

Zur Kenntniss der in den Membranen der Pilze enthaltenen Bestandtheile.

(II. A b h a n d l u n g.)

Von

E. Winterstein.

(Aus dem agricultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1895.)

Im Band XIX dieser Zeitschrift¹⁾ habe ich mitgetheilt, dass die aus verschiedenen Pilzen (*Boletus edulis*, *Agaricus campestris*, *Cantharellus cibarius*, *Morchella esculenta*, *Polyporus officinalis*, *Penicillium glaucum*, *Botrytis*, und einem *Lactarius* unbekannter Species) nach den Methoden von Fr. Schulze und W. Hoffmeister dargestellten Pilzcellulosepräparate nicht die Reactionen der gewöhnlichen Cellulose zeigten und auch in der Zusammensetzung von der Cellulose der Phanerogamen insofern abwichen, als sie einen meist nicht unbeträchtlichen Stickstoffgehalt aufwiesen. Ferner habe ich dort gezeigt, dass diese Präparate bei der hydrolytischen Spaltung mit Schwefelsäure neben Glucose und Essigsäure einen stickstoffreichen Syrup gaben. In drei Fällen habe ich mit Sicherheit nachweisen können, dass die entstandene Glucose Traubenzucker (d-Glucose) war.

Von vorneherein musste es für wahrscheinlich erklärt werden, dass der von mir in den Pilzcellulosepräparaten vorgefundene Stickstoff nicht auf einen Gehalt derselben an

¹⁾ Seite 521—562.

Proteinstoffen (Eiweiss, Nuclein oder Plastin) zurückzuführen sei, da diese Stoffe doch durch die bei Darstellung jener Präparate angewendeten Agentien zerstört werden. Da mir aber von Vertretern der Botanik der Einwand gemacht wurde, dass trotzdem vielleicht in meinen Präparaten noch unverändertes Zellprotoplasma enthalten sein könne¹⁾, so habe ich über diese Frage eine Reihe von Versuchen ausgeführt, deren Resultat auf Seite 554—555 meiner Abhandlung mitgeteilt sind. Aus diesen Versuchen konnte ich den Schluss ziehen, dass in meinen Pilzcellulosepräparaten Proteinstoffe entweder gar nicht, oder doch in einer ganz unwesentlichen Quantität sich vorfanden und dass demnach der meist beträchtliche Stickstoffgehalt auf das Vorhandensein einer vom Eiweiss, Nuclein oder Plastin verschiedenen stickstoffhaltigen Substanz zurückgeführt werden müsse²⁾. Dass diese Substanz grosse Widerstandsfähigkeit gegen lösende und zersetzende Agentien besitzt, ergab sich auch daraus, dass sie beim Erhitzen mit Kalihydrat auf 180° nach Hoppe-Seyler's Methode nicht zerstört wurde.

Das Entstehen von Traubenzucker beim Erhitzen der Pilzcellulosepräparate mit verdünnter Schwefelsäure deutet auf das Vorhandensein eines stickstofffreien Atomcomplexes hin, ob Letzterer sich in chemischer Verbindung mit dem stickstoffhaltigen Körper vorfindet oder nicht, ist eine Frage, die ich nicht mit Bestimmtheit beantworten konnte, auch vermochte ich nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob dieser stickstofffreie Atomcomplex etwa mit der gewöhnlichen Cellulose übereinstimmt, bestimmt verneinen konnte ich letztere Frage nicht, weil die von Botanikern beobachtete Blaufärbung

¹⁾ Bekanntlich nimmt Wiesner an, dass die Membranen der Pflanzen protoplasmatische Substanz einschliessen; er hat sogar aus dem Stickstoffgehalt die in den Membranen von *Polyporus fomentarius* enthaltene Menge an Eiweisskörpern berechnen wollen. Untersuchung über die Organisation der vegetabilischen Zellhaut. Sitzgsber. d. Kais. Acad. d. Wiss. in Wien, Bd. 93 (1886). Ueber den Nachweis der Eiweisskörper in Pflanzenzellen. Ber. d. D. Bot. Gesellsch., Bd. 6, S. 187.

²⁾ Vgl. C. Correns. Ueber die vegetabilische Zellmembran. Pringsheim's Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik, Bd. 26, S. 639.

der Zellmembran mancher Pilze oder gewisser Theile derselben mit Jod und Schwefelsäure darauf hinzudeuten schien, dass wenigstens in manchen Pilzen eigentliche Cellulose vorkommt.

Durch Behandeln mit Säuren oder Alkalien den stickstofffreien Atomcomplex von der stickstoffhaltigen Substanz zu trennen, hat grosse Schwierigkeiten, wie aus den weiter unten gemachten Mittheilungen zu ersehen ist; erst durch eine weitere eingehende Untersuchung der Spaltungsproducte der Pilzcellulose ist es gelungen, Aufschluss über die Membransubstanz der Pilze zu gewinnen; es zeigte sich nämlich, dass die Pilzcellulose beim Erhitzen mit concentrirter Salzsäure neben Essigsäure salzsaures Glucosamin liefert, aus welchem Ergebniss auf eine nahe Beziehung der Membransubstanz zum Chitin geschlossen werden konnte.

Kurze Mittheilungen über diesen Befund habe ich schon in den Berichten d. Deutsch. Chem. Gesellschaft und in den Berichten d. Deutsch. Botan. Gesellschaft¹⁾ publicirt; im Folgenden theile ich die Ergebnisse meiner Untersuchung ausführlicher mit.

A. Spaltung der Pilzcellulose durch Salzsäure.

Die grosse Widerstandsfähigkeit der in der Pilzcellulose enthaltenen stickstoffhaltigen Substanz gegen chemische Agentien und die Entstehung von Essigsäure aus derselben legte den Gedanken nahe, dass hier ein chitinähnlicher Körper vorliegen könne; ich habe daher schon vor dem Erscheinen meiner oben citirten Arbeit versucht, durch Erhitzen mit Salzsäure aus der Pilzcellulose salzsaures Glucosamin zu erhalten, wobei ein aus *Boletus edulis* nach der Methode von W. Hoffmeister dargestelltes Pilzcellulosepräparat (mit 3,94% Stickstoff) als Material diente. Ich verfuhr hierbei in gleicher Weise, wie Ledderhose²⁾ bei der Spaltung des Chitins. Die feingepulverten Objecte wurden mit concentrirter Salz-

¹⁾ Bd. 27, S. 3113; Bd. 28, S. 167; Bd. 13, S. 65.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 2, S. 213.

säure zu einem Brei angerührt und das Gemisch anhaltend auf dem Wasserbade erhitzt; hierbei entstand eine dunkelgefärbte Flüssigkeit, aus welcher sich schwarze humose Massen ausgeschieden hatten; die von Letzteren abfiltrirte Lösung wurde auf dem Wasserbade eingeengt. Auf diese Weise gelang es mir damals nicht, Krystalle von salzsaurem Glucosamin zu erhalten¹⁾. Ein besseres Ergebniss erzielte ich, als ich die Behandlungsweise der Pilzcellulosepräparate in folgender Weise modificirte: 10 gr. eines nach der Methode von Fr. Schulze dargestelltes lufttrocknes Pilzcellulosepräparat, welches 4,25% Stickstoff enthielt, wurden mit 50 ccm. concentrirter Salzsäure zu einem Brei angerührt, das Gemisch erhitzte ich sodann auf dem Wasserbade, wobei die Pilzcellulose bald in Lösung ging. Das Erhitzen wurde nun so lange fortgesetzt, bis auf Zusatz von Wasser keine Fällung mehr eintrat, was nach Verlauf von etwa $\frac{1}{4}$ Stunde der Fall war. Das Reactionsproduct wurde nun mit Wasser verdünnt, die braungefärbte Flüssigkeit von den gebildeten humosen Substanzen abfiltrirt und das Filtrat der Dialyse durch Pergamentschlauch unterworfen. Das erste, nach Verlauf einer Stunde erhaltene stark salzsäurehaltige Diffusat wurde getrennt von den später erhaltenen Diffusaten verarbeitet. Die Diffusate wurden auf dem Wasserbade vorsichtig eingedunstet und über Natronkalk im Exsiccator hingestellt. Aus dem zweiten und dritten Diffusat hatten sich schon nach dem Erkalten beträchtliche Quantitäten kleiner, stark glänzender Krystalle ausgeschieden; das erste Diffusat lieferte nur kleine Mengen an solchen. Als die Ausscheidung der Krystalle nicht mehr zunahm, wurde die Mutterlauge abgegossen und der Krystallbrei durch Abpressen zwischen Fliesspapier oder durch Aufstreichen auf einer Thonplatte von der anhaftenden Mutterlauge befreit und darauf noch einmal aus Wasser umkrystallisirt. Ich erhielt so grosse, harte, starkglänzende Krystalle von süßem Geschmack mit salzig-bitterem Nachgeschmack. Dieselben

¹⁾ Es ist möglich, dass die beim anhaltenden Kochen mit Säuren aus den Kohlenhydraten entstandenen humosen Zersetzungsproducte das Auskrystallisiren des Glucosamins verhinderten.

lösten sich leicht in Wasser auf. Die wässrige Lösung reagiert sauer und reducirt sowohl Fehling'sche, als auch Quecksilberlösung, mit ammoniakalischem Bleiessig und Silbernitratlösung gibt sie Fällungen, mit Kupferoxydhydrat entsteht eine tiefblaue Lösung. Die wässrige Lösung ist stark rechtsdrehend. Beim Erwärmen mit concentrirter Schwefelsäure entsteht Salzsäure, beim Kochen der Lösung mit Natronhydrat wird Ammoniak gebildet. Das erhaltene Spaltungsproduct stimmt somit in seinem Verhalten und seinen Eigenschaften mit dem salzsauren Glucosamin überein. Dass in der That salzsaures Glucosamin vorlag, geht aus folgenden Bestimmungen hervor:

- a) Chlorbestimmung: 0,1354 gr. Substanz gaben 0,0892 gr. AgCl, daraus berechnet sich ein Gehalt von 16,36% Cl. Die Theorie verlangt 16,5% Cl für das salzsaure Glucosamin.
- b) Stickstoffbestimmung nach Dumas: 0,2 gr. Substanz gaben 12,2 cbcm. Gas bei 16° und 719 mm. Druck, daraus berechnet sich ein Stickstoffgehalt von 6,73%.
- c) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0,216 gr. Substanz gaben 0,0140 gr. N (= 10 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃); daraus berechnet sich ein Gehalt von 6,48% Stickstoff.
- d) Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens: Eine wässrige Lösung der Substanz, welche in 10 cbcm. 0,9288 gr. enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 200 mm.-Rohr 39,6° nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +73,8^{01}$. Die frisch bereitete Lösung besass eine grössere Drehung, die Substanz zeigte also Birotation, was nach einem von mir ausgeführten Versuch auch für das salzsaure Glucosamin aus Chitin gilt.
- d) Krystallographische Untersuchung. Nach einer krystallographischen Untersuchung, welche ich der Gefälligkeit des Herrn Professor Grubenmann in Zürich verdanke, krystallisirt die von mir dargestellte Substanz ebenso wie salzsaures Glucosamin, wie aus Uebereinstimmung der Formen und einer Winkelmessung hervorgeht.

In der oben beschriebenen Weise habe ich aus Pilzcellulosepräparaten von *Agaricus campestris*, *Morchella*

¹⁾ Nach Ledderhose (loc. cit.) beträgt das specif. Drehungsvermögen in 10proc. Lösung des salzsauren Glucosamins für $[\alpha]_D +69,54$. Nach F. Tiemann (Ber. d. D. Ch. Gesellsch., Bd. 19, S. 52) ist $[\alpha]_D = +74,6^{\circ}$. Nach T. Araki (diese Zeitschrift, Bd. 20, S. 507) schwankt $[\alpha]_D$ von $+71,8^{\circ}$ bis $+70,5^{\circ}$.

esculenta, Botrytis cinerea, Penicillium glaucum, Polyporus officinalis salzsaures Glucosamin dargestellt; dasselbe stimmte in seinem Aussehen, Reactionen und Verhalten mit dem salzsauren Glucosamin aus Chitin überein. Im Folgenden theile ich die bei Untersuchung der einzelnen salzsauren Glucosaminpräparate erhaltenen Resultate in aller Kürze mit.

2. Salzsaures Glucosamin aus Pilzcellulose von Agaricus campestris nach der Methode von W. Hoffmeister dargestellt. Dieselbe enthielt 4,58% Stickstoff:

- a) Chlorbestimmung: 0,1200 gr. Substanz gaben 0,0790 gr. AgCl. Daraus berechnet sich ein Gehalt von 16,28% Cl.
- b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0,2190 gr. Substanz gaben 0,1414 gr. N (= 10,1 ccm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃) = 6,46% N.
- c) Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens: Eine wässrige Lösung der Substanz, welche in 5 ccm. 0,219 gr. Trockensubstanz enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 100 mm.-Rohr im Soleil-Ventzke'schen Apparat 8,9° nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +70,3^\circ$.

3. Salzsaures Glucosamin aus Pilzcellulose von Morchella esculenta nach der Methode von W. Hoffmeister dargestellt. Dieselbe enthielt 3,90% N.

Chlorbestimmung: 0,1180 gr. Substanz gaben 0,0788 gr. AgCl. Daraus berechnet sich ein Chlorgehalt von 16,51%.

4. Salzsaures Glucosamin aus Pilzcellulose von Polyporus officinalis. Dargestellt durch Behandeln der mit Aether, Alkohol und Lauge verbliebenen Rückstände mit Schulze'schem Oxydationsgemisch und darauffolgendem Behandeln mit Kaliumchlorat und Salzsäure. Dieses Präparat zeigte einen Stickstoffgehalt von 2,60%.

Chlorbestimmung: 0,109 gr. Substanz gaben 0,072 gr. AgCl. Daraus berechnet sich ein Chlorgehalt von 16,33%.

Da nach den von Botanikern gemachten Angaben die Membranen der Pilze sehr wenig oder gar nicht verholzt sind, so erschien es von vorneherein sehr wahrscheinlich, dass die aus Pilzen durch Extraction mit Aether, Alkohol, verdünnten Laugen und verdünnten Säuren erhaltenen Rückstände, die

sogenannte «Rohfaser», sich ebenso verhalten würden, als die durch Digeriren mit Oxydationsgemischen (HNO_3 und KClO_3 oder HCl und KClO_3) dargestellten Pilzcellulosepräparate. Dieser Erwartung entsprach auch in der That das Versuchsergebniss. Als ich die «Rohfaser» aus *Boletus edulis*, welche 4,25% Stickstoff¹⁾ enthielt, in der oben beschriebenen Weise behandelte, erhielt ich ebenfalls salzsaures Glucosamin.

Dasselbe wurde durch seine Reactionen und durch folgende Bestimmungen identificirt:

- a) Chlorbestimmung: 0,2685 gr. Substanz gaben 0,1790 gr. AgCl . Daraus berechnet sich ein Chlorgehalt von 16,49%.
- b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0,5 gr. Substanz gaben 0,0315 gr. N (= 22,5 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.- NH_3) = 6,30% N.
- c) Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens: Eine wässerige Lösung, welche in 10 cbcm. 1 gr. Substanz enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 200 mm.-Rohr im Soleil-Ventzke'schen Apparat $42,5^\circ$ nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +73,5^\circ$.

Eine «Rohfaser» aus *Agaricus campestris* mit 4,97%²⁾ Stickstoff gab ebenfalls salzsaures Glucosamin. Bei Untersuchung desselben erhielt ich folgende Resultate:

- a) Stickstoffbestimmung: 0,5 gr. Substanz gaben 0,03164 gr. N (= 22,6 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.- NH_3) = 6,32% N.
- b) Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens: Eine wässerige Lösung der Substanz, welche in 10 cbcm. 1 gr. enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 200 mm.-Rohr im Soleil-Ventzke'schen Apparat $42,4^\circ$ nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +73,3^\circ$.

Wie schon Eingangs dieser Abhandlung erwähnt ist, liefert die Pilzcellulose bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure Essigsäure; dass auch Essigsäure bei Spaltung mit Salzsäure aus der Pilzcellulose entsteht, lehrten folgende Versuche: 5 gr. eines nach W. Hoffmeister dargestellten Pilzcellulose-

¹⁾ 0,5 gr. Substanz gaben 0,0210 gr. N (= 15 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.- NH_3). 0,5 gr. Substanz gaben 0,02156 gr. N (= 15,4 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.- NH_3) = 4,25% N.

²⁾ 1 gr. aschenfreie Trockensubstanz gab 0,0491 gr. N (= 36 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.- NH_3) = 4,97% N.

präparats wurden mit concentrirter Salzsäure übergossen, das Gemisch auf dem Wasserbade circa 10 Minuten erwärmt, darauf mit Wasser auf 50 cbcm. verdünnt und von der Flüssigkeit 40 cbcm. am Kühler abdestillirt, nach dem Erkalten des Kolbeninhalts wurden noch einmal 40 cbcm. Wasser hinzugefügt und abermals circa 45 cbcm. Flüssigkeit abdestillirt. Die vereinigten Destillate wurden, behufs Entfernung der Salzsäure, mit feuchtem Silberoxyd geschüttelt, vom ausgeschiedenen Chlorsilber abfiltrirt, die geringen Mengen des in Lösung gegangenen Silberoxyds durch Schwefelwasserstoff entfernt, die vom Silbersulfid getrennte Flüssigkeit wurde mit Baryumcarbonat neutralisirt und das nach dem Eindampfen erhaltene Baryumsalz umkrystallisirt. Dasselbe gab beim Erhitzen mit concentrirter Schwefelsäure und Alkohol Essigäther. Die Baryumbestimmung in dem lufttrockenen Salz gab folgende Zahlen:

0,3141 gr. Substanz gaben 0,2821 gr. Baryumsulfat; daraus berechnet sich ein Gehalt von 53,57% Ba. Die Theorie verlangt 53,72% Ba für Baryumacetat.

Nach dem gleichen Verfahren erhielt ich aus «Rohfaser» von *Agaricus campestris* essigsäures Baryum. Die Baryumbestimmung in vorliegendem Salz ergab folgende Resultate:

0,2224 gr. Substanz gaben 0,2005 gr. Baryumsulfat; daraus berechnet sich ein Gehalt von 53,77% Ba. Die Theorie verlangt 53,72% Ba im Baryumacetat.

B. Spaltung der Pilzcellulose durch schmelzendes Kalihydrat.

Wie auf S. 544 meiner ersten Abhandlung angegeben ist, habe ich die nach Extraction mit Aether, Alkohol und verdünnten Säuren verbleibenden Rückstände der Kalischmelze auf 180° nach der Hoppe-Seyler'schen Methode unterworfen, um die Widerstandsfähigkeit der stickstoffhaltigen Membransubstanz der Pilze zu prüfen. Die erhaltenen Präparate habe ich nur zu einer Stickstoffbestimmung benutzt, eine weitere Untersuchung über das chemische Verhalten derselben habe ich nicht angestellt.

Inzwischen hat E. Gilson eine Abhandlung über die Gerüstsubstanz der Pilze publicirt¹⁾; in derselben zeigt er, dass die Membranen der Pilze (*Agaricus campestris* und *Claviceps purpurea*) beim Schmelzen mit Kalihydrat ein in verdünnten Säuren lösliches Product geben; E. Gilson bezeichnet dasselbe als Mycosin. Das gleiche Verhalten zeigt, nach den kürzlich von Hoppe-Seyler²⁾ und von Araki³⁾ veröffentlichten Untersuchungen, auch das Chitin. Wenn man Chitin mit Kalihydrat auf 180° erhitzt, so bleibt es in seiner Structur zwar erhalten, wird aber dabei in einen in höchst verdünnten Säuren löslichen stickstoffhaltigen Körper, das Chitosan, und Essigsäure gespalten. Das Chitosan wird aus seinen Lösungen durch Zusatz von concentrirten Säuren oder verdünnten Laugen wieder ausgefällt.

Im Hinblick auf diese Angaben habe ich mich veranlasst gesehen, die Kalischmelze mit einigen Pilzen zu wiederholen und die hierbei entstandenen Producte zu untersuchen. Ich benutzte hierfür die aus *Agaricus campestris*, *Boletus edulis*, *Morchella esculenta*, *Cantharellus cibarius*, *Polyporus officinalis*, *Polyporus betulinus*, *Polyporus squamosus* und *Pachyma Cocos* durch Extraction mit Aether, Alkohol und verdünnten Säuren dargestellten Rückstände, dieselben wurden in einem geräumigen Kolben mit der 4—5fachen Menge Kali- oder Natronhydrat zusammengebracht, die Masse mit Wasser angefeuchtet und im Oelbad erhitzt; die Temperatur wurde ganz allmähig auf 180° gesteigert; nachdem das Alkali eine Stunde bei dieser Temperatur eingewirkt hatte, wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser stark verdünnt, mit Schwefelsäure nahezu neutralisirt, der entstandene Niederschlag wurde durch Decantation von der schwach alkalischen Flüssigkeit getrennt, dann auf ein Filter gesammelt, einige Male mit Wasser ausgewaschen und dann mit verdünnter Salzsäure übergossen; die salzsaure Lösung

¹⁾ Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons. La Revue la Cellule T. XI, I. fasc.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXVII, S. 329.

³⁾ Loc. cit.

wurde mit concentrirter Salzsäure versetzt, der entstandene Niederschlag auf ein Filter gebracht, mit Alkohol und Aether behandelt und sodann getrocknet. Das in dieser Weise erhaltene stickstoffreiche¹⁾ Product stimmt in seinem Verhalten mit dem Chitosan (Mycosin) überein; es löste sich leicht in höchst verdünnten Säuren auf und wurde aus diesen Lösungen durch concentrirte Säuren oder verdünnte Alkalien wieder ausgefällt.

Die aus beiden Agaricinen (*Agaricus* und *Boletus*) sowohl als auch aus *Morchella esculenta* und *Cantharellus cibarius* bei der Kalischmelze entstandenen Producte lösten sich bis auf einen ganz geringen schwarzen humosen Rückstand in sehr verdünnter Salzsäure leicht auf. Die von mir untersuchten *Polyporus*arten (*Polyporus officinalis*, *squamosus*, *betulinus* und *Pachyma Cocos*), welche auch nach der Methode von W. Hoffmeister meistens sehr stickstoffarme Pilzcellulosepräparate lieferten, verhalten sich in Bezug auf die bei der Kalischmelze entstehenden Producte insofern abweichend von den erstgenannten Pilzen, als der nach Behandlung des Reactionsproductes mit Wasser verbleibende Rückstand sich nur zum Theil in verdünnten Säuren auflöst; demgemäss erhielt ich aus letztgenannten Objecten nur relativ geringe Mengen Chitosan (Mycosin). Der in verdünnten Säuren unlösliche Rückstand löste sich leicht in concentrirter Schwefelsäure auf, die mit Wasser verdünnten schwefelsauren Lösungen reducirten nach dem Kochen die Fehling'sche Lösung und gaben nach dem Entsäuern mit Baryt beim Erhitzen mit essigsaurem Phenylhydrazin Osazone, welche in ihrem Schmelzpunkt und im Aussehen unter dem Mikroskop mit dem Glucosazon übereinstimmten.

Um festzustellen, ob aus der Membransubstanz der Pilze bei der Kalischmelze auch Essigsäure entsteht, verfuhr ich wie folgt: Ein durch Extraction mit Aether, Alkohol, verdünnten Säuren und Behandeln mit 2 $\frac{1}{2}$ proc. Natronlauge aus

¹⁾ Den Stickstoffgehalt habe ich in allen Fällen durch die Lassaigne'sche Reaction nachgewiesen, quantitative Bestimmungen habe ich nicht ausgeführt.

Boletus edulis erhaltene Rückstand wurde mit der 5fachen Menge Kalihydrat auf 180° erhitzt, das mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch nahezu neutralisirt, vom ausgeschiedenen Chitosan abfiltrirt und das schwache alkalische Filtrat auf ein kleines Volumen eingedampft, dann unter Zusatz von Schwefelsäure aus einem Kolben am Liebig'schen Kühler abdestillirt, bis die Masse fest wurde, das Destillat wurde mit Baryumcarbonat neutralisirt. Das erhaltene Baryumsalz gab beim Erhitzen mit concentrirter Schwefelsäure und Alkohol Essigäther. Die Baryumbestimmung ergab folgende Zahlen:

0,3104 gr. Susbtanz gaben 0,2790 gr. Baryumsulfat, daraus berechnet sich ein Gehalt von 53,59 % Ba. Die Theorie verlangt 53,72 % Ba für essigsaures Baryum.

Die Pilzcellulose verhält sich demnach in Bezug auf die bei Spaltung mit concentrirter Salzsäure und schmelzendem Kalihydrat ebenso wie das Chitin; hält man alle diese That-sachen zusammen, so kann man nicht daran zweifeln, dass die Membranen der Pilze einen mit Chitin identischen oder denselben doch sehr nahestehenden Körper einschliessen.

Lässt sich das Chitin aus den Membranen der Pilze rein darstellen?

Wie aus den im Vorigen gemachten Mittheilungen und aus den nachfolgenden Versuchen hervorgeht, enthalten die Pilze zweifellos einen Chitinkörper; derselbe ist aber stets von Kohlenhydraten begleitet, die sich zum Theil leicht durch verdünnte Säuren oder Alkalien ausziehen lassen, daneben finden sich aber auch solche, welche erst durch concentrirte Schwefelsäure leicht in Lösung gebracht und hierbei hydrolysirt werden. Man muss sich nun die Frage vorlegen, ist es möglich, die Kohlenhydrate von dem Chitinkörper zu trennen und das Chitin rein darzustellen? Um diese Frage zu lösen, empfahl es sich, die durch Extraction mit Aether, Alkohol und verdünnten Laugen aus den Pilzen erhaltenen Rückstände mit verdünnten Säuren anhaltend zu digeriren, in den erhaltenen Präparaten den Stickstoffgehalt zu bestimmen und gleichzeitig zu untersuchen, ob diese Präparate noch Kohlenhydrate enthalten.

Ich habe eine Reihe solcher Versuche mit *Boletus edulis*, *Agaricus campestris*, *Polyporus officinalis*, *Polyporus betulinus* und *Polyporus squamosus* in folgender Weise ausgeführt: Die feingepulverten Pilze wurden mit Aether, Alkohol wiederholt extrahirt, darauf mit 1 proc. und sodann mit 2 $\frac{1}{2}$ proc. Lauge je einen Tag digerirt und die Lauge durch Auswaschen entfernt; die dabei verbliebenen Rückstände wurden im kochenden Wasserbade in einigen Fällen 6, in anderen Fällen 10 Stunden mit 2 $\frac{1}{2}$ —3 proc. Schwefelsäure digerirt; die Säure nach Beendigung der Einwirkung vollständig ausgewaschen, die erhaltenen Producte mit Alkohol und Aether behandelt und im Trockenschrank längere Zeit bei 102° getrocknet. Einen Theil der erhaltenen Präparate benutzte ich zur Stickstoffbestimmung, ein anderer wurde mit 75 proc. Schwefelsäure gelöst, die mit viel Wasser verdünnte Flüssigkeit 2 Stunden am Rückflusskühler gekocht, sodann mittelst Barythydrat entsäuert, die vom Baryumsulfat getrennte hellgelbe Lösung auf ein kleines Volumen eingedampft und sodann mit einem Ueberschuss von essigsaurem Phenylhydrazin 10—15 Minuten im Wasserbade auf 80° erhitzt; ich erhielt hierbei fast stets Osazone¹⁾, welche im Schmelzpunkt und Aussehen mit dem Glucosazon übereinstimmten. Die Untersuchung der einzelnen Präparate ergab Folgendes:

1. Das Präparat aus *Agaricus campestris* enthielt 6,24% N. a) 1 gr. Substanz = 0,8986 gr. aschenfreie Trockensubstanz gab 0,05614 gr. N (= 40,1 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃). b) Die gleiche Substanzmenge gab 0,05600 gr. N (= 40 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃).

Dieses Präparat lieferte nur Spuren eines Osazons.

2. Das Präparat aus *Boletus edulis* enthielt 5,27% N. a) 0,5 gr. Substanz = 0,4893 gr. aschenfreie Trockensubstanz gab 0,02600 gr. N (= 18,5 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃). b) Die gleiche Substanz gab 0,02548 gr. N (= 18,2 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃).

¹⁾ Bekanntlich liefert Glucosamin erst bei stundenlangem Erhitzen mit essigsaurem Phenylhydrazin Glucosazon.

5 gr. dieses Präparates gaben sehr beträchtliche Quantitäten Glucosazon.

3. Das Präparat aus *Polyporus officinalis* enthielt 0,67% N. 0,5 gr. Substanz gaben 0,00336 gr. N (= 2,4 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃).

Dieses Präparat lieferte beträchtliche Mengen Glucosazon.

4. Das Präparat aus *Polyporus squamosus* enthielt 0,40% N. a) 0,5 gr. Substanz gaben 0,00196 gr. N (= 1,4 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃). b) Die gleiche Substanzmenge gab 0,00212 gr. N (= 1,8 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃).

5. Das Präparat aus *Polyporus betulinus* enthielt 0,28% N. 0,0014 gr. Substanz gaben 0,0014 gr. N (= 1 cbcm. $\frac{1}{10}$ Norm.-NH₃).

Die beiden letzten Präparate gaben ebenfalls beträchtliche Quantitäten Glucosazon.

Aus vorstehenden Versuchen ist zu ersehen, dass ich aus *Agaricus campestris* auf dem beschriebenen Weg ein Präparat erhalten habe, dessen Stickstoffgehalt mit demjenigen des Chitins übereinstimmt; hierbei ist zu berücksichtigen, dass für das Chitin früher ein Gehalt von 6,5—10proc. Stickstoff¹⁾ angegeben ist. Nach den vor Kurzem von T. Araki²⁾ gemachten Darlegungen beträgt der Stickstoffgehalt des gereinigten Chitins 6,35%, was der von Schmiedberg aufgestellten Formel C₁₈H₃₀N₂O₂ entspricht. Aus dieser Formel berechnet sich 6,01% N. Aus dem bei Hydrolyse dieses Präparats entstandenen Producten habe ich nur Spuren eines Osazons erhalten.

Wie von vorneherein zu erwarten war, gaben die Polyporen, welche auch nach der Methode von W. Hoffmeister oder Fr. Schulze meist nur sehr stickstoffarme Pilzcellulosen lieferten, auch bei der beschriebenen Behandlung Präparate, welche nur einen sehr niedrigen Stickstoffgehalt aufwiesen,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 2, S. 222.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 20, S. 504.

daneben enthielten dieselben Kohlenhydrate, welche durch 6stündiges Digeriren mit 3 proc. Schwefelsäure nicht in Lösung gingen. Bei dieser Gelegenheit erinnere ich daran, dass auch beim Schmelzen mit Alkali diese Kohlenhydrate nicht vollständig zerstört wurden, so dass ich neben Chitosan (Mycosin) aus diesen Objecten celluloseähnliche Körper isoliren konnte.

In einer vor Kurzem veröffentlichten Abhandlung¹⁾ zeigt E. Gilson, dass man aus zerkleinertem *Agaricus campestris* durch Behandeln mit verdünnter Lauge, heisser verdünnter Säure, Alkohol und Aether ein Präparat darstellen kann, welches in seinen Eigenschaften und seiner Zusammensetzung mit dem Chitin übereinstimmt. Die aus einer Reihe anderer Pilze, wörunter 2 *Polyporus*arten, nach dem gleichen Verfahren dargestellten Präparate, welche gleiches Aussehen und Verhalten zeigten, wie dasjenige aus *Agaricus campestris*, bestehen nach Gilson ebenfalls nur aus Chitin. Eine Analyse dieser Präparate auszuführen, hielt er für überflüssig («il nous a paru superflu de faire l'analyse élémentaire»).

Dass sich aus den von mir verwendeten *Polyporus*arten in dieser Weise kein reines Chitin darstellen lässt, habe ich oben gezeigt.

Ueber die Kohlenhydrate, welche sich in Begleitung der Chitinsubstanz in den Pilzen finden.

Ueber ein durch verdünnte Schwefelsäure aus *Boletus edulis* darstellbares Kohlenhydrat, das Paradextran, welches bei der Hydrolyse Traubenzucker liefert, habe ich schon auf S. 558—561 meiner ersten Abhandlung berichtet. Im Folgenden mache ich Mittheilung über die Darstellung und das Verhalten zweier aus *Polyporus betulinus* und *Pachyma Cocos* isolirbaren Kohlenhydrate von ähnlichen Eigenschaften wie das Paradextran.

Zunächst beschreibe ich das aus *Polyporus betulinus* dargestellte Kohlenhydrat. Behufs Darstellung des Kohlen-

¹⁾ Comptes rendus, Bd. 120, S. 1000.

hydrats aus dem genannten Pilz wurde derselbe von der äusseren gelblichen Rinde befreit, so fein wie möglich gemahlen, dann, um die Proteinstoffe zu entfernen, mit sehr verdünntem Ammoniak in der Kälte behandelt. Der ausgewaschene Rückstand wurde längere Zeit mit kalter ca. 6 proc. Natronlauge digerirt, die alkalische Lösung vom Ungelösten durch Glaswolle abfiltrirt und in das stark mit Wasser verdünnte Filtrat Kohlensäure eingeleitet oder dasselbe mit Salzsäure schwach angesäuert; hierbei scheidet sich eine voluminöse Gallerte aus, welche auf einem Filter durch Auswaschen vollständig von den Salzen befreit, dann mit absolutem Alkohol und Aether behandelt und über concentrirte Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet wurde. Auf diese Weise erhielt ich eine schneeweisse, amorphe, vollständig stickstoff- und nahezu aschenfreie Substanz, welche im Wasser und kalten verdünnten Säuren unlöslich ist, von concentrirten Säuren und verdünnten fixen Alkalien wird sie allmähig gelöst. Die alkalische Lösung ist rechtsdrehend. Das spezifische Drehungsvermögen einer 4 proc. Lösung der Substanz in 5 proc. Natronlauge beträgt für $[\alpha]_D + 240^\circ$, wie aus folgenden Daten ersichtlich: Eine alkalische Lösung, welche in 12 cbcm. 0,500 gr. Trockensubstanz enthielt, drehte im Soleil-Ventzke'schen Apparat im 200 mm.-Rohr $+ 58^\circ$ nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 240,8^\circ$. Mit Schwefelsäure und Jod wird die Substanz schön blau gefärbt.

Bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure liefert das Kohlenhydrat Traubenzucker (d-Glucose). Ueber die Details dieser Versuche ist Folgendes anzugeben. 5 gr. Substanz wurden mit 35 gr. 75 proc. Schwefelsäure längere Zeit stehen gelassen, die Masse sodann mit nahezu 1 L. Wasser verdünnt und 4 Stunden am Rückflusskühler gekocht, die von der Schwefelsäure durch Baryt befreite Flüssigkeit bei gelinder Wärme eingedunstet und der erhaltene hellgelb gefärbte Syrup mit 95 proc. Alkohol in der Wärme behandelt, der alkoholische Extract lieferte Krystalle, welche noch einmal aus Methylalkohol umkrystallisirt wurden. Eine wässrige Lösung dieser Krystalle, welche in 11 cbcm. 0,4374 gr. Trockensubstanz ent-

hielt, drehte nach 24stündigem Stehen im Soleil-Ventzkeschen Apparat bei Zimmertemperatur $+11,4^\circ$ nach rechts. Daraus berechnet sich eine specif. Drehung für $[\alpha]_D = +52,19^\circ$; ferner gab die entstandene Glucose bei einem nach den Angaben von Stone und Tollens ausgeführten Gährversuche 16,2 cbcm. Gas, die gleiche Menge reinen Traubenzuckers lieferte unter ganz gleichen Versuchsbedingungen 18 cbcm. Gas; das durch Erhitzen mit essigsäurem Phenylhydrazin dargestellte Osazon schmolz bei $+202^\circ$.

Die Elementaranalyse wurde mit einer bei $101-102^\circ$ getrockneten Probe mit Kupferoxyd im Luft- resp. Sauerstoffstrom ausgeführt; ich erhielt hierbei folgende Zahlen:

- a) 0,2500 gr. Substanz verloren beim Trocknen (bei $101^\circ-102^\circ$) 0,0174 gr.
 b) 0,2002 » » gaben 0,3033 gr. CO_2 und 0,1263 gr. H_2O .
 c) 0,2308 » » » 0,3478 » » » 0,1408 » » »

Aus diesen Daten berechnet sich folgender C- und H-Gehalt:

	1.	2.	Mittel:
C	44,65	44,43	44,54
H	6,67	6,37	6,52

Ich schlage vor, dieses Kohlenhydrat mit dem Namen Paraisodextran zu bezeichnen.

Eine Substanz von ähnlichen Eigenschaften und Verhalten hat Champignon aus *Pachyma Cocos*, einer unterirdischen, knollenförmigen Pilzbildung, dargestellt, welche nach Pellet die Formel $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_{38}$ besitzen soll. Dieselbe ist mit dem Namen Pachymose belegt. Da Champignon keine weiteren Angaben über die Natur der bei der Hydrolyse der Pachymose entstehenden Glucose macht, habe ich mir eine grössere Quantität derselben dargestellt und auf die bei der Hydrolyse entstehenden Producte untersucht. Behufs Darstellung verfuhr ich ebenso, wie bei Darstellung von Paraisodextran angegeben ist. Ich erhielt eine weisse, amorphe Masse, welche in Wasser und kalten verdünnten Säuren unlöslich ist, durch Digeriren mit Schulze'schem Reagens (einem Gemisch von 0,8 Thl. Salpetersäure vom specif. Gew. 1,05 und 12 Thl. Kaliumchlorat) und darauffolgendes Behandeln mit Ammoniak wird sie vollständig

zerstört, in concentrirten Säuren und verdünnten fixen Alkalien löst sie sich allmählig auf. Aus der alkalischen Lösung wird die Pachymose auf Zusatz verdünnter Säuren, Alkohol, Chlorcalcium, Natriumphosphat, Magnesiumphosphat und Chlorammonium ausgefällt. Ob die Substanz in alkalischer Lösung optisch activ ist, vermochte ich nicht mit Sicherheit festzustellen, da eine 4proc. alkalische Lösung keine deutliche Ablenkung zeigte und Lösungen höherer Concentration zu stark gefärbt sind, um sie untersuchen zu können. Von Jod und Schwefelsäure wird die Pachymose gelb gefärbt.

Die Hydrolyse wurde in der gleichen Weise ausgeführt, wie bei Paraisodextran angegeben ist. Ich erhielt ein Product, welches in seinen Eigenschaften mit Traubenzucker (d-Glucose) übereinstimmt, wie aus Folgendem zu ersehen ist: Eine wässrige Lösung, welche in 10 cbcm. 1 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr nach 24stündigem Stehen im Soleil-Ventzke'schen Apparat $30,5^\circ$ nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +52,76^\circ$.

Beim Gährversuch gaben 0,1 cbcm. Substanz 18 cbcm. Gas, die gleiche Menge Traubenzucker lieferte 18 cbcm. Gas. Das durch Erhitzen mit essigsäurem Phenylhydrazin dargestellte Osazon schmolz bei 203° . Ein Theil der Krystalle lieferte bei der Oxydation Zuckersäure; die Silberbestimmung im zuckersauren Silber gab folgende Zahlen: 0,1794 gr. zuckersaures Silber gaben 0,0918 gr. Ag; daraus berechnet sich ein Gehalt von 51,15% Ag. Die Theorie verlangt 50,94% Ag.

Die Elementaranalyse der bei 102° getrockneten Substanz gab folgende Resultate:

- a) 0,1300 gr. Substanz gaben 0,1960 gr. CO_2 und 0,0842 gr. H_2O .
 b) 0,2256 » » » 0,3395 » » » 0,1420 » » »

Aus diesen Daten berechnet sich folgender C- und N-Gehalt:

	1	2.	Mittel:
C	41,11	41,04	41,07
H	7,19	6,95	7,01

Die im Vorigen beschriebenen Kohlenhydrate haben zweifellos Aehnlichkeit mit dem von mir früher beschriebenen

Paradextran; sie geben das gleiche Inversionsproduct und verhalten sich gegen Säuren und Alkalien ziemlich gleich; von der gewöhnlichen Cellulose unterscheiden sie sich dadurch, dass sie in verdünnten Laugen löslich sind; auch gibt nur das eine der genannten Kohlenhydrate, das Paraisodextran, Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure. Da nach den vorliegenden Angaben die Membranen einiger Pilze mit Schwefelsäure und Jod blau gefärbt werden und man wohl geneigt ist, diese Blaufärbung auf die Anwesenheit echter Cellulose zurückzuführen, so würde die experimentelle Prüfung der Frage, ob vielleicht Kohlenhydrate, wie das Paraisodextran, die Ursache solcher Blaufärbung sein können, von Interesse sein.

Neben den durch verdünnte Säure oder Lauge in Lösung zu bringenden Kohlenhydraten finden sich in Begleitung der stickstoffhaltigen Substanz Kohlenhydrate, welche durch concentrirte Schwefelsäure in Lösung gebracht werden können; die mit Wasser verdünnte Lösung gibt beim Kochen Glucose. Diese Glucose habe ich aus einem Pilzcellulosepräparat von *Polyporus officinalis* rein dargestellt und als Traubenzucker identificirt; ebenso habe ich nachgewiesen, dass aus Pilzcellulosepräparaten von *Boletus edulis* und *Agaricus campestris* Traubenzucker entsteht. Ich habe jetzt noch zwei aus *Polyporus betulinus* und *Polyporus squamosus* nach der Methode von W. Hoffmeister dargestellte Pilzcellulosepräparate der hydrolytischen Spaltung mit Schwefelsäure in der im Vorigen beschriebenen Weise unterzogen und aus beiden Fällen Traubenzucker erhalten. Die erhaltenen Glucosen gaben bei der Gährung mit Hefe nahezu ebensoviel Gas als Traubenzucker; die in bekannter Weise dargestellten Osazone schmolzen bei 203°.
