and Wells, P.A., 1938. Rapid Fermentation Process for Dextrolactic Acid. Ind. Eng. Chem., **30**, 1233–1235.

Weimer, J.L., and Harter, L.L., 1923. Temperature relations of eleven species of Rhizopus. J. agric. Res., **24**, 1–40.