

Über den Stoffwechsel des Schimmelpilzes *Aspergillus niger*.

I. Abbau der Citronensäure*);

von *Michael Deffner*.

Mit 1 Figur im Text.

[Aus dem Institut für Chemie und Landwirtschaft „Nikolaos Kanellopoulos“ Abt. f. Org. Chemie u. Biochemie Piräus, Griechenland.]

(Eingelaufen am 4. Juni 1942.)

Nach Walker und Mitarbeitern soll das Primärprodukt des Citratabbaus durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger*¹⁾ wie auch durch das *Bacterium pyocyaneum*²⁾ die Acetondicarbonsäure sein, die weiterhin über Malonsäure zu Essigsäure, teilweise auch zu Bernsteinsäure abgebaut wird. Martius³⁾ hat für den tierischen Organismus die primäre Umlagerung der Citronensäure über die *cis*-Aconitsäure in Isocitronensäure und deren Abbau über die Oxalbernsteinsäure zu α -Ketoglutarsäure und Bernsteinsäure bewiesen.

Vor 3 Jahren habe ich im Wielandschen⁴⁾ Institut ein neues Schema für den *anaeroben* Abbau der Citronensäure durch Bakterien aufgestellt, das auch für das *B. pyocyaneum* gilt, wie gemeinsame Versuche mit Franke⁵⁾ gezeigt haben. An der Spitze dieses Schemas steht der anaerobe Zerfall des Citronensäure-Moleküls in Oxalessigsäure und Essigsäure. Dieser Abbau wurde später durch Brewer und Werkman auch für den anaeroben Abbau der Citronensäure durch

*) Heinrich Wieland zum 65. Geburtstag in Verehrung und Dankbarkeit zugeeignet.

1) Th. K. Walker, V. Subramaniam u. F. Challenger, Soc. 1927, 3044.

2) Butterworth u. Walker, Bio. J. 23, 926 (1929).

3) C. Martius, H. 247, 104 (1937); 257, 29 (1938).

4) M. Deffner, A. 536, 44 (1938).

5) M. Deffner u. W. Franke, A. 541, 85 (1939).

*Aerobacter indologenes*¹⁾ bestätigt. Er gilt auch für den *aeroben* Abbau der Citronensäure durch Bakterien, wie unsere Versuche²⁾ gezeigt haben.

Da die Ergebnisse von Walker und Mitarbeitern bei *B. pyocyaneum* von uns widerlegt wurden und da auch der früher im allgemeinen angenommene Abbau der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure nach Martius nicht zutrifft, war nur noch zu untersuchen, ob etwa der Abbau der Citronensäure durch Schimmelpilze über die Acetondicarbonsäure verläuft, wie Walker annimmt, oder auf einem anderen Weg. Inzwischen wurde von der Eulerschen Schule³⁾ und von Lynen und Neciullah⁴⁾ im Wielandschen Institut bewiesen, daß auch bei der *Hefe* der Citronensäure-Abbau über die Isocitronensäure verläuft.

Meine Versuche beweisen nun, wie vorweggenommen sei, daß bei den Schimmelpilzen bzw. bei *Aspergillus niger* der Citronensäure-Abbau über die Isocitronensäure verläuft und nicht, wie Walker und Mitarbeiter angenommen haben, über die Acetondicarbonsäure.

Züchtung der Pilze. — Methodik.

Ich habe nicht mit wachsenden Pilzen gearbeitet wie Walker, um dem Einwand, der sich allgemein gegen die Methode des „Verwendungsstoffwechsels“ erheben läßt, zu entgehen, daß nämlich irgendwelche faßbaren Abbauprodukte nicht direkt aus der zugesetzten C-Quelle stammen, sondern indirekt aus primär daraus aufgebauten Zellsubstanzen (z. B. Aminosäuren).

Zu den Versuchen wurden verschiedene Stämme von *Aspergillus niger* verwendet*). Sie wurden auf einer Nährlösung gezüchtet, die pro Liter

1) C. R. Brewer u. C. H. Werkman, *Enzymologia* 6, 273 (1939).

2) Vgl. Anm. 5, S. 191.

3) H. v. Euler, E. Adler, G. Günther u. L. Elliot, *Enzymologia* 6, 337 (1939).

4) F. Lynen u. N. Neciullah, *A.* 541, 203 (1939).

*) Für die freundliche und kostenlose Überlassung von 4 *Aspergillus niger*-Stämmen bin ich Herrn Prof. Dr. K. Bernhauer zu großem Dank verpflichtet.

3 g NH_4NO_3 , 1 g KH_2PO_4 , 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Spuren von Eisen enthielt (Lösung L); als C-Quelle wurde benutzt sowohl Citronensäure (20 g pro Liter der Lösung L. pH der Nährlösung = 2,3), als auch Glucose oder Rohrzucker (30 g pro Liter der Lösung L). Im letzten Fall wurde Weinsäure oder Citronensäure zugesetzt (2 g), um das pH der Lösung auf etwa 2,9—3,1 einzustellen. Die Nährlösung wurde mit frischer Sporensuspension geimpft.

Die Pilze wurden anfangs in kleinen Petri-Schalen bei 34—36° gezüchtet. Das junge, 3 Tage alte, weiße Pilzmycel wurde fein gemahlen und der Pilzbrei für die Versuche verwendet. Der Brei war sehr aktiv, aber die Menge des gebildeten Pilzes gering. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Pilze länger gezüchtet. Diese älteren, vor der Sporenbildung noch weißen Pilzmycele waren inaktiv. Ich habe es daher vorgezogen, die Pilze wie folgt zu züchten:

Rollflaschen von 6—7 Liter wurden mit 1,5 Liter Nährlösung beschickt und im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde mit einer kräftigen frischen Sporensuspension geimpft, mit Sauerstoff gefüllt und mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen. Die Flaschen wurden bei 34—38° stark geschüttelt, so daß die Nährflüssigkeit mit dem Sauerstoff gut in Berührung kam. Es muß dafür gesorgt werden, daß immer Sauerstoff vorhanden ist. Am zweiten und dritten Tag wurde daher der Sauerstoff erneuert und am vierten oder spätestens fünften Tag die Pilzmasse durch eine Glasfilternutsche (*Jena 26 G 2* oder *26 G 3*) abfiltriert, mit Wasser gewaschen und leicht ausgepreßt. Längere Zeit gezüchtete Pilze erwiesen sich als inaktiv. Es wurde nicht unter sehr streng sterilen Bedingungen gearbeitet, denn wegen des sauren pH der Lösung, der starken Impfung und der Spezifität der Nährlösung wurde nie eine Fremdinfection festgestellt. Die auf diese Weise gezüchteten Pilze bezeichne ich als *feuchte Pilzfäden*. Ausbeute aus 1,5 Liter Nährlösung 10—15 g *feuchte Pilzfäden* von 3—6 g Trockengewicht.

Es wurden auch Versuche angestellt mit Pilzen bzw. *feuchten Pilzfäden*, die direkt in kleinen Portionen in flüssige Luft oder flüssigen Stickstoff eingetragen wurden, analog den Versuchen von Lynen¹⁾ bei Hefe. Pilze, die inaktiv waren, wie z. B. solche, die längere Zeit gewachsen waren oder die im Eisschrank lange aufbewahrt worden waren, konnten nach dem Einfrieren in flüssiger Luft nicht aktiviert werden.

I. Präparative Versuche mit wachsenden Pilzen.

Zunächst habe ich die Versuche von Walker und Mitarbeitern²⁾ an drei verschiedenen Stämmen von *Asp. niger*

¹⁾ F. Lynen, A. 539, 1 (1939).

²⁾ Th. K. Walker, V. Subramaniam u. F. Challenger, Soc. 1927, 3044.

nachgearbeitet. Ich habe meine Versuche aber so durchgeführt wie die mit *B. pyocyanum*¹⁾. Aceton konnte ich nicht nachweisen. Oft habe ich auch die Nährflüssigkeiten, auf denen die Pilze kurze oder längere Zeit gezüchtet wurden, auf Aceton untersucht. In *keinem Falle* konnte ich mit Sicherheit Aceton nachweisen. Über die Ursache der Diskrepanz zwischen den Angaben der englischen Autoren und meinen kann ich, genau wie auch beim *B. pyocyanum*, im Augenblick nichts Bestimmtes aussagen. Ich glaube aber, daß es sich nicht um ein grundsätzlich verschiedenes Verhalten der verwendeten *Aspergillus*-Stämme handelt, und neige vielmehr zu der Annahme, daß den englischen Forschern vielleicht irgendein — nachträglich schwer feststellbarer — methodischer Fehler unterlaufen ist.

Walker und Mitarbeiter stützen ihr Citronensäure-Abbauschema besonders auf den Nachweis und die Bestimmung des Acetons. Nachdem mir dieser Nachweis nicht gelungen ist, bin ich der Ansicht, daß der Abbau der Citronensäure über die Acetondicarbonsäure nicht bewiesen ist. Es war daher zu untersuchen, wie nun die Citronensäure wirklich abgebaut wird.

II. Versuche mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor.

Die Versuche mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor habe ich angestellt, um aus der Geschwindigkeit der Reaktion mit verschiedenen Substraten Schlüsse auf die evtl. Zwischenprodukte des Citronensäureabbaus zu ziehen. Bei dieser Gelegenheit habe ich auch das Vorkommen verschiedener Dehydrasen untersucht.

Von den Dehydrasen des *Asp. niger* wurde bis jetzt näher untersucht nur die sog. *Glucoseoxydase* (Glucoseoxyhydrase). D. Müller²⁾ konnte diese isolieren. W. Franke und Lorenz³⁾ haben sie als *Dehydrase* (oxytrope) sichergestellt und W. Franke und M. Deffner⁴⁾ als *Gelbes*

¹⁾ M. Deffner u. W. Franke, A. 541, 85 (1939).

²⁾ Erg. Enzymforsch. 5, 259 (1936).

³⁾ A. 532, 1 (1937).

⁴⁾ A. 541, 117 (1939).

Ferment erkannt. Müller konnte in seinen *Glucoseoxydase*-präparaten auch *Äpfelsäuredehydrase* nachweisen.

A. *Versuchstechnik*. Die Methylenblauversuche wurden in evakuierten Thunberg-Röhren nach Bertho¹⁾ angestellt. Zur Herstellung vollkommen homogener Pilzsuspensionen wurden die *feuchten Pilzfäden* mit der entsprechenden Menge Phosphatpuffer in einem Porzellanmörser *leicht* verrieben. Der allgemeine Ansatz meiner Versuche war:

5,0 ccm Pilzsuspension in $\frac{m}{15}$ -Phosphatpuffer (pH 6,8—7,1).

1,0 ccm $\frac{m}{3}$ - oder $\frac{m}{10}$ -Substratlösung (als Na-Salz).

0,5 ccm Methylenblau 1 : 1000 (etwa $\frac{m}{375}$).

Gesamtvolumen 6,5 ccm; Versuchstemperatur 34°.

Als *Versuchsbeginn* wurde der Zeitpunkt, zu dem das evakuierte Röhren in den Thermostaten eingesenkt wurde, als *Entfärbungszeit t* — zwecks größerer Ablesegenauigkeit — die Zeitpunkte einer 90- und 100 proc. Entfärbung (Vergleichsskala) notiert. Die meisten Ansätze wurden doppelt ausgeführt.

B. *Mycelalter und -aktivität*. Von großer Bedeutung für die Dehydrasenaktivität ist das Alter des Pilzes. Ich habe vergleichend die Entfärbungszeit desselben Pilzstammes verschiedenen Alters mit und ohne Substrat gemessen. Als Substrate für diese Versuche wurden Milchsäure, Bernsteinsäure und Citronensäure benutzt.

Tabelle 1.

Die Versuche wurden *sofort* nach der Ernte des Pilzes angestellt. Pilzstamm 12 BAW Prag. *Versuch 1: 3 Tage* auf Citrat gezüchtet, *Ausbeute 9 g feuchte Pilzfäden* aus 1,5 Liter Nährlösung. *Versuch 2: Eine andere ähnliche Pilzzüchtung.*

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90%	100%	90%	100%
Pilztrockengewicht in Milligramm	60	60	30	30
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	9,5	12,5	31	47
„ „ „ mit Citronensäure	6,5	8,5	22	31
„ „ „ „ Milchsäure . .	2,0	3,0	7	11
„ „ „ „ Bernsteinsäure	5,5	7,0	23	32

¹⁾ Methodik vgl. Bertho-Graßmann, Bio. Praktikum, S. 152. Leipzig 1936.

Tabelle 2.

Dieselben Pilzzüchtungen wie in Tab. 1, nur wurden die Versuche angestellt, nachdem die feuchten Pilzfäden im Eisschrank 2 Tage lang aufbewahrt wurden.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90 ^o / _o	100 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o
Pilztrockengewicht in Milligramm	35	35	26	26
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	>240	—	>240	—
„ „ „ mit Citronensäure	>240	—	>240	—
„ „ „ „ Milchsäure . .	3	3,5	10,5	14
„ „ „ „ Bernsteinsäure	11	17	25	33

Tabelle 3.

Die Versuche wurden *sofort* nach der Ernte des Pilzes angestellt. Pilzstamm 12 BWA Prag. *Versuch 1: 4 Tage* auf Citrat gezüchtet, Ausbeute 17 g *feuchte Pilzfäden* aus 1,5 Liter Nährlösung. *Versuch 2: Eine andere ähnliche Pilzzüchtung.*

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90 ^o / _o	100 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o
Pilztrockengewicht in Milligramm	165	165	160	160
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	29	43	24	48
„ „ „ mit Citronensäure	26	41	24	41
„ „ „ „ Milchsäure . .	17	24	12	17
„ „ „ „ Bernsteinsäure	20	29	16	27

Tabelle 4.

Dieselben Pilzzüchtungen wie in Tab. 3, nur wurden die Versuche angestellt, nachdem die feuchten Pilzfäden im Eisschrank 2 Tage lang aufbewahrt wurden.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90 ^o / _o	100 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o
Pilztrockengewicht in Milligramm	160	160	165	165
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	410	—	>240	—
„ „ „ mit Citronensäure	215	—	>240	—
„ „ „ „ Milchsäure . .	18	29	8	11
„ „ „ „ Bernsteinsäure	48	81	36	54

Pilze, die länger als 4 Tage gezüchtet wurden, sind inaktiv. Für die Methylenblauversuche am günstigsten sind die Pilze, die bei reichlicher Sporenpfropfung nur *drei* Tage auf Citronensäure gewachsen sind.

Die *Milchsäuredehydrase* ist auch nach fünftägigem Aufbewahren im Eisschrank zum größten Teil noch vorhanden. Die *Bernsteinsäuredehydrase* ist zwei Tage lang und die *Citronensäuredehydrase* höchstens einen Tag im Eisschrank haltbar. Entsprechend der Citronensäuredehydrase verhält sich auch die *Leeratmung* der Pilze. Darum sind Pilze, die einen bzw. zwei Tage im Eisschrank aufbewahrt wurden, geeignet für die Untersuchung verschiedener Dehydrasen, da sie kleine Leerentfärbung zeigen.

Um festzustellen, ob die Inaktivierung der älteren Pilzfäden durch Permeabilitätsänderungen der Zellwand verursacht wird, habe ich auch Versuche mit gefrorenen Pilzfäden angestellt analog den Versuchen von Lynen bei Hefe (a. a. O.).

Tabelle 5.

Dieselbe Pilzzüchtung wie bei Versuch 2 der Tab. 3. *Versuch 1:* Pilz sofort nach der Ernte in flüssige Luft eingetaucht und nach dem Auftauen (dieser Prozeß dreimal wiederholt) zu den Versuchen benutzt; *Versuch 2:* Der Pilz nach dem Auftauen mit Wasser gewaschen, abfiltriert und dann wie üblich die Versuche angestellt.

Entfärbung	Versuch 1		Versuch 2	
	90 ^o / _o	100 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o
Pilztrockengewicht in Milligramm	150	150	150	150
Entfärbungszeit in Min. ohne Substrat . .	40	57	95	122
„ „ „ mit Citronensäure	40	57	82	116
„ „ „ „ Milchsäure	8	11	7	9
„ „ „ „ Bernsteinsäure	16	24	17	24

Aus diesen und anderen ähnlichen Versuchen, auch mit noch älteren Pilzen, sieht man, daß längere Zeit gezüchtete Pilze, die nicht so aktiv sind wie die nur 3 Tage lang gezüchteten, durch Einfrieren in flüssiger Luft nicht aktiviert werden. Die gefrorenen und ausgewaschenen Pilze zeigen mit *Bernsteinsäure* und *Milchsäure* dieselben Entfärbungszeiten wie die normalen Pilze. Dagegen ist die *Leer-* und *Citrat-*Entfärbungszeit bei den auf diese Weise behandelten Pilzen bedeutend größer. Man kann diese Tatsache erklären durch die Annahme, daß die *Milchsäuredehydrase* des *Asp. niger* im Gegensatz zu der entsprechenden Dehydrase des Muskels, aber analog der *Milchsäuredehydrase* der Hefe, beim Umsatz mit

Methylenblau als Wasserstoffacceptor kein *Co-Enzym* benötigt, da dieses unter den vorliegenden Bedingungen zum größten Teil ausgewaschen würde (vgl. analoge Versuche von Lynen bei Hefe). Die *Citronensäuredehydrase* bzw. *Iso-citronensäuredehydrase* benötigt aber bekanntlich die *Co-Dehydrase II*, die unter den Versuchsbedingungen zum großen Teil ausgewaschen wird. Daher die größeren Entfärbungszeiten mit gefrorenem und ausgewaschenem Pilz. Über den Stoffwechsel des *Asp. niger* und die Fermentsysteme desselben sind weitere Versuche im Gange.

C. *Nährlösungen*. Die Züchtung der Pilze auf Citronensäure ist vorzuziehen, obwohl die Pilze auf Glucose oder Rohrzucker schneller wachsen (schon am dritten Tag muß man sie dort ernten), denn man erhält auf diese Weise einen sehr aktiven Pilz, der konstante Eigenschaften besitzt.

D. *Die pH-Abhängigkeit*. Die pH-Abhängigkeit der Entfärbungszeiten der drei untersuchten Säuren kommt in der folgenden Figur zum Ausdruck.

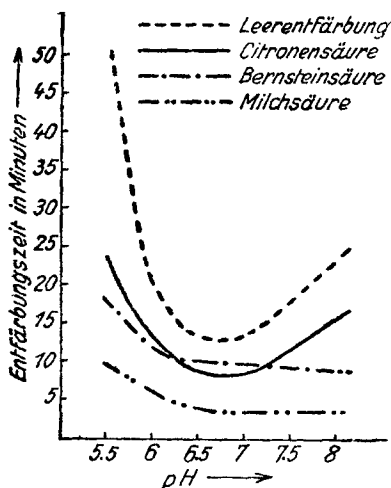


Fig. 1. Pilzstamm 12 BWA Prag. 3 Tage auf Citrat gezüchtet. Normale Ansätze mit dem entsprechenden Phosphatpuffer. 33 mg Pilztrockengewicht. Es wurde die Zeit der 90-proc. Entfärbung gemessen.

E. *Versuche mit verschiedenen Substraten*. Es wurden Versuche mit allen möglichen Substraten und Gemischen angestellt, die als Zwischenprodukte des Citronensäureabbaus

fungieren könnten. Parallel liefen jedesmal auch Versuche mit Milchsäure und Bernsteinsäure, um die Aktivitäten vergleichen zu können.

Bei den Ansätzen, in denen die Citronensäure bereits vor der Zugabe des MB. mit dem Pilz in Berührung war, wurde der Farbstoff schneller entfärbt als in den analogen Ansätzen, in denen das Substrat erst mit dem Farbstoff zusammen zugegeben wurde.

Tabelle 6.

Pilz: Stamm 12 BWA Prag, 30 mg trocknes Gewicht pH 6,9. Es wurde die Zeit einer 90-proc. Entfärbung gemessen.

Leerentfärbungszeit	31 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure, die zusammen mit dem MB. d. Pilz zugegeben wurde	22 „
„ „ „ die 25 Min. vor dem MB. d. Pilz zugegeben wurde	17 „
„ „ Bernsteinsäure	23 „
„ „ Milchsäure	7 „

Diese Tatsache kann mit allen drei zur Diskussion stehenden Abbauschemata erklärt werden. Denn bei allen dreien ist die erste Phase des Abbaus anaerob. Dann muß aber gefordert werden, daß die in dem betreffenden Schema angenommenen Zwischenprodukte, wenn man sie für sich als Substrat zugibt, tatsächlich schneller dehydriert werden als die Citronensäure. Es wurde daher jede Abbaumöglichkeit getrennt auf die Erfüllung dieser Forderung hin untersucht.

Die Versuche wurden wie üblich angestellt; nur um eine eventuelle Hemmung bei den Ketoderivaten zu vermeiden, wurde statt 1 cem nur 0,2 cem $m/3$ -Lösung von jedem Substrat pro Ansatz verwendet.

a) *Abbau über Essigsäure + Oxalessigsäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, Essigsäure, Oxal-essigsäure und einem Gemisch von Essigsäure und Oxalessigsäure gemessen.

Nach diesem Versuch ist kein Grund vorhanden, den Abbau über Essigsäure und Oxalessigsäure für wahrscheinlich zu halten. Das Gemisch Essigsäure-Oxalessigsäure wird nicht schneller, sondern langsamer dehydriert als die Citronensäure.

Tabelle 7.

Pilz: Stamm 12 BWA Prag, 33 mg Trocken-Gewicht pH 6,9. Es wurde die Zeit einer 90-proc. Entfärbung gemessen. *Versuch 1:* Der Pilz sofort nach der Ernte verwendet. *Versuch 2:* Nach 24 Stunden Aufbewahren desselben im Eisschrank.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	17 Min.	63 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure.	10 „	26 „
„ „ Essigsäure + Oxalessigsäure	11 „	70 „
„ „ Essigsäure	17 „	58 „
„ „ Oxalessigsäure	14 „	68 „
„ „ Bernsteinsäure	11 „	20 „
„ „ Milchsäure	5 „	5 „

b) *Abbau über Ameisensäure-Acetondicarbonsäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, Ameisensäure, Acetondicarbonsäure und einem Gemisch von Ameisensäure und Acetondicarbonsäure gemessen.

Tabelle 8.

Ansätze wie bei Tab. 7, aber eine andere Pilzzüchtung.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	13 Min.	39 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure.	7,5 „	18 „
„ „ Ameisensäure + Acetondicarbonsäure.	15 „	40 „
„ „ Ameisensäure.	13 „	39 „
„ „ Acetondicarbonsäure.	15 „	39 „
„ „ Bernsteinsäure	8 „	12 „
„ „ Milchsäure	4 „	4 „

Auch der Abbau der Citronensäure über Ameisensäure-Acetondicarbonsäure erklärt nicht die Tatsache, daß die Citronensäure, die kurze Zeit mit dem Pilz in Berührung war, schneller dehydriert wird als diejenige, die zusammen mit dem MB. dem Pilz zugegeben wurde, denn ein Gemisch von Ameisensäure und Acetondicarbonsäure wird langsamer dehydriert als Citronensäure.

c) *Abbau über e-Isocitronensäure.* Es wurden die Entfärbungszeiten mit Citronensäure, *cis*-Aconitsäure und *e*-Isocitronensäure gemessen.

Tabelle 9.

Ansätze wie bei der Tab. 7, aber eine andere Pilzzüchtung.

	Versuch 1	Versuch 2
Leerentfärbungszeit	18 Min.	44 Min.
Entfärbungszeit mit Citronensäure.	9 „	15 „
„ „ <i>cis</i> -Aconitsäure	8,5 „	14 „
„ „ e-Isocitronensäure	7,5 „	12 „
„ „ Bernsteinsäure	9 „	13 „
„ „ Milchsäure	4 „	4 „

Die e-Isocitronensäure wird schneller als die *cis*-Aconit- säure und diese schneller als die Citronensäure dehydriert. Damit ist bewiesen, daß die Citronensäure durch *Asp. niger* über *cis*-Aconitsäure —> e-Isocitronensäure abgebaut wird. Daß die Unterschiede nicht größer sind, beruht auf der Tat- sache, daß das Ferment *Aconitase*, das die Citronensäure in Isocitronensäure bzw. die *cis*-Aconitsäure in Isocitronensäure und Citronensäure überführt, sehr aktiv ist, wie folgender Versuch beweist.

III. Nachweis der Aconitase.

Umwandlung der *cis*-Aconitsäure in Citronensäure.

Ich habe präparative Versuche angestellt, um die Aco- nitase nachzuweisen. Zugesezte *cis*-Aconitsäure wurde bei Gegenwart von Na_2SeO_3 als Citronensäure isoliert. Es folgt die Beschreibung eines dieser Versuche.

30 g feuchte, auf Citrat 4 Tage lang gezüchtete Pilzfäden vom Trockengewicht etwa 6 g wurden in einer Rollflasche in 200 ccm 0,85- proc. NaCl + 30 ccm $\frac{m}{3}$ -Phosphatpuffer vom $\text{pH} = 7,0$ suspendiert. Es wurden 550 mg *cis*-Aconitsäureanhydrid, das mit NaOH neutralisiert wurde, und 10 ccm $\frac{m}{2}$ - Na_2SeO_3 hinzugesetzt. Die Flasche wurde mit einem Gummistopfen, der mit einem Glashahn versehen war, geschlossen, evakuiert und bei 30° auf einer Schüttelmaschine geschüttelt.

Nach 60 Minuten wurden 50 ccm der Suspension abpipettiert, in diesen die gebildete Citronensäure nach Kometiani¹⁾ als Pentabrom- acetone bestimmt. Es waren im ganzen Ansatz 330 mg Citronensäure gebildet worden. Die Flasche wurde sofort evakuiert und weiter ge- schüttelt. Nach 3 Stunden wurde dasselbe wiederholt und 435 mg

¹⁾ Kometiani, Fr. 86, 359 (1931).

Citronensäure gefunden. Nach 20 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Es hatten sich 490 mg Citronensäure gebildet.

Die Citronensäure wurde auch als Chininsalz isoliert.

Bei einem Versuch, der ohne Aconitsäure parallel lief, wurden nach 2 Stunden 10 mg und nach 20 Stunden 4 mg Citronensäure gefunden.

Aus meinen Versuchen kann man den Schluß ziehen, daß bei den Schimmelpilzen bzw. *Asp. niger* der Citronensäureabbau nicht über Ameisensäure-Acetondicarbonensäure verläuft, wie Walker angenommen hat, sondern über die l-Isocitronensäure, Oxalbernsteinsäure, α -Ketoglutarensäure usw.

Auch bei den *Fischen* wird die Citronensäure über die Isocitronensäure abgebaut, wie ich später in anderem Zusammenhang berichten werde.

Zusammenfassend kann man über den biologischen Abbau der Citronensäure jetzt sagen, daß dieser im tierischen Organismus, den Schimmelpilzen und der Hefe über die (—)-Isocitronensäure, Oxalbernsteinsäure, α -Ketoglutarensäure usw. verläuft. Bei den Organismen, die auf Citronensäure als einziger C-Quelle wachsen, entsteht aus der α -Ketoglutarensäure durch Ammoniak die Glutaminsäure und aus dieser durch Umaminierung die übrigen Aminosäuren¹⁾. Nur bei den Bakterien wird die Citronensäure aerob und anaerob über Essigsäure-Oxalessigsäure abgebaut. Bei den Bakterien, die auf Citronensäure als einziger C-Quelle allein wachsen, würde dann aus der Oxalessigsäure bzw. Fumarsäure (Aspartasereaktion) durch Ammoniak die Asparaginsäure und daraus die übrigen Aminosäuren entstehen. So kann man auch erklären, daß in gewissen Milchsäurebakterien nach Befunden der Eulerischen Schule die Glutaminsäuredehydrase nicht vorkommt.

¹⁾ Über den biologischen Ab- und Aufbau der Aminosäuren vgl. W. Franke, Z. Ang. 52, 695 u. 703 (1939).