

Beiträge zum Problem der Aufnahme und Assimilation von Nitrat durch *Aspergillus niger*

Autor(en): **Peter, Madeleine**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **66 (1956)**

PDF erstellt am: **15.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-46619>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Beiträge zum Problem der Aufnahme und Assimilation von Nitrat durch *Aspergillus niger*

Von *Madeleine Peter*

(Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich)

Eingegangen am 10. August 1956

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung und Begründung der Problemstellung	278
II. Methoden	279
1. Die Nährlösung und die Kulturmethode	279
2. Analytische Methoden	280
a) Gewinnung der Kulturfiltrate	280
b) Extraktion der Mycelien	280
c) Nitratbestimmung	280
1. Gravimetrisch	280
aa) Theoretische Nitratmenge	280
bb) Gravimetrisch gemessener Nitratgehalt	281
2. Kolorimetrisch	281
d) Ammoniakbestimmung	281
e) Papierchromatographie der organischen Säuren	281
f) Papierchromatographie der Zucker	282
III. Die pH-Abhängigkeit der Nitratassimilation und die Frage der Nitrat- speicherung	283
1. Literaturübersicht	283
2. Eigene Versuche	284
a) Zeitlicher Verlauf der Nitrataufnahme und -assimilation	284
b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	285
c) Nitratabgabe in die Nährlösung	286
3. Diskussion	288
IV. Die Bildung von Gluconsäure und ihre Abhängigkeit von der Nitrat- assimilation	290
1. Literaturübersicht	290
2. Nachweis der Bildung von Gluconsäure	292
3. Diskussion	294
V. Die Beeinflussung der Nitrat- und Ammoniumaufnahme durch organische Säuren	296
1. Literaturübersicht	296
2. Einfluß der Zugabe organischer Säuren auf die Gluconsäureproduktion	298
3. Einfluß der Zugabe organischer Säuren auf Wachstum, Ammon- und Nitratabsorption	299
4. Diskussion	301
VI. Zusammenfassung	304
VII. Literaturverzeichnis	316

I. Einleitung und Begründung der Problemstellung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der *Aufnahme und Assimilation* von Nitrat durch *Aspergillus niger*. Obwohl diese besonders wichtigen Teilvorgänge des natürlichen Stickstoffkreislaufes schon vielfach Gegenstand von Untersuchungen waren, können wir uns noch in keiner Weise ein abgeschlossenes Bild davon machen (siehe z. B. *Burström*, 1945; *Virtanen*, 1952). Von vornherein ist es angesichts der weiten Verbreitung der Fähigkeit zur Aufnahme und Verarbeitung von Nitrat bei höheren Pflanzen und Mikroorganismen unwahrscheinlich, daß die Abhängigkeit dieser Prozesse von inneren und äußeren Faktoren überall gleichartig sei. Was die Nitrat-Absorption betrifft, scheint jedoch festzustehen, daß sie allgemein stark abhängig ist von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung. Die Art dieser Abhängigkeit deckt sich mit derjenigen für andere Anionen. Über die Ursache der pH-Abhängigkeit der Nitrataufnahme bestehen jedoch verschiedene Ansichten (siehe Einleitung zu Kapitel III).

Eine nochmalige Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Nitratabsorption unter Berücksichtigung einer möglichen Speicherung des Nitrates erschien deshalb als Beitrag zur Klärung der Verhältnisse wünschenswert.

Im Zusammenhang mit diesem Problem untersuchten wir noch die Abhängigkeit der Nitrat- und Ammonium-Absorption vom Gehalt der Lösung an organischen Säuren. Ausgangspunkt waren die Beobachtungen von *Leonian* und *Lilly* (1940) und von *Burkholder* und *McVeigh* (1940), wonach die einfachen organischen Säuren vorzugsweise die Nitratabsorption fördern sollten. Da diese Autoren jedoch hauptsächlich die freien Säuren benützten, bestand die Möglichkeit, daß die Resultate nicht so sehr auf einer spezifischen Wirkung der organischen Säuren auf den Aufnahme- bzw. Assimilationsvorgang beruhten, sondern vielmehr eine Folge der niederen Wasserstoffionenkonzentration waren. Unter Verwendung der Salze der organischen Säuren und zum Teil gepufferter Lösungen wurde auch dieses Problem noch einmal bearbeitet und, wie wir glauben, eindeutig im Sinne einer tatsächlich vorhandenen spezifischen Wirkung der organischen Säuren entschieden.

Die zusätzlich erfolgte papierchromatographische Untersuchung der Veränderung des Kulturmediums bezüglich des Gehaltes an organischen Säuren gestattete ferner einen überraschend regelmäßigen Zusammenhang zwischen der Nitratassimilation und der Art der Glucoseoxydation festzustellen.

Im Gegensatz zu den von andern Autoren, unter Verwendung von Deckenkulturen durchgeführten Untersuchungen haben wir zur Erreichung gleichmäßiger aerober Verhältnisse alle Versuche in *Schüttelkultur* durchgeführt.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden am Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Hans W a n n e r, der meine Arbeit mit stetem Interesse verfolgte und leitete, bin ich für seine wertvolle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

II. Methoden

1. Die Nährlösung und die Kulturmethode

Die Kulturflüssigkeit enthielt folgende Substanzen in 1 Liter Lösung:

a) <i>Nitratkulturen:</i>	Glucose	50 g
	KH ₂ PO ₄ (Puriss.)	0,136 g
	K ₂ HPO ₄ (Puriss.)	0,174 g
	MgSO ₄ (pro anal.)	0,123 g
	KNO ₃ (Puriss.)	2,02 g

(pH zirka 4,5)

b) <i>Ammoniumkulturen:</i>	Glucose	50 g
	KH ₂ PO ₄ (Puriss.)	0,136 g
	K ₂ HPO ₄ (Puriss.)	0,174 g
	MgSO ₄ (pro anal.)	0,123 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32 g

(pH zirka 6)

Um eine gleiche Stickstoffmenge in den Nitrat- und Ammoniumkulturen zu erhalten, wurde der Nährlösung $\frac{2}{100}$ des Molgewichtes von Kaliumnitrat und $\frac{1}{100}$ des Molgewichtes von Ammoniumsulfat beigegeben. Für die Untersuchungen wurde ein Stamm von *Aspergillus niger* verwendet, der im Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich isoliert worden ist.

Das für alle Versuche verwendete Schüttelmycel wurde im wesentlichen nach der Methode von Kluyver (K l u y v e r und P e r q u i n, 1933) hergestellt. Der Pilz wurde in Reagenströhrchen auf 10 ml Gerstenschrotagar bei einer Temperatur von 25° gezogen. Nach Ablauf von zirka 10 Tagen hatte die Sporenbildung zu einer einheitlichen Schwarzfärbung der Substratoberfläche geführt. Nun wurden diese Sporen mit 10 ml destilliertem, sterilem Wasser, das einen Zusatz von 1 bis 2 Tropfen Lissin enthielt, ausgewaschen. Lissin (Geigy, Basel) ist ein Polyoxymethylen-derivat, das die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzt. Dadurch wird es möglich, die Sporen homogen zu verteilen, was im Wasser allein unmöglich ist, da die Sporen schlecht benetzbar sind. Die Sporendichte des Inokulates betrug 8 bis $10 \cdot 10^7$ Zellen/cm³. Diese Sporensuspension wurde in 100 ml Bierwürze von 18° Balling geimpft und bei einer Temperatur von 30° C 24 Stunden lang in Schüttelkultur (Schüttelfrequenz 95/min.) vorkultiviert. Danach wurden die entstandenen Mycelkügelchen (Durchmesser zirka 1 mm) gewaschen und in 200 ml Wasser aufge-

schwemmt. Die Aufschwemmung wurde in Portionen von 10 ml in 500-ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Versuchslösung eingimpft und wieder in Schüttelkultur bei 30° weitergezüchtet.

2. Analytische Methoden

a) Gewinnung der Kulturfiltrate

Nach beendeter Kultur wurden die Mycelien mittels Jenaer Glasfiltertiegel Nr. 2 abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden sie im Trockenschrank bei einer Temperatur von 100 bis 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Bestimmung der *Wasserstoffionenkonzentration* erfolgte mit der Glaselektrode. Zur Ermittlung der *Nitratabsorption* wurde die Nitratmenge im Filtrat gravimetrisch gemessen und vom Nitratgehalt der Nährlösung bei Kulturbeginn subtrahiert. Die Nitratspeicherung wurde durch Extraktion der Mycelien und Ermittlung des Nitratgehaltes des Extraktes bestimmt.

b) Extraktion der Mycelien

Die gewaschenen Mycelien wurden während 5 Minuten in 40 ml destilliertem Wasser ausgekocht, dann durch Jenaer Glasfiltertiegel Nr. 2 abfiltriert, gewaschen und das Filtrat auf 50 ml aufgefüllt. Der Nitratgehalt dieser Extraktfiltrate konnte nicht gravimetrisch ermittelt werden, da er dafür stets zu klein war. Es wurde deshalb eine kolorimetrische Methode angewendet.

Die assimilierte Nitratmenge errechnete sich aus der Differenz zwischen der Menge des absorbierten Nitrates und des im Mycel gefundenen Nitrates.

c) Nitratbestimmung

1. *Gravimetrisch*: Dabei wurde folgende, dem «British Drug-House Book of Organic Reactions (1946)» entnommene Vorschrift angewendet:

Das Reagens war eine 10prozentige Lösung von Nitron (1,4-Diphenyl-3,5-endanilo-4,5-dihydro-1,2,4-triazolin) in 1 n Essigsäure. 5 ml Kulturfiltrat wurden erhitzt bis fast zum Siedepunkt und dann 1 ml Reagens beigegeben. Das Gemisch wurde im Eis während mindestens 2 Stunden gekühlt. Danach wurde der Niederschlag in einem Jenaer Glasfiltertiegel Nr. 4 gesammelt, mit wenig gesättigter wäßriger Lösung von Nitron-Nitrat gewaschen und bei 110° im Trockenschrank getrocknet. Der Niederschlag enthält 16,53 % Nitrat.

Die Genauigkeit dieser Methode sei durch folgenden Leerversuch illustriert:

aa) Theoretische Nitratmenge:

bei Beigabe von 2 ml 1 n KNO_3 in 100 ml Nährlösung = 124 mg NO_3 .

bb) Gravimetrisch gemessener Nitratgehalt:

3 Parallelproben von 5 ml Nährlösung wurden wie oben beschrieben auf ihren Nitratgehalt analysiert.

Gefundene Menge Nitronnitrat:	37,1 mg
	37,0 mg
	37,3 mg
	<hr/>
Mittel	37,13 mg
Nitrat (16,53 ‰)	6,14 mg
Nitrat in 100 ml =	123 mg

2. *Kolorimetrisch*: Man gab je 5 ml der zu untersuchenden Lösung sowie 5 ml von 0,01—0,001 *n* KNO₃-Testlösungen in Porzellanschalen mit einem Zusatz von 1 bis 2 Tropfen KOH (1 ‰) und ließ die Flüssigkeit über einem Wasserbad bis auf zirka 1 ml verdunsten. Dann wurde Wasserstoffsperoxyd beigegeben und mit destilliertem Wasser verdünnt und wieder eingedampft. Dieses Verfahren wurde, falls nötig, wiederholt, bis der Rückstand nicht mehr braun war. Nach gründlichem Abkühlen wurde mit 3 ml Phenoldisulfonsäurereagens nitriert und das Gemisch mit destilliertem Wasser in 50-ml-Kölbchen gespült. Ein Überschuß an Ammoniak wurde zugegeben (1 Teil NH₄OH + 2 Teile H₂O), bis die Gelbfärbung erschien, und dann bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die abgekühlte Lösung wurde mit einem Blaufilter kolorimetriert. Zur Verwendung kam ein Hilger-Spekter-Kolorimeter. Im benützten Konzentrationsbereich war der Ausschlag des Instrumentes eine lineare Funktion der Nitratkonzentration (siehe Figur 1).

d) Ammoniakbestimmung

Die große Zahl der durchzuführenden Analysen ließ auch hier eine kolorimetrische Methode als vorteilhaft erscheinen. Leider war die direkte Nesslerisierung der Versuchslösungen infolge ihres Zuckergehaltes unmöglich. Deshalb wurde aus den Ammonsalzlösungen das Ammoniak durch Alkalisieren freigesetzt und in einer Apparatur nach Parnas-Wagner abdestilliert (Pregl-Roth, 1935). Mit 5 ‰ Natronlauge wurde gegen Methylrot neutralisiert und mit Nessler's Reagens versetzt. Nach 10 Minuten wurde kolorimetriert. Auch hier besteht eine Linearität zwischen Ammonkonzentration und Skalenteilen. Die Differenz zwischen dem Anfangs- und Endgehalt entspricht der Absorption der Ammoniumionen.

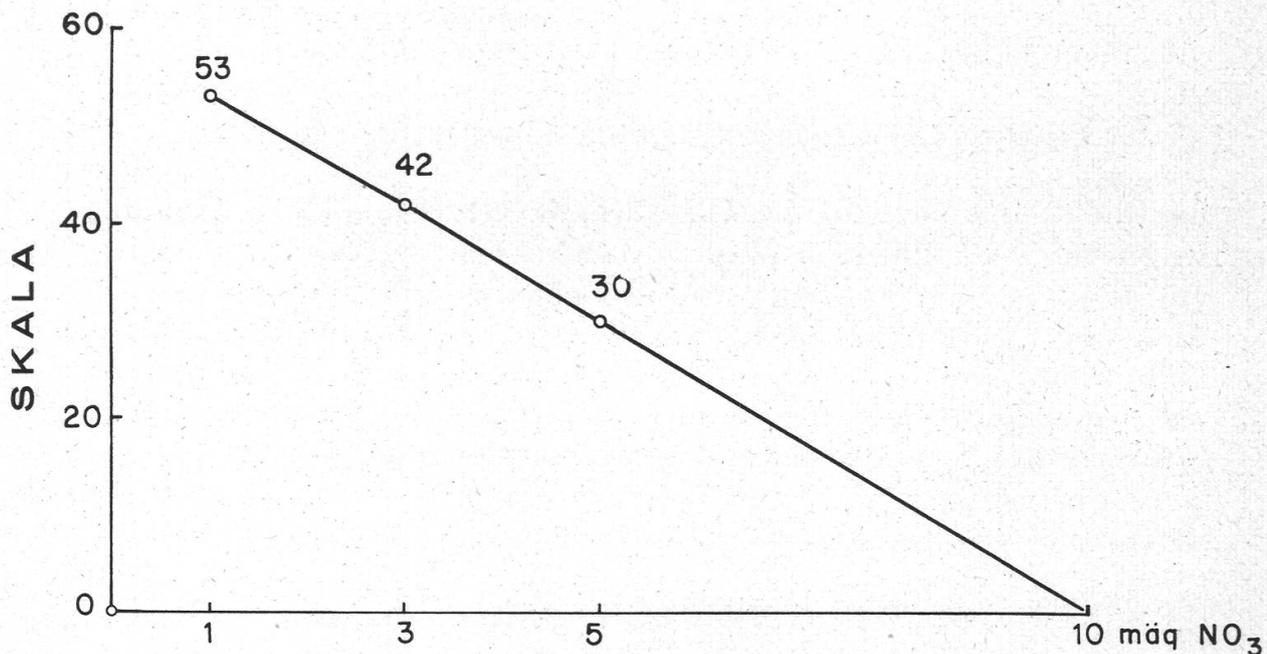
e) Papierchromatographie der organischen Säuren

Der qualitative Nachweis des Verbrauches und der Produktion organischer Säuren geschah in folgender Weise: Geringe Mengen Versuchslösung (10 bis 25 µl) wurden auf Filtrierpapier mittels einer Pipette aufgetragen und zur Vermeidung sekundärer Umsetzungen im kalten

Luftstrom getrocknet. Die Chromatogramme wurden nach einer kurzen Äquilibrierungszeit (zirka $\frac{1}{2}$ Stunde) in die Lösungsmittel getaucht (absteigende Chromatographie).

Als Lösungsmittel verwendeten wir:

- a) ein Gemisch von 80 Teilen Äthanol (96 %), 4 Teilen Ammoniak konz. und 16 Teilen Wasser;
- b) nach dem Verfahren von L ö f f l e r und R e i c h l (1953) eine Mischung von 30 Teilen Essigester, 10 Teilen Eisessig und 10 Teilen Wasser. Nach einer Laufzeit von 24 Stunden wurden die Chromatogramme getrocknet und die Säuren auf folgende Art nachgewiesen:



Figur 1

Kolorimetrische Bestimmung der Nitratkonzentration einer Lösung

- aa) durch Besprühen des Papiers mit einer Indikatorlösung (Bromkresolgrün);
- bb) nach L ö f f l e r und R e i c h l (1953), indem das Papier zuerst mit einer Lösung von $0,1\ n\ \text{AgNO}_3$ besprüht, dann getrocknet und darauf mit einer Lösung aus gleichen Teilen wassergesättigtem Phenol und $0,05\ n\ \text{NaOH}$ besprüht wurde. Die so behandelten Chromatogramme zeigten nach schwachem Erwärmen auf orange-ockerfarbigem Grunde dunkle, gut abgegrenzte Säureflecken.

f) Papierchromatographie der Zucker

Der qualitative Nachweis des Zuckerverbrauches geschah in folgender Weise:

Als Lösungsmittel kam eine Mischung aus 40 Teilen Butanol, 10 Teilen Eisessig und 50 Teilen Wasser zur Verwendung. Die Zuckerflecke der Chromatogramme wurden dann mit Anilinphthalat entwickelt (Cramer, 1953).

III. Die pH-Abhängigkeit der Nitratassimilation und die Frage der Nitratspeicherung

1. Literaturübersicht

Die bisher untersuchten Stämme von *Aspergillus niger* waren alle imstande, sowohl Nitrate als auch Ammoniumsalze als Stickstoffquellen zu verwenden. Vor allem bei gemischter Darbietung als NH_4NO_3 zeigte sich jedoch deutlich eine Bevorzugung des Ammoniumstickstoffes: Dieser wird im allgemeinen zuerst vollständig verbraucht, bevor Nitrat aufgenommen wird. Die Wasserstoffionenkonzentration scheint dabei einen bedeutenden Einfluß zu haben. Die selektive Nitrataufnahme durch *Aspergillus* aus ammonitriathaltiger Nährlösung geschieht vornehmlich bei hoher Wasserstoffionenkonzentration (Bach und Desbordes, 1933). Als Erklärung dafür wurde die pH-Wirkung sowohl auf die Nitratreduktion als auch auf die Absorption selbst angegeben. Die Ansicht, daß sich die Nitratreduktion bereits im Außenmedium abspiele und das Optimum der Reduktion dementsprechend im sauren Bereich liegen müsse (Klein, Eigner und Müller, 1926), gründete einerseits auf der Tatsache, daß sich die Reduktion von Nitrat zu Nitrit in vitro abspielen könne, andererseits darauf, daß im Medium eine Akkumulation von Produkten der Reduktion und Assimilation festgestellt werden konnte. Demgegenüber hat Itzerott (1936) bei *Aspergillus niger* ein Optimum der extrazellulären Nitratreduktion im schwach alkalischen Bereich festgestellt, was sich auch mit den Befunden an höheren Pflanzen deckt. Burström (1945) glaubt, daß die im Medium gefundenen Reduktionsprodukte durch Exosmose aus der Zelle stammen können.

Mehr Wahrscheinlichkeit hat die Annahme, daß die Wasserstoffionenkonzentration einer Lösung die Nitrataufnahme selbst beeinflussen könne. Die Plasmagrenzschichten, die für den Stoffeintritt in die Zelle entscheidend sind, können als Kolloidelektrolyte aufgefaßt werden. Durch Variation der Wasserstoffionenkonzentration der umgebenden Lösung wird eine Änderung ihres Ladungssinns hervorgerufen. In saurer Lösung bzw. in einer Lösung, deren pH niedriger ist als der isoelektrische Punkt, wird die Dissoziation der sauren Gruppen zurückgedrängt. Die Plasmagrenzschichten reagieren dann wie eine Base, weshalb Anionen leichter angelagert und aufgenommen werden können. In basischer Lösung verhalten sich die Grenzschichten umgekehrt.

Rippel (1931) hat in seinen Versuchen den kritischen Punkt der Nitratabsorption mit dem isoelektrischen Punkt der Grenzschichten

identifiziert und unterstützt die Ansicht, daß es sich bei der Nitrataufnahme, wie bei der Salzaufnahme überhaupt, um eine Ionenabsorption handelt. Itzerott (l. c.) beobachtete bei Erhöhung des pH in Kaliumnitratkulturen das Wiederaustreten von Nitrat aus der Zelle. Dies scheint der Auffassung von der Bedeutung der H-Ionenkonzentration für die Nitratpermeabilität zu widersprechen und deutet auf eine Speicherung im Mycel hin. Auch Büning (1936) erklärt die pH-Abhängigkeit der Aufnahme von sauren und basischen Farbstoffen mit einer Beeinflussung des *Adsorptions*vermögens der Zellkolloide. Nach ihm wirke die hohe Wasserstoffionenkonzentration nicht etwa auf die Nitratpermeabilität, sondern vor allem auf das *Speicherungsvermögen* der Plasmakolloide.

Diese Autoren und andere (Pirschle, 1931; Rennerfeld, 1934) sind der Meinung, daß die Salze als undissoziierte Moleküle oder Ionenpaare, also in neutraler Form, in die Zelle aufgenommen werden und nicht in Form freier Ionen.

Gegen die Versuche von Itzerott hat Foster (1948) eingewendet, daß die ausgetretenen Nitratmengen nur gering waren und möglicherweise aus Degenerationsprozessen der 8 bis 12 Tage alten Kulturen stammten. Auch de Boer (1940) fand keine Nitratspeicherung in den von ihm untersuchten Mycelien.

Diese uneinheitlichen Versuchsergebnisse haben uns veranlaßt, Nitratabsorption und -assimilation bei verschiedenem pH der Lösung zu verfolgen und besonders auf eine eventuelle Nitratspeicherung zu achten.

2. Eigene Versuche

a) Zeitlicher Verlauf der Nitrataufnahme und -assimilation

In einer Reihe von Versuchen wurde zunächst einfach der zeitliche Verlauf der Nitrataufnahme und -assimilation durch Schüttelmycel verfolgt. Als assimiliertes Nitrat wird die Differenz zwischen dem aufgenommenen und dem im Mycel vorgefundenen Nitrat aufgefaßt. Wir sind uns dabei bewußt, daß mit dem Verschwinden des Nitrates unter Umständen nur ein Teil des Assimilationsvorganges erfaßt wird. Es erscheint aber unwahrscheinlich, daß sich unter den von uns gewählten Bedingungen größere Mengen an Intermediärprodukten der Nitratassimilation anhäufen können.

Figur 2 zeigt den Verlauf von Nitratabsorption, Nitratassimilation, Trockengewicht und Wasserstoffionenkonzentration an einem Versuch, bei dem KNO_3 als alleinige Stickstoffquelle geboten wurde. Der Versuch wurde so durchgeführt, daß zu den angegebenen Zeiten je 6 Kolben mit 100 ml Nährlösung geerntet wurden. Aus dem Kurvenverlauf ergibt sich, daß die Nitrataufnahme genau parallel der Trockengewichtszunahme erfolgt. Die Bestimmung des Nitratgehaltes der Mycelien zeigt eine ge-

wisse Nitratakkumulation, die aber nur vorübergehend nach 48 Stunden etwa 19 % der gesamten absorbierten Nitratmenge erreicht. Das pH der Lösung sinkt von 4,5 auf 3,3.

Bemerkenswert ist dabei, daß noch nach 72 Stunden Versuchsdauer sowohl Wachstum wie Nitratverwertung anhalten, die Säureproduktion jedoch schon nach 24 Stunden praktisch aufhört, wobei die Lösung ein pH von 3,5 bis 3 erreicht.

b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Wird das Schüttelmycel in NO_3 -haltige Nährlösung verbracht, so beginnt gleichzeitig mit der Aufnahme des Nitrates eine Ansäuerung der Lösung. Über die Ursache dieser Reaktionsverschiebung wird später berichtet werden (siehe Kapitel IV). Durch Versuche, bei denen dem Mycel eine bestimmte Reaktion des Mediums aufgezwungen wurde, sollte den kausalen Zusammenhängen zwischen Säureproduktion und Nitratabsorption nachgegangen werden. Ein in seinen Resultaten charakteristisches Experiment wurde in folgender Weise angelegt: In 20 Erlenmeyerkolben mit 100 ml Kaliumnitratnährlösung wurden je 12 mg (Trockensubstanz) Schüttelmycel aus einer 24 Stunden alten Vorkultur in Bierwürze eingimpft. Nach 24 Stunden Wachstum wurden 4 Kolben untersucht und von den restlichen 16 Kolben die Hälfte mit je 2 g CaCO_3 /100 ml versetzt. Dadurch sank die Wasserstoffionenkonzentration von pH 3,5 auf pH 7. Nach 48 und 72 Stunden wurden jeweils 8 Kolben, nämlich 4 mit und 4 ohne Kalkzusatz, geerntet und die Nährlösung wie die Mycelien selbst auf Zucker- und Nitratgehalt analysiert. Die Resultate dieses Versuches kamen in Figur 2 zur Darstellung.

Es zeigt sich zunächst, daß das pH der Lösung mit Kalkzusatz während der ersten 24 Stunden, wie zu erwarten, nur schwach sinkt. Während des darauffolgenden Tages ist der Beginn einer deutlichen Ansäuerung wahrzunehmen, die aber in diesem Zeitraum erst zu einem pH von 6,2 führt.

Nitrataufnahme und -assimilation verlaufen bei den nicht mit Karbonat versehenen Mycelien gleich, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Eine schwache Anhäufung von Nitrat im Mycel erreicht ihr absolutes Maximum nach 48 Stunden, in diesem Versuch 6,6 % des absorbierten Nitrates.

Die Zugabe von CaCO_3 führt zunächst zu einer fast vollständigen Einstellung der Nitrataufnahme. 24 Stunden nach Zugabe des Kalziumkarbonates beginnt aber wieder die Nitrataufnahme mit fast der gleichen Intensität wie bei der Kontrolle ohne Kalkzugabe. Das im Mycel 24 Stunden nach Versuchsbeginn vorhandene Nitrat (6,0 mg/Kolben) wird während der Sistierung der Nitrataufnahme nur in unwesentlichem Ausmaß reduziert (3,2 mg nach 24 Stunden mit Kalk). Das Kontrollmycel ohne Kalkzugabe reduziert in der gleichen Zeit 23,1 mg Nitrat. Mit dem Wie-

derbeginn der Nitrataufnahme steigt auch die Assimilationsintensität parallel an.

Tabelle 1
Nitrataufnahme und Assimilation durch Schüttelmycel von *Aspergillus niger*

Kulturdauer Stunden	pH	Trocken- gewicht mg	NO ₃ ⁻ / Kolben mg	Absorption		«Gespeichertes» NO ₃ ⁻		Assimiliertes NO ₃ ⁻	
				mg	% des ge- gebenen NO ₃ ⁻	mg	% des ab- sorbierten	mg	% des ab- sorbierten
Ausgangs- lösung	5,79	27,5	124	0	0	0	0	0	0
24 Std.	4,96	315,8	79,3	44,7	36	5,1	11	39,6	89
48 Std.	3,86	609,2	57,2	67,0	54	6,9	10	60,1	90
72 Std.	3,86	653,8	47,4	76,6	63	4,7	6	71,9	94
144 Std.	3,56	962,6	29,1	94,9	77	3,8	4	91,1	96

Tabelle 2
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Nitrataufnahme und Assimilation

Kulturdauer Stunden	pH	NO ₃ ⁻ / Kolben mg	Absorption		«Gespeichertes» NO ₃ ⁻		Assimiliertes NO ₃ ⁻		Glucose/Kolben	
			mg	% des gegebenen NO ₃ ⁻	mg	% des absorbierten	mg	% des absorbierten	g	Absorp- tion g
Ausgangs- lösung	6,7	234	0	0	0	0	0	0	5,3	0
24 Std. ohne CaCO ₃	3,5	140,3	93,7	40	6,0	6,4	87,7	93,6	2,5	2,8
48 Std. ohne CaCO ₃	3,0	115,4	118,6	51	7,8	6,6	110,8	93,4	1,1	4,2
72 Std. ohne CaCO ₃	2,9	68,5	165,5	71	2,7	1,6	162,8	98,4	0,8	4,5
48 Std. mit CaCO ₃	6,8	135,1	98,9	42	3,2	3,2	95,7	96,8	0,6	4,7
72 Std. mit CaCO ₃	6,2	112,8	121,2	52	1,0	0,8	120,2	99,2	0,4	4,9

Der Glucoseverbrauch wird durch die Kalkzugabe deutlich gesteigert, was offenbar auf die schon vielfach festgestellte fördernde Wirkung neutralisierender Mittel auf die Säureproduktion zurückzuführen ist. Wie weiter unten nachgewiesen wird, produziert unter den gewählten Versuchsbedingungen der von uns verwendete Stamm von *Aspergillus niger* Gluconsäure.

c) Nitratabgabe in die Nährlösung

Wie eingangs dieses Kapitels erwähnt, gehen die Ansichten der bisherigen Untersucher über die Frage der Nitratspeicherung und Wieder-

abgabe von Nitrat bei Erniedrigung der Wasserstoffionenkonzentration auseinander. Da wir im Verlauf der bisher besprochenen Versuche in den Mycelien jeweils eine gewisse, wenn auch geringe Menge Nitrat feststellen konnten, schien es uns wichtig, durch eine geeignete Versuchsanordnung die Möglichkeit einer Nitratausscheidung zu prüfen. Zu diesem Zweck haben wir pH-Bedingungen geschaffen, welche die Nitratausscheidung teils fördern, teils hemmen sollten. Die Kulturen, die in je drei Parallelen angelegt waren, sind zuerst 48 Stunden lang in KNO_3 -haltiger Nährlösung wachsen gelassen worden. Dann wurden sie während 24 Stunden in Lösungen von teils saurer, teils neutraler Reaktion verbracht, die aber kein Kaliumnitrat enthielten. Dadurch wurde es möglich, die Nitrat-abgabe ins Medium festzustellen und zu messen. Die Anfangsreaktion dieser Medien haben wir durch Zusatz von 1 % KOH auf pH 7,0 oder durch Beigabe von 1 % H_2SO_4 auf pH 3,5 gebracht.

Tabelle 3
Die Nitratabgabe in nitratfreie Lösung

Kulturdauer Stunden	pH	Trocken- gewicht mg	NO_3^- /Kolben mg	Absorption			Assimiliertes NO_3^-		
				mg	% des gege- benen NO_3^-	«Gespeicher- tes» NO_3^- mg	mg	% des ab- sor- bier- ten	nach 48 Std. im Mycel vor- han- denen
Ausgangslösung	6,9	11,4	321	0	0	0	0	0	0
48 Std. in KNO_3 -halti- ger Lösung	3,0	449,3	199,7	121,3	37	$4,3 \pm 0,18$	117,0	96,5	
Ausgangs-pH	7,0								
Nach 24 Std. in Lösg. ohne Glucose und KNO_3	6,9	688,1	$2,7 \pm 0,35$	/	/	0,33	1,3	/	30
Ausgangs-pH	3,4								
Nach 24 Std. in Lösg. ohne Glucose und KNO_3	3,5	595,4	$1,1 \pm 0,56$	/	/	0,38	2,8	/	65

Der mittlere Fehler des Mittelwertes wurde jeweils neben den betr. Nitratmengen aufgeführt.

Die Differenz zwischen der ursprünglich im Mycel vorhandenen und der in die *neutrale* Lösung ausgeschiedenen Nitratmenge beträgt: $1,6 \pm 0,4$ mg.

Die Differenz zwischen der ursprünglich im Mycel vorhandenen und der in die *saure* Lösung ausgeschiedenen Nitratmenge ist: $3,2 \pm 0,59$ mg.

Es zeigt sich, daß tatsächlich in eine nitratfreie Lösung auch aus einem Mycel, das nur wenig freies Nitrat enthält, ein bestimmter Anteil davon abgegeben wird (s. Tabelle 3). Während zu Anfang des Versuches

4,3 ± 0,18 mg «gespeichertes» Nitrat im Mycel eines Kolbens vorhanden ist, finden sich nach 24 Stunden im ursprünglich N-freien und ein pH von 7 aufweisenden Kulturmedium 2,7 ± 0,35 mg NO₃⁻, während das Mycel selbst nur noch 0,33 mg Nitrat enthält.

Die Differenz zwischen der Summe der beiden letzten und dem Anfangswert muß wahrscheinlich assimiliert worden sein, jedenfalls deutet die starke Trockengewichtszunahme während der Versuchszeit in dieser Richtung. In ein saures Medium wird deutlich weniger Nitrat abgegeben (1,1 ± 0,56 mg).

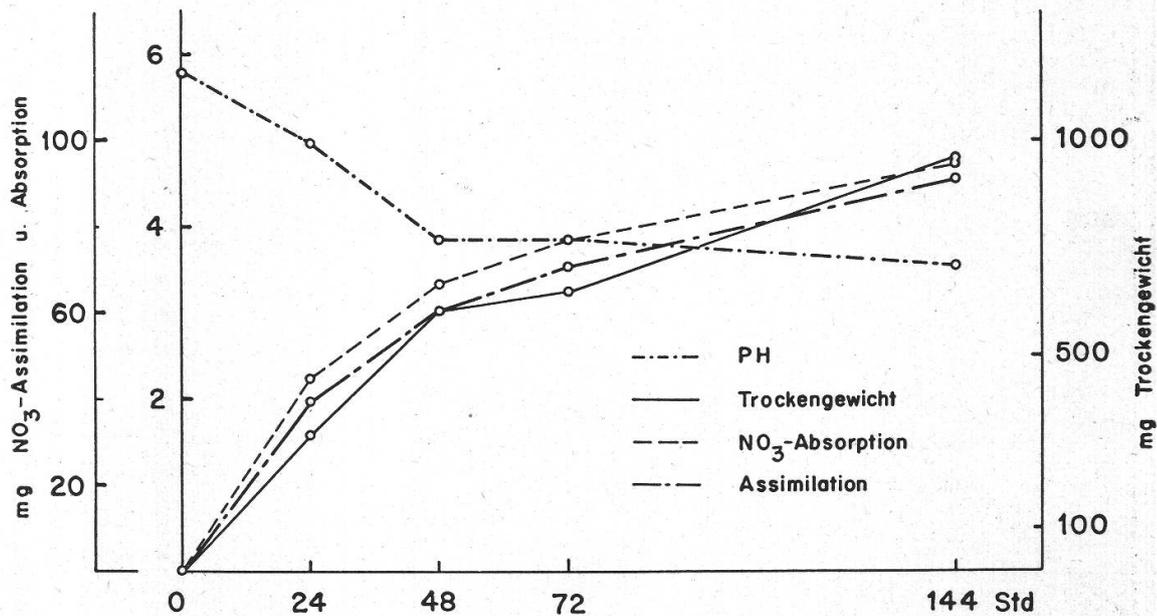
Trotz verschiedener Reaktion im Außenmedium findet sich aber am Ende der Versuchszeit in beiden Reihen praktisch gleichviel Nitrat in den Mycelien (0,33 bzw. 0,38 mg).

Dies spricht deutlich gegen eine pH-Abhängigkeit der Nitratspeicherung, wie sie von B ü n n i n g (1936) postuliert wurde. Hingegen zeigt sich auch hier, wie in den vorausgehend beschriebenen Versuchen, daß eine geringe Wasserstoffionenkonzentration im Medium die Nitratassimilation hemmt.

3. Diskussion

Aus allen Versuchen mit unserem *Aspergillus niger*-Stamm ging hervor, daß die Verarbeitung des absorbierten Nitrates nahezu parallel zur Aufnahme geht. Zu einer geringen Anhäufung kann es während der Periode des intensiven Mycelwachstums kommen; die Menge «gespeicherten» Nitrates betrug meist weniger als 10 % des aufgenommenen. Mit der Verlangsamung des Wachstums nahm der Nitratgehalt des Mycels regelmäßig ab. Assimilation und Aufnahme des Nitrates scheinen hier also weitgehend, aber doch nicht vollständig voneinander abhängig zu sein. Auch bei der Salzaufnahme durch die Wurzeln höherer Pflanzen ist schon vielfach auf die enge Bindung zwischen Wachstum und Aufnahme hingewiesen worden. Während bei diesen aber eine Vorstellung über die unmittelbaren Ursachen dieses Zusammenhanges nicht so leicht zu gewinnen ist, dürfte es sich bei einem Pilzmycel wohl zum größten Teil um eine Erscheinung handeln, die mit der Oberflächenentwicklung des Mycels zusammenhängt. Bei einem Schüttelmycel im besondern darf gegenüber den Deckenkulturen angenommen werden, daß mit der Trockengewichts- bzw. Volumenzunahme die Oberfläche infolge der zylindrischen Gestalt der Hyphen annähernd im gleichen Verhältnis zunimmt. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß Wachstum und Nitratabsorption während längerer Zeit genau parallel verlaufen (Figur 2). Die, wenn auch schwache, Nitratspeicherung zwischen 24 und 48 Stunden nach Versuchsbeginn zeigt jedoch, daß die Zunahme der Geschwindigkeit eines oder mehrerer Vorgänge der Nitratassimilation in dieser Zeit hinter der Absorptionsintensität zurückbleibt. Auf Grund unserer Versuchsergebnisse kann der begrenzende Faktor nicht festgestellt werden.

Nitrathaltige Mycelien geben an eine nitratfreie Lösung Nitrat ab, und zwar in unseren Versuchen sowohl bei pH 7 wie bei pH 3,4 bis 4,5. Die abgegebenen Mengen sind aber verschieden. Damit ist im wesentlichen auch mit anderer Methodik der Befund von Itzerott (1936) bestätigt. Die von ihr gefundene sehr viel stärkere Abgabe und Speicherung dürfte auf der Verwendung älterer ruhender Myceldecken beruhen. In bezug auf die Nitratabsorption scheint sich jedoch unser Stamm von *Aspergillus niger* von dem zu unterscheiden, den Bünning und Itzerott verwendet haben. Wir können der von Bünning und



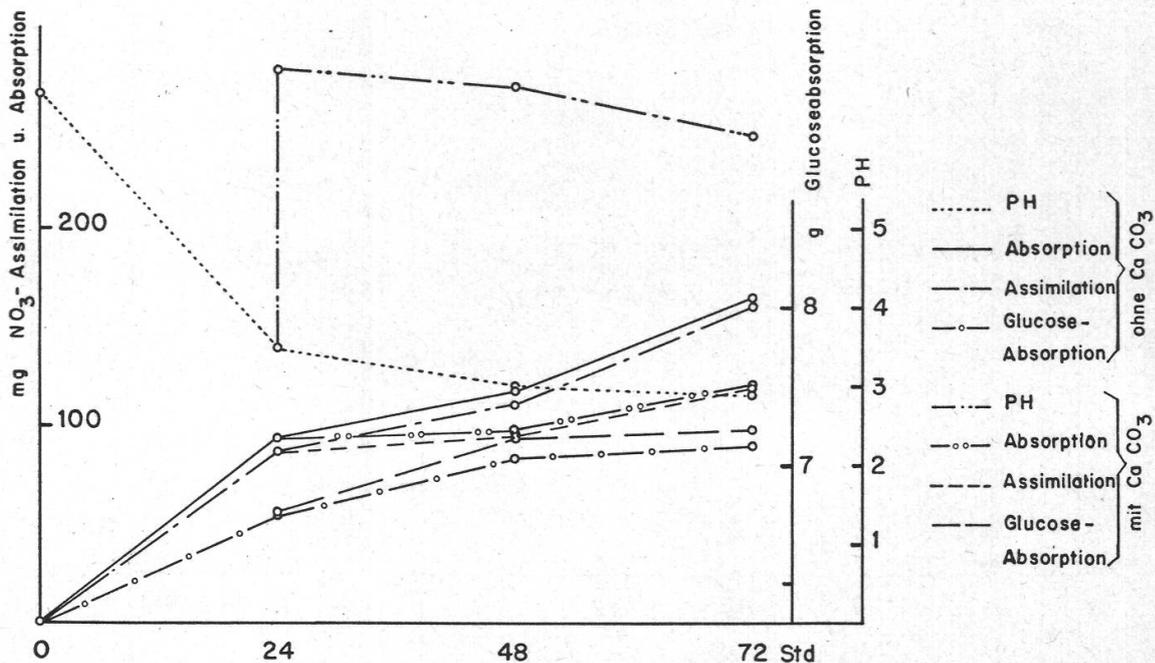
Figur 2

Nitrataufnahme und Assimilation durch Schüttelmycel von *Aspergillus niger*

Itzerott aus ihren Versuchen gezogenen Schlußfolgerung aus folgenden Gründen keine Allgemeingültigkeit zuerkennen. Der in Figur 3 dargestellte Versuch zeigt in der dritten Periode zwischen 48 und 72 Stunden eine beinahe gleich intensive Nitratabsorption und -verarbeitung sowohl bei pH 7 bis 6 wie bei pH 3. Das gleiche ergibt sich auch beim Vergleich der anfänglichen Wachstums-, Absorptions- und Assimilationsintensität, die sich kaum unterscheidet, ob ein Versuch bei pH 7 oder bei pH 4 begonnen wird. Der zuletzt beschriebene Versuch zeigt ferner, daß im Mycel trotz stark verschiedener Wasserstoffionenkonzentration der Lösung genau gleich viel freies Nitrat gefunden werden kann. Blockierend auf die Nitratabsorption und -assimilation wirkt jedoch die Erhöhung des pH von 3,5 auf 7.

Aus diesen Ergebnissen darf wohl abgeleitet werden, daß nicht die Höhe der Wasserstoffionenkonzentration das Ausmaß der Nitratabsorption bestimmt, sondern Stoffwechselvorgänge im Mycel, die zur Assimi-

lition des Nitrates führen und mit denen zum Teil eine Senkung des pH der Lösung verbunden ist. Wir haben uns, wie in folgenden Abschnitten dargelegt werden wird, noch mit dem Problem der Säureproduktion durch den Pilz und ihrem Zusammenhang mit der Nitratassimilation befaßt. Nach unsern Ergebnissen baut der untersuchte *Aspergillus niger*-Stamm in *nitrohaltiger* Nährlösung die Glucose zum Teil über Gluconsäure ab, und es scheint, daß unter Berücksichtigung dieser Tatsache die Zusammenhänge zwischen Reaktionsänderungen der Lösung und der Nitratassimilation erklärt werden können.



Figur 3

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Nitrataufnahme und Assimilation

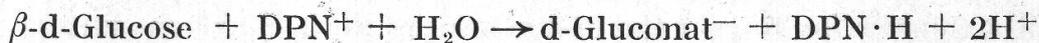
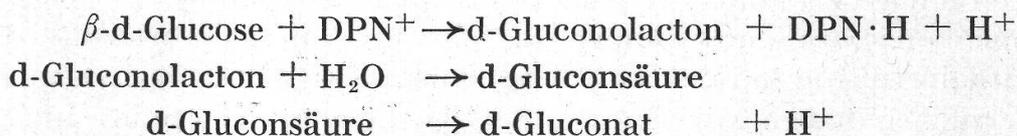
IV. Die Bildung von Gluconsäure und ihre Abhängigkeit von der Nitratassimilation

1. Literaturübersicht

Der Abbau von Kohlehydraten unter Bildung organischer Säuren durch *Aspergillus niger* kann wahrscheinlich auf verschiedenen Wegen vor sich gehen. Einer davon ist die direkte Oxydation der Glucose zu Gluconsäure. 1922 hat Molliard als erster deren Anwesenheit in Kulturmedien festgestellt. Der Mechanismus der Gluconsäurebildung besteht in einer durch ein Enzym katalysierten Oxydation. Sie ist von Müller in seinen Arbeiten aus den Jahren 1926 bis 1936 eingehend beschrieben worden. Seine Enzympräparate, die er aus Preßsaft von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* erhielt, oxydierten d-Glucose zu d-Gluconsäure. Er nannte das Ferment Glucoseoxydase, denn er

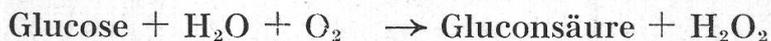
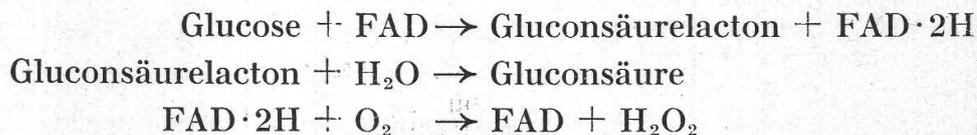
konnte seine Wirkung nur in Anwesenheit von Sauerstoff feststellen. Franke, Deffner und Lorenz (1937 und 1939) haben jedoch nachgewiesen, daß es sich um eine Dehydrase handelt, die auch anaerob, zum Beispiel mit Methylenblau als H-Acceptor, wirksam ist. Sie nannten das Enzym deshalb Glucoseaerodehydrase. Berühmt wurde deren Identifizierung mit *Notatin* (auch Penicillin B oder Penatin genannt), einem Enzym, das von Short und seinen Mitarbeitern (1942 und 1945) aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium notatum* isoliert werden konnte. Es wirkt spezifisch auf β -d-Glucose und in geringem Maße auch auf d-Mannose und d-Xylose. Knobloch und Meyer haben 1941 die Verwandlung von d-Mannose zu d-Mannonsäure und von Galaktose zu Galaktonsäure bei Anwesenheit von CaCO_3 beobachtet. Später fanden Keilin und Hartree (1946 und 1948) jedoch, daß die Galaktose nicht angegriffen wurde, und vermuteten, daß die Galaktoseversuche von Knobloch und Meyer durch Spuren von Glucose verfälscht worden seien.

S. Cohen (1954) stellt den Reaktionsmechanismus der Glucosedehydrase aus der *Leber* auf folgende Weise dar:



Das reduzierte DPN wird durch ein Flavoprotein- oder Cytochromsystem oxydiert. Der Wasserstoff wird schließlich an Sauerstoff übertragen unter Bildung von Wasserstoffperoxyd.

Von der Glucose-Aerodehydrase der *Aspergillaceae* wird angenommen, daß sie den Wasserstoff direkt an Adeninflavin-Dinukleotid überträgt, das dann durch Luftsauerstoff oxydiert wird, wiederum unter Bildung von Wasserstoffperoxyd:



Die antibakteriellen Eigenschaften der Glucose-Aerodehydrase konnten auf diese Produktion von Wasserstoffperoxyd als alleinige Ursache zurückgeführt werden.

Der weitere Abbau der Gluconsäure ist noch wenig erforscht, für *Aspergillus niger* finden sich in der Literatur noch keine Angaben darüber. Einige andere Mikroorganismen oxydieren die aus Glucose gebildete

Gluconsäure zu Ketogluconsäure. De Fiebre und Knight zum Beispiel haben 1953 die Bildung von Ketogluconsäure bei *Penicillium chrysogenum* nachgewiesen. Jedoch erfolgt diese Art des Glucoseabbaues wahrscheinlich nicht ausschließlich über unphosphorylierte Substanzen.

Die Gluconsäurebildung wird gefördert durch Anwesenheit von Neutralisierungsmitteln in der Lösung (z. B. CaCO_3), durch optimale Glucosekonzentration (11 bis 12 ‰), hohe Temperatur und optimale Wasserstoffionenkonzentration (6,0). Sinkt das pH bei Auftreten freier Säure auf 3, so wird die Glucoseoxydation fast vollständig gehemmt.

Eine wichtige Rolle spielt die Belüftung des Kulturmediums. Die industrielle Herstellung von Gluconsäure geschieht deshalb in Schüttelkultur mit zusätzlicher künstlicher Belüftung, wobei fast theoretische Gluconsäureausbeuten erhalten werden.

Die Wirkung des Stickstoffgehaltes der Nährlösung auf die Gluconsäureproduktion hat schon Mollard 1924 in Deckenkulturen untersucht und kam zum Ergebnis, daß ein niederer N-Gehalt ($\frac{1}{500}$ n Ammoniumsulfatlösung) die Bildung von Gluconsäure anregt. Dasselbe fand Perquin (1938) in Schüttelkultur. Jedoch scheint dieser Effekt nach Bernhauer und Duda (1928) noch an eine niedere Wasserstoffionenkonzentration gebunden zu sein. In saurer Nährlösung dagegen wird die Gluconsäurebildung durch hohen N-Gehalt gefördert. In unseren Versuchen haben wir eine $\frac{1}{50}$ n KNO_3 -Lösung verwendet und haben damit eine gute Gluconsäureproduktion erhalten.

Da *Aspergillus niger* neben Gluconsäure auch Zitronen- und Oxalsäure bilden kann, war es zunächst von Interesse, herauszufinden, welche dieser drei Säuren im Zusammenhang mit der Nitrataufnahme und Nitratassimilation unseres Pilzstammes angehäuft wird.

2. Nachweis der Bildung von Gluconsäure

Zur Identifizierung der in den Lösungen mit KNO_3 angehäuft Säure wurde eine vom Mycel befreite Nährlösung nach 48stündiger Kul-

Lösung Lösung Glucon-
A B säure




Figur 4

Säurebildung durch *Aspergillus niger*
mit KNO_3 als alleiniger N-Quelle

Lösung A und B: Gleichbehandelte Lösungen nach 48 Std., deren End-pH 2,80 bzw. 2,84 betrug

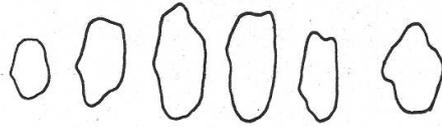
Lösungsmittel: 80 Teile Äthanol, 4 Teile Ammoniak, 16 Teile Wasser

Entwicklung: mit Bromkresolgrün (nach Cramer, 1953) (nach Cramer, 1953)

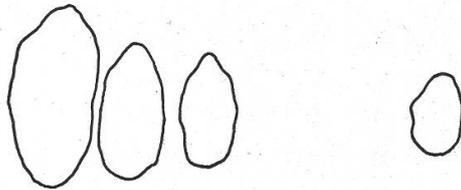
Aufgetragenes Volumen: Lösung A und B je 5 μl , Testlösung je 10 μl

Konzentration der Testlösungen: je 1 ‰

A. Lösung nach:
 Std. 24 48 72 96 144 Gluconsäure

B. Lösung nach:
 Std. 24 48 72 96 144 Glucose

Figur 5

Zeitlicher Verlauf der Gluconsäure-Produktion (A) und des Glucoseverbrauches (B) durch *Aspergillus niger* mit KNO_3 als N-Quelle

A: Lösungsmittel: 80 Teile Äthanol, 4 Teile Ammoniak, 16 Teile Wasser
 (nach Cramer, 1953)

Entwicklung: mit Bromkresolgrün (nach Cramer, 1953)

B: Lösungsmittel: 40 Teile Butanol, 10 Teile Eisessig, 50 Teile Wasser
 (nach Cramer, 1953)

Entwicklung: mit Anilinphthalat

Aufgetragenes Volumen: Lösungen und Test je $10 \mu\text{l}$

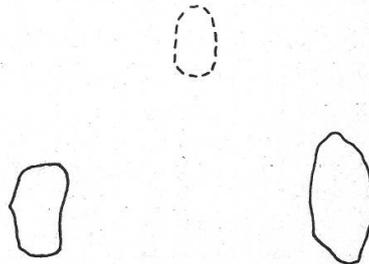
Konzentration der Testlösungen: je 1 ‰

Lösung A Lösung B Glucon-
 säure



Figur 6

Säurebildung durch *Aspergillus niger* mit KNO_3 und $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ als N-Quelle



Lösung A: mit KNO_3 als N-Quelle

Lösung B: mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ als N-Quelle

Lösungsmittel: 80 Teile Äthanol, 4 Teile Ammoniak, 16 Teile Wasser
 (nach Cramer, 1953)

Entwicklung: mit Bromkresolgrün (nach Cramer, 1953)

Aufgetragenes Volumen: Lösung A und B je $5 \mu\text{l}$, Testlösungen je $10 \mu\text{l}$

Konzentration der Testlösungen: je 1 ‰

tur papierchromatographisch untersucht. Das pH der Lösung war in dieser Zeit von 6,1 auf 2,8 gesunken. Die Kulturbedingungen waren dieselben wie in den zuerst beschriebenen Versuchen (siehe Figur 4).

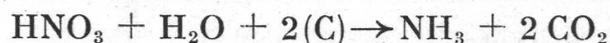
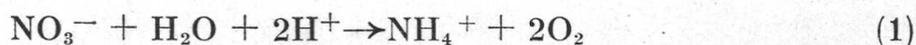
In weiteren Untersuchungen wurde der zeitliche Verlauf der Gluconsäureproduktion und gleichzeitig die Abnahme des Glucosegehaltes verfolgt. Wie aus Figur 5 hervorgeht, konnte nur Gluconsäure nachgewiesen werden. Die Nährlösungen wurden nach 24, 48, 72, 96 und 144 Stunden untersucht und die Größe der Säureflecke miteinander verglichen. Am meisten Säure war nach 72 und nach 96 Stunden nachweisbar. Dem entspricht auch die Abnahme des Zuckergehaltes. Nach 96 Stunden konnte keine Glucose mehr nachgewiesen werden. Nachdem aus der Kulturlösung aller Zucker aufgebraucht ist, nimmt auch der Gluconsäuregehalt ab.

Wird dem Pilz an Stelle von Nitrat-N Ammonium-N geboten (siehe Figur 6), so produziert er keine Gluconsäure mehr, dagegen geringe Mengen einer bei Nitraternahrung nicht auftretenden Säure, bei der es sich wahrscheinlich um Asparaginsäure handelte.

Für den von uns verwendeten Stamm von Aspergillus niger läßt sich somit eindeutig eine Beziehung zwischen der Nitratverwertung und der Produktion von Gluconsäure feststellen.

3. Diskussion

In allgemeiner Form sind Zusammenhänge zwischen der Dissimilation von Kohlehydraten und der Nitratassimilation schon lange bekannt. Die endergone Nitratreduktion *muß* ja in heterotrophen Organismen mit exergonen Stoffwechselfvorgängen gekoppelt sein. Die Untersuchungen von Warburg und Negelin (1920) an *Chlorella* waren die ersten aus einer Reihe ähnlicher, in denen versucht wurde, auf Grund von Messungen des respiratorischen Quotienten (CO_2/O_2) die Rolle des Nitrats als zusätzlicher «Sauerstoffdonator» für die Veratmung von Kohlehydraten festzustellen. Es konnte tatsächlich bei verschiedenen Objekten eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten gefunden werden, was sich durch die Produktion von «Extra-Kohlensäure» durch die Nitratreduktion erklären läßt:

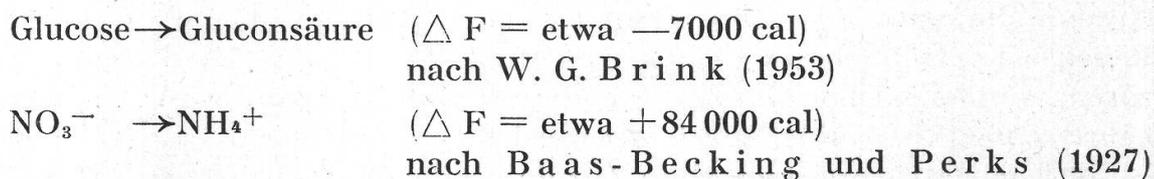


Wie Burströms Überlegungen (1945) zeigen, können aber Gaswechselfmessungen einen direkten energetischen Zusammenhang der Nitratreduktion mit der Atmung nach Art der Gleichungen (1) und (2) nicht beweisen. Nur dann, wenn im Verlaufe des Kohlehydratabbaues

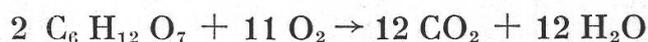
und der in heterotrophen Organismen meist gleichzeitig verlaufenden Assimilation sowie bei der Nitratreduktion die gleichen Endprodukte mit oder ohne Nitrat gebildet werden, ist zu erwarten, daß «Extrakohlensäure» auf die *Nitratreduktion* zurückzuführen ist (Yamagata, 1934).

Während bisher keine Anhaltspunkte dafür vorhanden sind, daß die Nitratassimilation zu anderen Endprodukten führt als die Assimilation von Ammoniumstickstoff, gilt das gleiche, wie unsere Versuche zeigen, bei *Aspergillus niger* nicht für den Kohlehydratabbau. Die Möglichkeit, daß zum mindesten intermediär Gluconsäure (vielleicht auch organische Säuren) dann angehäuft werden, wenn Nitrat reduziert wird, muß in Zukunft auch bei andern Organismen in Betracht gezogen werden. Es wäre in diesem Falle durchaus möglich, daß die Nitratreduktion ohne Produktion von Extrakohlensäure verläuft.

Ein Vergleich der freien Energien beider Reaktionen (unter physiologischen Bedingungen),



zeigt jedoch, daß mindestens 12 Mole Glucose zu Gluconsäure oxydiert werden müßten, damit genügend Energie für die Reduktion eines Mols Nitrat zur Verfügung steht. Nitrat *allein* kommt also als Wasserstoffakzeptor für die direkte Glucoseoxydation kaum in Frage, was durch die Tatsache erhärtet wird, daß auch in Gegenwart von Nitrat bei *Aspergillus niger* wie auch bei andern Organismen die Gluconsäureproduktion an die Gegenwart von Luftsauerstoff gebunden ist. Die Korrelation zwischen Nitraternährung und Gluconsäureproduktion ist wahrscheinlich mehr indirekter Art, indem gemeinsame Bedingungen, zum Beispiel ein bestimmtes rH, in der Zelle vorhanden sein müssen, damit der eine wie der andere Prozeß vor sich gehen kann. Trotzdem muß sich natürlich eine intermediäre Gluconsäurebildung verringern auf einen CO₂-Überschuß auswirken. Verschwindet die Gluconsäure nach Erschöpfung des Zuckergehaltes der Nährlösung durch vollständigen aeroben Abbau, so ist auch dann nur ein *geringer CO₂-Überschuß* zu erwarten:



$$\text{R. Q.} = \frac{12}{11} = 1,09$$

Genauerer läßt sich darüber aber erst sagen, wenn unsere Versuche durch eine Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz unter Berücksichtigung des Gaswechsels ergänzt worden sind.

V. Die Beeinflussung der Nitrat- und Ammoniumaufnahme durch organische Säuren

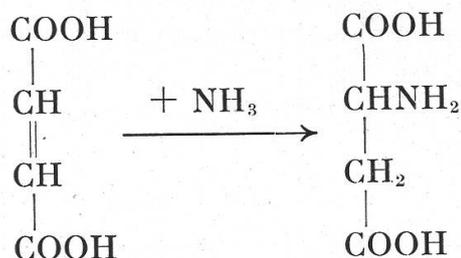
1. Literaturübersicht

Der assimilierte Stickstoff gelangt zum größten Teil über Aminosäuren in die Proteine des Pilzthallus. Dabei spielt die Herkunft des Stickstoffes, ob aus Nitrat- oder Ammoniumionen stammend, keine Rolle. Als Kohlenstoffgerüste zur Synthese der Aminosäuren werden schon lange organische Säuren betrachtet. Die zuerst von K n o o p (1910) geäußerte Theorie, wonach Aminosäuren im Organismus generell durch enzymatische Aminierung der entsprechenden α -Ketosäuren entstehen könnten, mußte später geändert werden. Es zeigte sich, daß unter diesen Ketosäuren bestimmte Ketodicarbonsäuren bevorzugt aminiert werden. Eine besonders wichtige Rolle kommt der α -Ketoglutarsäure und der Oxallessigsäure zu. Die zu ihrer Aminierung führenden Enzymsysteme haben weiteste Verbreitung. Versuche über den zeitlichen Verlauf der Ammoniumassimilation und besonders eindruckliche Versuche mit N¹⁵ haben bei verschiedenen Organismen gezeigt, daß zuerst, und dies sehr rasch, Aminodicarbonsäuren, besonders Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie ihre Amide, angehäuft werden.

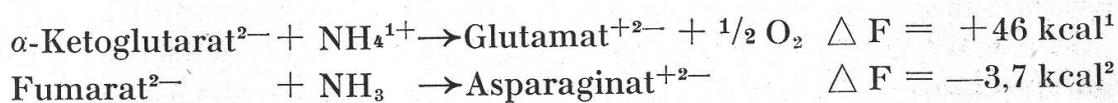
Die nitratverwertende Hefe *Torula* produziert die gleichen Aminosäuren und Amide in nur geringer Menge verglichen mit Versuchen, in denen ihr Ammoniumstickstoff geboten wird (V i r t a n e n et al., 1949). Da aber der endgültige Proteinertag in beiden Fällen derselbe ist, muß angenommen werden, daß der Unterschied nur durch eine verhältnismäßig geringe Reaktionsgeschwindigkeit bei der Nitratreduktion verursacht wird. Glutaminsäure und Asparaginsäure stellen die Ausgangspunkte für eine ganze Reihe weiterer Synthesen von Aminosäuren dar (siehe z. B. die Untersuchungen von A b e l s o n und V o g e l, 1955, an *Torulopsis* und *Neurospora*). Ferner können durch Umaminierung, ausgehend von Glutaminsäure und Asparaginsäure, andere Ketosäuren in Aminosäuren umgewandelt werden. Bei Fütterung der Hefe mit Ammoniumstickstoff erscheint neben den Aminodicarbonsäuren Alanin ebenfalls sehr schnell und oft in so großer Menge, daß eine direkte Bildung durch Aminierung von Brenztraubensäure wahrscheinlicher scheint als die Entstehung über den Umweg der Transaminierung (R o i n e, 1947).

Vor allem pflanzliche Organismen sind imstande, größere Mengen an Aminodicarbonsäureamiden anzuhäufen. Der Amidstickstoff, besonders derjenige von Glutamin, kann jedoch sehr leicht wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden. Bei der weiten Verbreitung der Glutaminase scheint die oft zu beobachtende Anhäufung der Amide durch die begrenzte Geschwindigkeit der von Glutaminsäure ausgehenden Reaktionen bedingt zu sein.

Ein Prozeß, der von den bisher erwähnten Reaktionen zur Bildung von Aminosäuren verschieden ist, stellt die von *Virtanen* und Mitarbeitern untersuchte Bildung von Asparagin durch direkte Anlagerung von Ammoniak an die Doppelbindung der Fumarsäure dar.



Das diese Reaktion katalysierende Enzym, die Aspartase, wurde in Bakterien, Hefe und höheren Pflanzen nachgewiesen. Gegenüber der Aminierung von Ketosäuren ist die auf solche Art erfolgende Bildung von Asparaginsäure vor allem deshalb interessant, weil sie exergon erfolgt. Die Aminierung sowohl von α -Ketoglutaratsäure wie von Oxalessigsäure und Brenztraubensäure ist stark endergon und muß deshalb mit energieliefernden Vorgängen (Oxydation von reduziertem Coenzym 1) gekoppelt sein.



Es ist heute noch nicht möglich, die relative Bedeutung der beiden Arten der primären Synthese von Aminodicarbonsäuren abzuschätzen. Der eine wie der andere Weg geht von Säuren des Tricarbonsäurezyklus aus. Es liegt deshalb nahe, dessen Glieder in bezug auf ihre Wirkung auf die Stickstoffassimilation zu prüfen. Gerade für *Aspergillus niger* besteht große Wahrscheinlichkeit, daß der Tricarbonsäurezyklus durchlaufen werden kann, haben doch *Ramakrishnan* (1954) und Mitarbeiter (1955) alle Fermente des Zyklus im Pilz nachgewiesen.

Das Gleichgewicht der Reaktionen des Kreislaufes scheint jedoch gerade bei *Aspergillus* stark milieuabhängig (und wahrscheinlich auch stammspezifisch) zu sein, kann es doch zur vorübergehenden Anhäufung großer Mengen zum Beispiel von Zitronensäure kommen. Der Mechanismus der Säurebildung weicht dabei nur wenig von dem im «normalen» Zyklus ab (*Cleland und Johnson*, 1954).

Bei verschiedenen Mucoraceen konnten *Leonian und Lilly* (1940) sowie *Burkholder und McVeigh* (1940) zeigen, daß die

¹ Aus *Krebs*, 1954 (Chemical Pathways of Metabolism, Acad. Press Inc., New York 1954).

² Nach *Franke*, 1941 (Bamann-Myrbäck: Methoden der Fermentforschung. Verl. Thiesen, Leipzig 1941, p. 847).

Gegenwart organischer Säuren im Medium tatsächlich die Verwertung von anorganischem Stickstoff stark beeinflußt. Schon bei geringen Konzentrationen (0,1 bis 0,2 %) an Fumarsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure u. a. konnte eine Vervielfachung des Wachstums unter Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoffquelle erreicht werden. Auch Ammoniak und Asparagin zusammen ergeben einen starken Effekt. Bei Verwendung von Bernsteinsäure wurde nur mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nicht aber mit KNO_3 , eine Wachstumsförderung erreicht. Auf Grund negativer Resultate mit Asparagin schließen *Leonian* und *Lilly* auf die Notwendigkeit einer «freien» Carboxylgruppe für das Zustandekommen des Effektes.

Foster (1949) weist darauf hin, daß die unterschiedliche Wirkung auf der leichteren Permeierfähigkeit der Säure gegenüber dem Amid beruhen könnte. Er deutet auch auf die Möglichkeit hin, daß der fördernde Einfluß der organischen Säuren auf die Ammoniakverwertung durch deren Beziehungen zum Tricarbonsäurezyklus erklärt werden könnte.

Es schien uns von Interesse zu sein, die Untersuchungen von *Leonian* und *Lilly* sowie *Burkholder* und *McVeigh* (1940) in veränderter und erweiterter Form an unserem Stamm von *Aspergillus niger* zu wiederholen. Um den aus anderen Arbeiten bekannten Einfluß der Reaktion der Lösung auf die Art der Verwertung von anorganischem Stickstoff möglichst auszuschalten, wurden die Versuche mit Zusätzen neutralisierter organischer Säuren durchgeführt. Ferner wurden sowohl Ammoniumsalze wie Nitrate als Stickstoffquellen verwendet und in den meisten Versuchen nicht nur das Wachstum als Maß für die Verwertung des Stickstoffes ermittelt, sondern dazu noch die Salzabsorption selbst. Im Hinblick auf den bei unserem Pilzstamm unter den angewendeten Versuchsbedingungen vorhandenen Zusammenhang zwischen der Nitratverwertung und der Gluconsäureproduktion erfolgte auch noch eine papierchromatographische Kontrolle der Gluconsäurebildung in Kulturmedien mit Zusätzen von andern organischen Säuren.

2. Einfluß der Zugabe organischer Säuren auf die Gluconsäureproduktion

Die Versuche wurden in folgender Weise durchgeführt:

24 Stunden altes Schüttelmycel aus Bierwürze wurde steril auf 500-ml-Kolben verteilt (wie früher beschrieben), welche 100 ml Nährlösung enthielten. Als Stickstoffquellen kamen entweder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder KNO_3 zur Verwendung; C-Quelle war immer Glucose (5 %). Die organischen Säuren wurden als Natriumsalze in solcher Menge zugegeben, daß die Endkonzentration 0,01 mol war. Die Lösungen reagierten anfangs schwach sauer (pH 6,0 bis 6,4). Nach 24 Stunden Schüttelkultur bei 30° C wurde der Versuch abgebrochen und gleiche Aliquote der filtrierten Lösungen papierchromatographisch analysiert. Wird die Fleckengröße als annäherndes Maß für die Gluconsäurekonzentration genommen, dann

verhalten sich diese zu den Nitratkulturen ohne und mit Zusatz organischer Säuren ungefähr wie folgt:

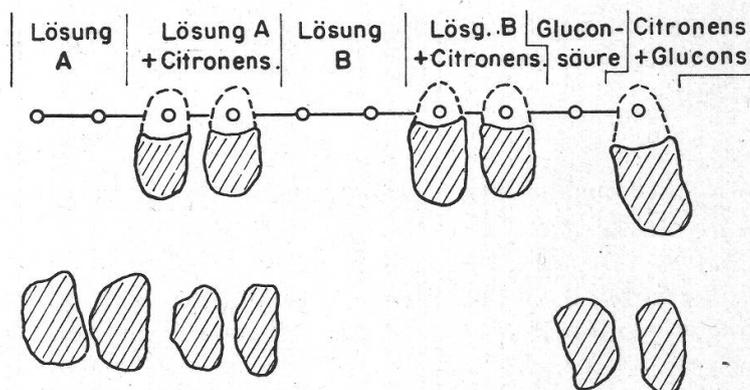
Tabelle 4

Kontrolle ohne Säure	Citrat	α -Ketoglutarat	Succinat	Malonat	Oxalacetat
100	90	72	63	43	37

Die Interpretation dieses Ergebnisses soll in Abschnitt 4 versucht werden.

Das Resultat geht aus dieser Tabelle klar hervor. Wie schon früher beschrieben, wird *auch in diesen Versuchen Gluconsäure nur bei Nitraternährung gebildet*. Bei allen Kulturen mit Zusatz an organischen Säuren

Figur 7
Einfluß von
Zitronensäure auf die
Gluconsäure-Produktion



Lösung A: mit KNO_3 als N-Quelle

Lösung B: mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ als N-Quelle

Lösungsmittel: 80 Teile Äthanol, 4 Teile Ammoniak, 16 Teile Wasser

(nach Cramer, 1953)

Entwicklung: mit AgNO_3 , wassergesättigtem Phenol und 0,05 n NaOH

(nach Löffler und Reichl, 1953)

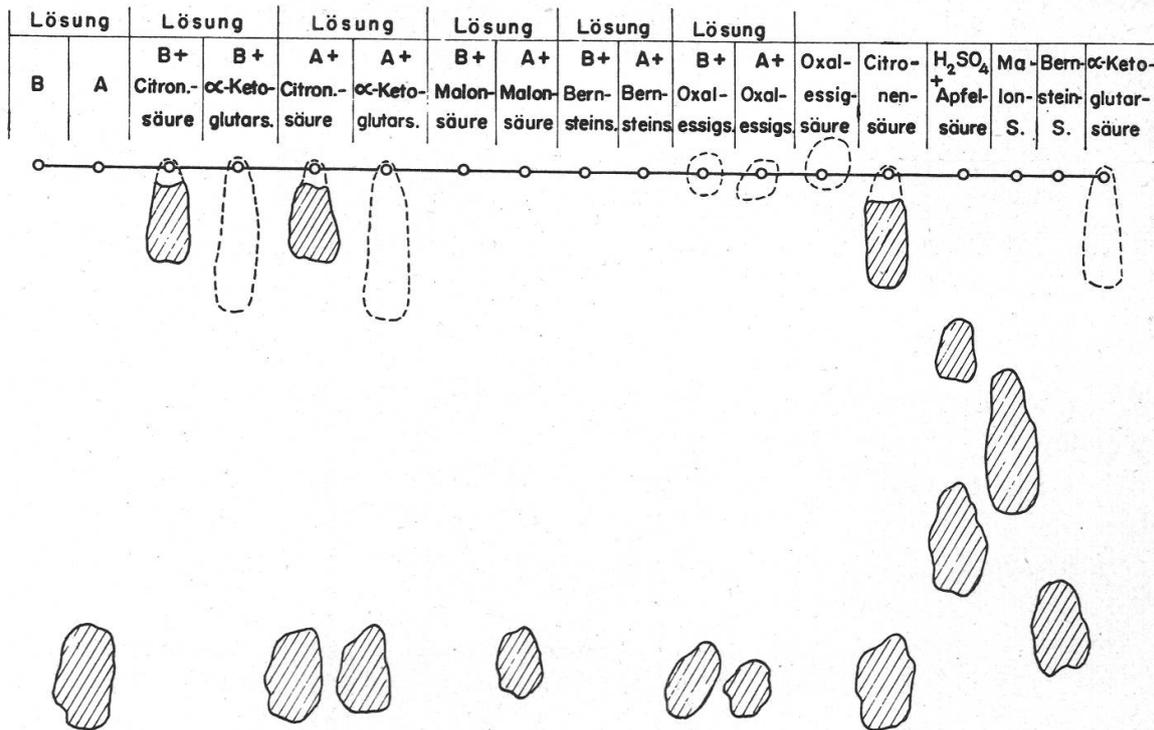
Aufgetragenes Volumen: Lösung A und B je $10 \mu\text{l}$, Testlösungen je $10 \mu\text{l}$

Konzentration der Testlösungen: 1 %

ist ferner eine Verminderung der Gluconsäurebildung gegenüber den Kontrollen feststellbar. Obwohl wir keine quantitativen Bestimmungen durchführten, sind die Flecken für die Gluconsäure so viel kleiner bei den Lösungen mit Zusatz organischer Säuren, daß kein Zweifel über deren Wirkung bestehen kann.

3. Einfluß der Zugabe organischer Säuren auf Wachstum, Ammon- und Nitratabsorption

Diese Versuche wurden mit 24 Stunden altem Schüttelmycel aus Bierwürze durchgeführt, welches in Kolben mit 100 ml Nährlösung ver-



Figur 8

Einfluß der Zugabe verschiedener organischer Säuren auf die Gluconsäure-Produktion

Lösung A: mit KNO₃ als N-Quelle

Lösung B: mit (NH₄)₂SO₄ als N-Quelle

Lösungsmittel: 80 Teile Äthanol, 4 Teile Ammoniak, 16 Teile Wasser

Entwicklung: mit AgNO₃, wassergesättigtem Phenol und 0,05 n NaOH

(nach L ö f f l e r und R e i c h l, 1953)

Aufgetragenes Volumen: Lösung A und B je 10 µl, Testlösungen je 10 µl

Konzentration der Testlösungen: 1 %

teilt und darin weitere 24 Stunden belassen wurde. Stickstoff wurde als (NH₄)₂SO₄ oder KNO₃ geboten, Kohlenstoffquelle war Glucose (5 %). Auch in dieser Versuchsreihe gaben wir, wie in der vorigen, die organischen Säuren als Na-Salze in einer Konzentration von 0,01 molar zu. Jedes Mittel wurde aus 3 bis 6 Parallelversuchen errechnet, die in den Tabellen 4 bis 11 zusammengefaßt sind. Wenn man den Pilz auf nitrat- bzw. ammonstickstoffhaltigen Medien, denen Salze organischer Säuren zugegeben wurden, kultiviert, zeigt sich eine deutliche Änderung von Erntegewicht und Ionenabsorption gegenüber den Kulturen ohne Säurezugabe. Wir haben die Änderung von Trockengewicht und Ionenabsorption, ausgedrückt in Prozenten der Testkulturen (ohne Zugabe organischer Säuren), in Tabelle 12 zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Säurewirkung zum Teil sehr stark von der Art der N-Quelle abhängig ist. Zitrat, α-Ketoglutarat und Oxalacetat sowie Malonat bewirken in nitrathaltigem Milieu eine größere Zunahme des Trockengewichtes und der Nitratabsorption als in ammonhaltigem Medium. Umgekehrt verhal-

ten sich Succinat, Malat und Fumarat, die die Aufnahme von Ammoniumionen stärker beschleunigen als die der Nitrationen. Pyruvat scheint nur geringe Wirkung auf den Pilzorganismus auszuüben.

Die meisten der untersuchten Säuren fördern die Ionenabsorption stärker als die Erntegewichte. Davon ausgenommen sind α -Ketoglutarat und Oxalacetat, die ihrerseits das Wachstum stärker fördern als die Aufnahme von Ionen.

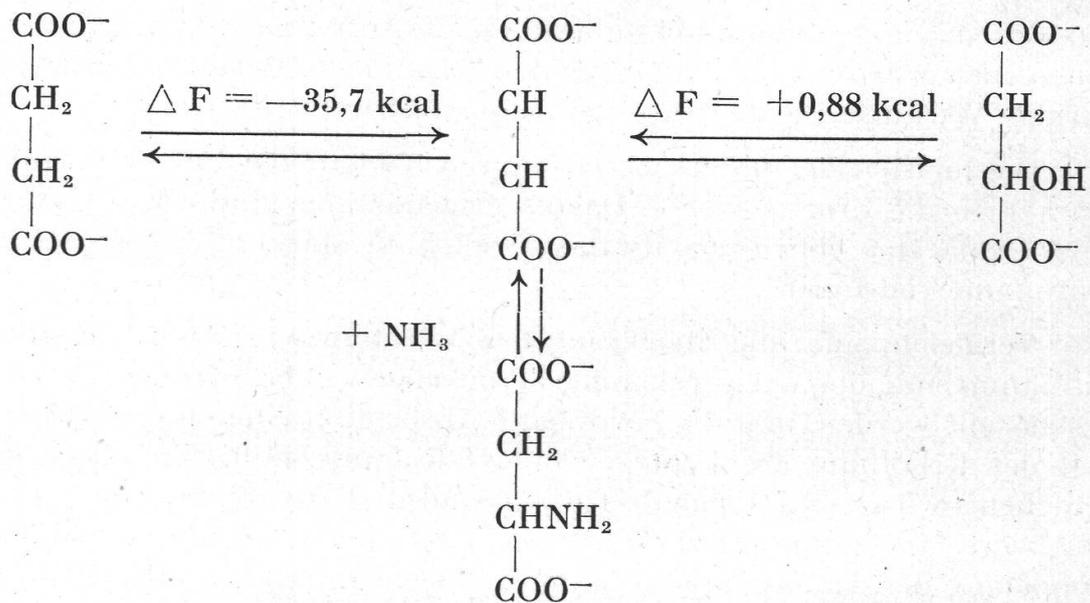
Vergleicht man die Steigerung der Nitrat- bzw. Ammoniumionenaufnahme mit der entsprechenden Trockengewichtszunahme, so kann festgestellt werden, daß die bevorzugte Absorption einer Ionenart meist mit der Erhöhung des Erntegewichtes zusammenfällt. Zunahme von Trockengewicht und Ionenabsorption sind also korreliert. Die bemerkenswerte Ausnahme von dieser Regel bildet die Fumarsäure: einer Verdoppelung der Ammoniumaufnahme steht ein praktisch unbeeinflußtes Trockengewicht gegenüber.

4. Diskussion

Ein auffälliges Resultat dieser Untersuchungsreihe ist die auf drei organische Säuren (Fumarat, Malat und Succinat) beschränkte starke Förderung der Ammoniumaufnahme. Während Malat und Succinat auch die Nitratverwertung deutlich erhöhen, ist bei Fumarat kaum eine solche Wirkung festzustellen. Dabei ist zu beachten, daß die beiden N-Quellen einzeln und nicht zusammen geprüft wurden, es kann sich somit nicht um Konkurrenzerscheinungen handeln. Es liegt nahe, die stark fördernde Wirkung der Fumarsäure auf die Verwertung von Ammoniakstickstoff durch die Annahme einer direkten Synthese von Asparaginsäure aus Fumarsäure und Ammoniak zu erklären. Das bei Zugabe von Fumarat zusätzlich gebundene Ammoniak entspricht annähernd der gebundenen Fumaratmenge, wie folgende Rechnung zeigt:

100 ml Versuchslösung enthalten $1 \cdot 10^{-3}$ Mol Fumarat, durch dieses könnten 15 mg NH_4^+ gebunden werden. Die beobachtete Steigerung der Ammoniumabsorption beträgt in einem Fall 10,4 mg, im andern Fall 11,4 mg (Tabelle 10).

Malat und Succinat, welche ebenfalls die Ammoniumabsorption stark steigern (Malat in einem Versuch sogar stärker als Fumarat [14,1 mg, gegenüber einer möglichen Steigerung von 15 mg]), könnten dadurch wirksam sein, daß sie unmittelbar in Fumarat übergeführt werden können. Die Fermente, welche diese Reaktionen katalysieren, sind in *Aspergillus niger* nachgewiesen worden (R a m a k r i s h n a n, 1954 u. 1955).



(ΔF -Werte für 0,2 Atm. O₂; 0,05 Atm. CO₂; 0,01 m Konz.)

α -Ketoglutarinsäure wirkt bedeutend schwächer auf die Ammoniumabsorption als die drei erwähnten Säuren: Zitrat, Oxalacetat und Pyruvat nur noch schwach oder überhaupt nicht mehr. α -Ketoglutarinsäure kann wie Fumarsäure ebenfalls aminiert werden, diese reduktive Aminierung ist jedoch stark endergon, so daß die geringere Wirkung gegenüber Fumarsäure bzw. Succinat und Malat verständlich ist.

Auffällig erscheint, daß *Malonsäure nicht nur keinerlei hemmende Wirkung* hat, sondern zum mindesten bei Nitraternahrung deutlich fördernd wirkt; Nitratabsorption und Trockengewicht sind um 30 % bzw. 20 % erhöht gegenüber den Kontrollen. Bei Verwendung von Ammoniumsulfat als N-Quelle ist keine besondere Förderung zu erkennen. Die *in vitro* kompetitive Hemmung der Bernsteinsäuredehydrase durch Malonsäure würde erwarten lassen, daß durch Malonatzugabe der Tricarbonsäurezyklus und dementsprechend auch indirekt die Nitratreduktion und Ammoniakassimilation beeinträchtigt wird.

Die Versuchsergebnisse lassen aber erkennen, daß die an Fermentpräparaten gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Stoffwechsel intakter Organismen übertragen werden dürfen. Wie die Ergebnisse von Challenger et al. (1927) zeigen, könnte Malonsäure vielleicht auch mit dem Tricarbonsäurekreislauf bzw. mit einzelnen seiner Glieder in Beziehung stehen. Sie fanden nämlich im Kulturmedium eines *Aspergillus niger*-Stammes, dem Zitronensäure geboten wurde, neben andern Substanzen auch Malonsäure. Die ebenfalls aufgefundene Acetondicarbonsäure könnte die Verbindung mit der Zitronensäure herstellen.

Die Förderung der Nitratabsorption und sicher auch der Nitratassimilation durch alle untersuchten Säuren, mit Ausnahme von Fumar-

säure und Brenztraubensäure, kann ohne weitere Versuche zunächst nur hypothetisch gedeutet werden. Die Absorptionserhöhung ist wohl nur eine Folge einer verstärkten Assimilation, da das Trockengewicht absolut bedeutend stärker zunimmt, als der Steigerung der Nitratabsorption entspricht. Die Nitratassimilation muß als Reduktionsvorgang an ein wasserstofflieferndes Enzymsystem gebunden sein, das seinerseits nur von der Atmung her kontinuierlich gespeisen werden kann.

Die Zugabe von Säuren des Tricarbonsäurezyklus kann nun auf die Atmung bekanntlich katalytisch wirken. Während so die Förderung der Nitratabsorption bei Zugabe organischer Säuren erklärt werden kann, bleibt aber noch die Frage offen, warum in einzelnen Fällen die Nitratabsorption, in andern hingegen wieder die Ammoniumabsorption stärker erhöht wird. Bevor die Ergebnisse genauer Untersuchungen über das Schicksal der zugegebenen organischen Säuren vorliegen, dürfte es vor- eilig sein, hierüber Hypothesen aufzustellen.

Fumarsäure ist die einzige Säure, bei welcher einer sehr starken Steigerung der N-Aufnahme keinerlei Trockengewichtszunahme, sondern eine geringe Abnahme gegenübersteht. Möglicherweise kann Asparaginsäure nicht mit genügender Geschwindigkeit weiter verarbeitet werden, d. h. an Umaminierungen sich beteiligen, vielleicht wird sogar ein Teil aus dem Mycel ausgeschieden. Eigentümlich ist bei Fumarsäurezusatz zu nitrathaltigen Lösungen die geringe oder ausbleibende Steigerung der Nitratabsorption. Es wäre denkbar und experimentell zu prüfen, daß dabei eine Konkurrenz um den in der Zelle zur Verfügung stehenden Wasserstoff eine Rolle spielt. *Virtanen* (1952) hat auf die Bedeutung eines genügend tiefen Redoxpotentials für die Nitratreduktion verwiesen, wobei bei höheren Pflanzen Ascorbinsäure in dieser Beziehung als wichtig nachgewiesen wurde. In diesen Zusammenhang könnte auch die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene Erscheinung gehören, wonach eine Verringerung der Wasserstoffionenkonzentration auf $pH\ 7$ eine Hemmung der Nitratassimilation bewirken kann: dieser Effekt ist möglicherweise ebenfalls eine Folge des vergrößerten rH .

Angesichts der Förderung der Nitratabsorption durch die meisten untersuchten organischen Säuren ist es auffallend, daß deren Zugabe regelmäßig die *Gluconsäureproduktion hemmt*. Diese Hemmung könnte als Resultat einer Konkurrenz zwischen verschiedenen Abbauwegen für Glucose angesehen werden. Wird durch Zufuhr von Säuren des Tricarbonsäurezyklus dessen Ablauf beschleunigt, so könnte sich das in einer Verringerung der Geschwindigkeit der «direkten» Glucoseoxydation auswirken. Die aufgefundene Gegenläufigkeit von Nitratabsorption und Gluconsäureproduktion im Falle der Zugabe organischer Säuren deutet nun offensichtlich, wie andere schon erwähnte Gründe, darauf hin, daß die Gluconsäurebildung nicht direkt mit der Nitratreduktion verbunden ist bzw. auf diese als Energiequelle angewiesen ist. Vielmehr muß der

Zusammenhang so gesehen werden, daß die Nitratreduktion Bedingungen schafft oder unter solchen Bedingungen nur abläuft, die eine Gluconsäurebildung ermöglichen oder begünstigen.

VI. Zusammenfassung

1. An Schüttelmycel aus einer Einsporkultur von *Aspergillus niger* wurde die Nitrataufnahme und -assimilation durch Bestimmung des Nitratgehaltes von Kulturflüssigkeit und Mycel verfolgt.
2. Bei dem von uns verwendeten Pilzstamm verlaufen Nitratabsorption und -assimilation weitgehend parallel. Der Nitratgehalt des Mycels kann während der Phase intensiven Wachstums etwas zunehmen, bleibt aber immer niedrig.
3. Das Mycel bildet unter den gewählten Bedingungen bei Nitraternahrung Gluconsäure. Die Säurebildung hört nach Erreichung eines pH von 3 auf. Nitrataufnahme und Mycelwachstum gehen unabhängig davon weiter.
4. Wird das pH der Kulturlösung eines intensiv wachsenden Mycels durch Zugabe von $CaCO_3$ von 3 auf 7 erhöht, so werden Nitrataufnahme und -assimilation stark gehemmt. Erscheint wieder freie Säure im Medium, so beginnen auch wieder Nitrataufnahme und -assimilation, und zwar mit fast gleicher Intensität bei pH 6 bis 7 wie bei pH 3.
5. Nitrathaltiges Mycel gibt in nitratfreie Lösung NO_3^- ab. Bei niedriger Wasserstoffionenkonzentration (pH 7) wird mehr Nitrat abgegeben als bei hoher (pH 3,4). Die Menge an «gespeichertem» NO_3^- ist aber trotz verschiedenem pH letztlich in beiden Lösungen gleich.
6. Aus diesen Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß bei dem von uns verwendeten Stamm die Nitratabsorption weitgehend durch die Assimilation bestimmt wird und weniger durch Veränderung der Plasmagrenzschichten.
7. Die Gluconsäureproduktion durch den verwendeten Pilzstamm ist an Nitraternahrung gebunden. Bei $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle wird keine Gluconsäure gebildet. Diese Korrelation kann nicht auf eine physiologische Alkalinität des KNO_3 zurückgeführt werden, da sofort mit Beginn der Nitrataufnahme auch freie Gluconsäure nachweisbar wird. Die Nitratreduktion muß im Mycel unter solchen Bedingungen verlaufen, die auch die «direkte» Glucoseoxydation begünstigen. Wie eng Nitratassimilation und Gluconsäureproduktion aneinander gebunden sind, kann erst durch Versuche ermittelt werden, in denen auch die Säureproduktion quantitativ verfolgt wird

Es wird darauf hingewiesen, daß die intermediäre Anhäufung von Gluconsäure oder auch anderer organischer Säuren die Bildung von «Extrakohlensäure» durch die Nitratreduktion hemmen muß.

8. Die Salze von Säuren des Tricarbonsäurezyklus fördern in 0,01 molarer Konzentration die Nitrat- oder Ammonsalzabsorption oder beide zusammen. Mit einer Ausnahme (Fumarat) vergrößert sich mit der erhöhten Absorption auch das Trockengewicht. Fumarat, Succinat und Malat fördern die Ammoniumsalzaufnahme stärker als die Nitratabsorption.

Zitrat, α -Ketoglutarat, Oxalacetat und Malonat fördern umgekehrt die Nitratabsorption und das Wachstum in nitrathaltiger Lösung stärker als die Ammonsalzabsorption.

Es wird versucht, eine Deutung dieser Ergebnisse unter der Annahme zu geben, daß der Tricarbonsäurezyklus sowohl die Kohlenstoffgerüste für die primären Aminisierungen liefert wie auch als Energiequelle für die Nitratreduktion dient. Die starke Förderung der Ammonsalzverwertung durch Fumarat und weniger starke durch Succinat und Malat spricht für die Wirksamkeit einer Aspartase im Mycel.

Tabelle 5

Einfluß von Malonat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 1

N-Quelle	Malonat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	15,7	239,0 ± 35,3	3	100
		pH	5,3	1,78		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	9,0		
		Absorption mg	0	27,0 ± 0,03		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+ Malonat	Trockengewicht mg	15,7	254,1 ± 15,3	4	106
		pH	6,3	2,59		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	5,0		
		Absorption mg	0	31,0 ± 5,3		
KNO_3	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	15,7	170,3 ± 22,3	4	100
		pH	6,0	2,65		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	84,0		
		Absorption mg	0	40,0 ± 9,2		
KNO_3	+ Malonat	Trockengewicht mg	15,7	215,1 ± 18,5	4	126
		pH	7,1	3,04		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	69,1		
		Absorption mg	0	54,9 ± 7,5		

Versuch 2

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	10,9	95,7 ± 24,1	4	100
		pH	5,0	3,03		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	9,0		
		Absorption mg	0	27,0 ± 0,66		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+ Malonat	Trockengewicht mg	10,9	99,3 ± 9,5	4	104
		pH	5,35	3,23		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	7,3		
		Absorption mg	0	28,7 ± 0,3		
KNO_3	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	18,4	163,5 ± 50,8	4	100
		pH	6,79	3,35		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	77,7		
		Absorption mg	0	46,3 ± 0,99		
KNO_3	+ Malonat	Trockengewicht mg	18,4	180,5 ± 50,3	4	110
		pH	6,7	3,47		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	64,1		
		Absorption mg	0	59,9 ± 6,1		
						129

Versuch 3

N-Quelle	Malonat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg pH	24,0 6,26	348,1 ± 40,6 2,14	4	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Malonat	Trockengewicht mg pH	24,0 3,2	369,0 ± 47,2 2,01	4	106
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg pH	24,0 6,14	271,0 ± 43,5 3,34	4	100
KNO ₃	+ Malonat	Trockengewicht mg pH	24,0 4,35	341,5 ± 39,4 4,04	4	126

Tabelle 6

Einfluß von Zitrat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 4

N-Quelle	Zitrat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg pH NH ₄ ⁺ /Kolben mg Absorption mg	14,8 5,3 36,0 0	365,6 ± 24,2 1,75 8,3 27,7 ± 2,8	4	100 100
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Zitrat	Trockengewicht mg pH NH ₄ ⁺ /Kolben mg Absorption mg	14,8 6,2 36,0 0	374,5 ± 39,1 2,19 4,4 31,6 ± 3,1	4	102 114
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg pH NO ₃ ⁻ /Kolben mg Absorption mg	14,8 6,1 124,0 0	301,1 ± 14,1 2,67 48,9 74,1 ± 4,5	4	100 100
KNO ₃	+ Zitrat	Trockengewicht mg pH NO ₃ ⁻ /Kolben mg Absorption mg	14,8 6,2 124,0 0	355,8 ± 26,6 2,5 27,9 96,1 ± 1,4	3	118 130

Versuch 5

N-Quelle	Zitrat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	25,6	350,1 ± 27,7	3	100
		pH	5,3	1,86		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	5,6	100	
		Absorption mg	0	30,4 ± 0,75		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Zitrat	Trockengewicht mg	25,6	360,0 ± 5,4	3	103
		pH	6,2	1,75		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	2,2	111	
		Absorption mg	0	33,8 ± 1,4		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	25,6	339,1 ± 16,7	4	100
		pH	6,1	2,84		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	74,4	100	
		Absorption mg	0	49,6 ± 6,9		
KNO ₃	+ Zitrat	Trockengewicht mg	25,6	463,6 ± 36,4	4	137
		pH	7,4	3,12		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	50,3	149	
		Absorption mg	0	73,7 ± 9,8		

Tabelle 7

Einfluß von α -Ketoglutarat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 6

N-Quelle	α -Keto- glutarat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	14,8	365,6 ± 24,2	4	100
		pH	5,3	1,75		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	8,3	100	
		Absorption mg	0	27,7 ± 2,8		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ α -Keto- glutarat	Trockengewicht mg	14,8	533,6 ± 39,1	4	146
		pH	7,3	2,21		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	2,1	122	
		Absorption mg	0	33,9 ± 1,3		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	14,8	301,1 ± 14,1	4	100
		pH	6,1	2,67		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	48,9	100	
		Absorption mg	0	74,1 ± 4,5		
KNO ₃	+ α -Keto- glutarat	Trockengewicht mg	14,8	484,5 ± 31,5	4	161
		pH	7,3	3,41		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	25,5	132	
		Absorption mg	0	98,5 ± 2,1		

Tabelle 8

Einfluß von Succinat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 7

N-Quelle	Succinat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	10,9	95,7 ± 24,1	4	100
		pH	5,0	3,03		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	9,0		
		Absorption mg	0	27,0 ± 0,66		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Succinat	Trockengewicht mg	10,9	123,7 ± 2,6	3	129
		pH	5,0	3,26		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	0,5		
		Absorption mg	0	35,5 ± 0,4		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	18,4	163,5 ± 50,8	4	100
		pH	6,79	3,35		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	77,7		
		Absorption mg	0	46,3 ± 0,99		
KNO ₃	+ Succinat	Trockengewicht mg	18,4	190,5 ± 21,9	6	116
		pH	5,92	3,56		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	61,6		
		Absorption mg	0	62,4 ± 9,1		

Versuch 8

(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	23,4	316,3 ± 50,5	3	100
		pH	5,0	1,67		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	11,6		
		Absorption mg	0	24,4 ± 0,03		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Succinat	Trockengewicht mg	23,4	410,6 ± 25,7	3	130
		pH	6,0	1,95		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	0,8		
		Absorption mg	0	35,2 ± 0,35		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	23,4	200,8 ± 10,3	4	100
		pH	6,13	2,7		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	79,0		
		Absorption mg	0	45,0 ± 2,3		
KNO ₃	+ Succinat	Trockengewicht mg	23,4	244,0 ± 41,5	4	121,5
		pH	6,3	2,85		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	67,3		
		Absorption mg	0	56,7 ± 2,7		

Versuch 9

N-Quelle	Succinat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	43,6	400,5 ± 45,2	4	100
		pH	5,01	2,25		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	15,6		
		Absorption mg	0	20,4 ± 1,7		100
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Succinat	Trockengewicht mg	43,6	512,6 ± 82,2	4	128
		pH	6,2	3,25		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	2,9		
		Absorption mg	0	33,1 ± 0,7		162

Tabelle 9

Einfluß von Malat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 10

N-Quelle	Malat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Säure	Trockengewicht mg	51,6	426,8 ± 27,0	3	100
		pH	4,5	2,02		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	25,5		
		Absorption mg	0	10,5 ± 2,8		100
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Malat	Trockengewicht mg	51,6	551,1 ± 12,7	3	129
		pH	5,95	2,86		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	10,9		
		Absorption mg	0	25,1 ± 0,75		239
KNO ₃	Kontrolle ohne Säure	Trockengewicht mg	51,6	343,4 ± 27,4	4	100
		pH	4,55	3,64		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	87,2		
		Absorption mg	0	36,8 ± 5,3		100
KNO ₃	+ Malat	Trockengewicht mg	51,6	422,0 ± 34,8	4	123
		pH	3,6	3,35		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	62,0		
		Absorption mg	0	62,0 ± 10,1		168

Versuch 11

N-Quelle	Malat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	43,6	$400,5 \pm 45,2$	4	100
		pH	5,01	2,25		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	15,6		
		Absorption mg	0	$20,4 \pm 1,7$		100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+ Malat	Trockengewicht mg	43,6	$357,2 \pm 35,0$	4	132
		pH	6,15	2,1		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	11,9		
		Absorption mg	0	$24,1 \pm 1,3$		241
KNO_3	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	43,6	$287,0 \pm 13,3$	4	100
		pH	6,1	3,15		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	69,7		
		Absorption mg	0	$54,3 \pm 6,6$		100
KNO_3	+ Malat	Trockengewicht mg	43,6	$317,0 \pm 2,7$	4	110
		pH	5,7	3,4		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	44,4		
		Absorption mg	0	$79,6 \pm 3,5$		147

Versuch 12

KNO_3	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	13,3	$208,8 \pm 28,5$	4	100
		pH	4,55	2,19		
KNO_3	+ Malat	Trockengewicht mg	13,3	$427,8 \pm 41,3$	4	140
		pH	3,0	1,97		

Tabelle 10

Versuch 13 Einfluß von Pyruvat auf Salzaufnahme und Wachstum

N-Quelle	Pyruvat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	51,6	426,8 ± 27,0	3	100
		pH	4,5	2,02		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	25,5	100	
		Absorption mg	0	10,5 ± 2,8		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Pyruvat	Trockengewicht mg	51,6	398,3 ± 23,3	3	93
		pH	6,65	2,92		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	25,1	103	
		Absorption mg	0	10,9 ± 0,7		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	36,6	287,0 ± 13,3	4	100
		pH	6,1	3,15		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	69,7	100	
		Absorption mg	0	54,3 ± 6,6		
KNO ₃	+ Pyruvat	Trockengewicht mg	36,6	187,5 ± 37,9	4	65
		pH	6,95	3,38		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	71,8	96	
		Absorption mg	0	52,2 ± 4,7		

Tabelle 11

Versuch 14 Einfluß von Fumarat auf Salzaufnahme und Wachstum

N-Quelle	Fumarat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	30,2	370,1 ± 29,6	4	100
		pH	4,4	2,07		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Fumarat	Trockengewicht mg	30,2	353,6 ± 20,6	4	95,5
		pH	2,21	1,9		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	30,2	439,3 ± 70,4	4	100
		pH	6,7	3,14		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	55,5	100	
		Absorption mg	0	68,5 ± 4,0		
KNO ₃	+ Fumarat	Trockengewicht mg	30,2	413,2 ± 60,7	4	94
		pH	2,2	3,08		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	54,1	102	
		Absorption mg	0	69,9 ± 7,5		

Versuch 15

N-Quelle	Fumarat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	51,6	426,8 ± 27,0	3	100
		pH	4,5	2,02		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	25,5		100
		Absorption mg	0	10,5 ± 2,8		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Fumarat	Trockengewicht mg	51,6	415,8 ± 7,6	3	97
		pH	5,85	2,76		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	14,1	3	208
		Absorption mg	0	21,9 ± 0,65		
KNO ₃	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	36,6	287,0 ± 13,3	4	100
		pH	6,1	3,15		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	69,7		100
		Absorption mg	0	54,3 ± 6,6		
KNO ₃	+ Fumarat	Trockengewicht mg	36,6	261,0 ± 19,4	4	91
		pH	6,0	3,19		
		NO ₃ ⁻ /Kolben mg	124,0	61,8		115
		Absorption mg	0	62,2 ± 1,7		

Versuch 16

(NH ₄) ₂ SO ₄	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	40,1	269,6 ± 55,7	4	100
		pH	5,09	2,79		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	26,0		100
		Absorption mg	0	10,0 ± 2,2		
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ Fumarat	Trockengewicht mg	40,1	247,5 ± 36,1	4	92
		pH	6,1	2,06		
		NH ₄ ⁺ /Kolben mg	36,0	15,6		204
		Absorption mg	0	20,4 ± 5,4		

Tabelle 12

Einfluß von Oxalacetat auf Salzaufnahme und Wachstum

Versuch 17

N-Quelle	Malonat		Ausgangsmessungen	nach 24 Stunden Mittelwert ± Streuung	Zahl der Parallelkolben	Mittelwert in % der Testkultur
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	12,6	355,6 ± 15,9	3	100
		pH	6,1	1,86		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	6,7		
		Absorption mg	0	29,3 ± 0,81		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+ Malonat	Trockengewicht mg	12,6	442,3 ± 53,0	5	124
		pH	5,9	1,97		
		NH_4^+ /Kolben mg	36,0	2,7		
		Absorption mg	0	33,3 ± 1,7		
KNO_3	Kontrolle ohne Zusatz	Trockengewicht mg	12,6	316,8 ± 24,1	3	100
		pH	5,93	2,48		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	76,2		
		Absorption mg	0	47,8 ± 2,6		
KNO_3	+ Malomat	Trockengewicht mg	12,6	456,0 ± 6,4	5	144
		pH	5,98	3,73		
		NO_3^- /Kolben mg	124,0	59,4		
		Absorption mg	0	64,6 ± 3,9		

Tabelle 13

Zunahme der Erntegewichte und Ionenabsorption in nitrat- bzw. ammonhaltigem Medium bei Zugabe von Salzen organischer Säuren, berechnet in Prozenten der Testkulturen ohne Säurezugabe

Zugabe von Salzen organischer Säuren	Versuchsnummer	Trockengewicht		Ionenabsorption	
		mit KNO ₃	mit (NH ₄) ₂ SO ₄	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
Zitrat	5	37	3	49	11
	4	18	2	30	14
Mittel		27,5	2,5	39,5	12,5
α -Ketoglutarat	6	61	46	32	22
Succinat	7	16	29	35	31
	8	21,5	30	26	44
	9	— ¹	28	— ¹	62
Mittel		19	29	30,5	46
Fumarat	14	—6	—4,5	2	
	15	—9	—3	15	108
	16	— ¹	—8	— ¹	104
Mittel		—7,5	—5	8,5	106
Malat	10	23	29	68	139
	11	10	32	47	141
	12	— ²	40	— ²	— ²
Mittel		16,5	34	57,5	140
Malonat	2	10	4	29	6
	1	26	6	37	15
	3	26	6	— ³	— ³
Mittel		21	8	33	10,5
Pyruvat	13	—35	—7	—4	3
Oxalacetat	17	44	24	35	14

¹ Versuch nur mit (NH₄)₂SO₄.

² Versuch nur mit (NH₄)₂SO₄ (Messung des Trockengewichtes).

³ Versuch nur mit Trockengewichtsmessung.

VII. Literaturverzeichnis

- Abelson, P., und Vogel, H., 1955. Aminoacid Biosynthesis in *Torulopsis utilis* and *Neurospora crassa*. J. of Biol. Chem., **213**, 355.
- Baas-Becking, N., und Perks, J., 1926. Studies on Growth: Part 1. The point binomial. Stanford Univ. Press.
- Bach, D., und Desbordes, D., 1933. La transformation directe des nitrates en ammoniacque par le mycélium des champignons inférieurs. C. rend. Acad. Sc. Paris, **197**, 1463 und 1772.
- B. D. H., 1946. Book of organic Reagents for analytical use. The British Drug Houses Ltd., London.
- Bernhauer, K., und Duda, F., 1928. Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*. 4. Mitt.: Die Bedeutung der Mycelentwicklung für die Säurebildung. Biochem. Zeitschr., **197**, 278.
- Boer, S., 1940. Nitratassimilation durch *Aspergillus niger*. Proc. roy. Acad. Amsterdam, **43**, 715.
- Brink, N., 1953. Beef Liver Glucose Dehydrogenase. 11. Inhibition Studies with Compounds Related to the Coenzymes. Acta chem. Scand., **7**, 1090.
- Bünning, E., 1934. Wachstum und Stickstoffassimilation bei *Aspergillus niger* unter dem Einfluß von Wachstumsregulatoren und von Vitamin B. Ber. dtsch. bot. Ges., **52**, 423.
- 1936. Über die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. Flora, N. F., **312**, 87.
- Burström, H., 1945. The Nitrate Nutrition of Plants. Ann. of roy. agricult. coll. of Sweden, **13**.
- Burkholder, P. R., und McVeigh, I., 1940 Growth of *Phycomyces blakesleanus* in Relation to Varied Environmental Conditions. Am. J. Bot., **27**, 634.
- Challenger, F., und Subramaniam, V., und Walker, T. K., 1927. Mechanismus der Bildung von Zitronensäure und Oxalsäure aus Zuckern durch *Aspergillus niger*. J. chem. soc. (London), **200**, 3044.
- Cleland, W., und Johnson, M., 1954. Traces Experiments on the Mechanism of Citric Acid Formation by *Aspergillus niger*. J. of Biol. Chem., **208**, 679.
- Cohen, S., 1954. Other Pathways of Carbohydrate Metabolism. In: Chemical Pathways of Metabolism, von Greenberg, Acad. Press, New York.
- Cramer, F., 1953. Papierchromatographie. Verl. Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße.
- Fiebrede, C., und Knight, S., 1953. Die Oxydation von Glucose durch *Penicillium chrysogenum*. J. bacter., **66**, 170.
- Foster, J., 1949. Chemical activities of Fungi. Acad. Press, New York.
- und Carson, S., 1950. Von 3 C₂-Körpern ausgehende Bildung von Zitronensäure durch *Aspergillus niger*. J. amer. chem. soc., **72**, 1865.
- Franke, W., und Lorenz, F., 1937. Zur Kenntnis der sog. Glucoseoxydase. Liebigs Ann., **532**, 1.
- und Deffner, M., 1939. Der Abbau der Zitronensäure durch Bakterien. Liebigs Ann., **541**, 117.
- 1941. Die Oxyhydrasen. In: Bamann und Myrbäck: Methoden der Fermentforschung. Verl. Thiesen, Leipzig, 2385.
- Itzerott, D., 1936. Über die Bedingungen der Stickstoffaufnahme, vor allem der Nitrataufnahme, bei *Aspergillus niger*. Flora, **31**, 60.
- Keilin, F., und Hartree, E., 1946/47. Prosthetic Group of Glucose Oxydase (Notatin). Nature, **157**, 801.
- Kessler, E., 1953. Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. Flora, **140**, 1.

- Klein, G., und Eigner, A., und Müller, H., 1926. Nitratassimilation bei Schimmelpilzen. Z. phys. Chem., **159**, 201.
- Knobloch, H., 1941. Über die Umwandlung von Acetaten durch *Aspergillus niger* in submerser Kultur. Biochem. Z., **307**, 278.
- und Mayer, H., 1941. Über die Bildung von *d*-Glucon-, *d*-Mannon- und *d*-Galaktonsäure durch *Aspergillus niger* in Schüttelkulturen. Biochem. Z., **307**, 285.
- Knoop, F., 1910. Über den physiologischen Abbau der Säuren und die Synthese einer Aminosäure im Tierkörper. Z. physiolog. Chemie (Berlin), **67**, 489.
- Leonian, L., und Lilly, V. G., 1940. Studies on the Nutrition of Fungi: Factors Influencing the Growth of some Thiamin Requiring Fungi. Am. J. Bot., **27**, 18.
- Löffler, J. E., und Reichl, E. R., 1953. Methode zum Nachweis und Bestimmung organischer Säuren in Papierchromatogrammen. Mikroch. Acta, **79**.
- Molliard, M., 1922. Influence de la nutrition azotée sur l'acidité des plantes supérieures. C. rend. soc. Biol., **87**, 221.
- 1924. Cycle de l'azote. In: Nutrition de la plante. 4. Paris (Octave Doin).
- Perquin, L., 1938. Bijdrage tot de kennis der oxydativen dissimilatie van *Aspergillus niger* (van Tieghem). Dissertation, Delft.
- Pirschle, K., 1930. Nitrate und Ammonsalze als Stickstoffquelle für höhere Pflanzen bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration. Planta, **9**, 84.
- und Mengdehl, H., 1931. Ionenaufnahme aus Salzlösungen durch die höhere Pflanze. Jahrb. f. wiss. Bot., **74**, 297.
- Pregl-Roth, F. und H., 1935. Die quantitative organische Mikroanalyse. Verlag. Jul. Springer, Berlin.
- Ramakrishnan, C., 1954. The Tricarboxylic Acid Cycle in *Aspergillus niger*. Enzymologia (Den Haag), **17**, 169.
- und Martin, S., 1955. Isocitric-dehydrogenase in *Aspergillus niger*. Arch. of biochem. and biophys., **55**, 403.
- Rennerfeld, E., 1934. Untersuchungen über die Salzaufnahme bei *Aspergillus niger*. Planta, **22**, 221.
- Rippel, K., 1931. Quantitative Untersuchungen über die Abhängigkeit der Stickstoffassimilation von der Wasserstoffionenkonzentration bei einigen Pilzen. Arch. Mikrobiol., **2**, 72.
- Roine, P., 1947. On the Formation of Primary Amino Acids in the Protein Syntheses in Yeast. Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A 11. Chem., **26**, 1.
- Short, W., und Sykes, G., u. a., 1942. Notatin: an Antibacterial Glucose-aero-dehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling. Nature, **150**, 634.
- Virtanen, A. I., und Csaky, T. Z., 1949. On the Formation of Amino Acids and Proteins in *Torula utilis* on Nitrate Nutrition. Bioch. and biophys. Acta, **3**, 208.
- und Rautanen, N., 1952. Nitrogen Assimilation. In: The Enzymes. J. Summer und K. Myrbäck. Vol. 11, Part 2. Acad. Press, New York.
- Warburg, O., und Negelein, E., 1920. Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. Biochem. Z., **110**, 66.
- Yamagata, S., 1934. Über den Einfluß der Stickstoffquelle auf den Gaswechsel des Schimmelpilzes. Beiträge zur Physiologie der Nitratassimilation. Acta Phytotech., **8**, 117.