

Beitrag zur Chemie der Membranen der Flechten und Pilze.

Von

F. Escombe.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg.)
(Der Redaction durch Herrn Prof. Schmiedeberg zugegangen am 27. Juli 1896.)

Einige Wochen vor dem bedauerlichen Tode Hoppe-Seyler's hatte derselbe mich veranlasst, die Membranen des isländischen Moores, *Cetraria islandica*, auf das Vorkommen von Chitin und Cellulose zu untersuchen.

Eine höchst interessante Arbeit von Winterstein¹⁾ hat gezeigt, dass Chitin oder ein sehr ähnlicher Körper in den Membranen der Pilze *Agaricus campestris*, *Boletus edulis*, *Morchella esculenta*, *Cantharellus cetarius*, *Polyporus officinalis*, *P. betulinus*, *P. squamosa* und *Pachyma Cocos* vorkommt. Die Gegenwart dieser Substanz verursacht eine gelbe oder braune Färbung der Membranen, wenn dieselben mit Jod und Schwefelsäure oder mit der Schulze'schen Lösung behandelt werden, anstatt der blauen Farbe, welche Cellulose unter gleichen Bedingungen hervorbringt.

Nun ist es aber seit langer Zeit bekannt, dass die Membranen von Algen aus Cellulose bestehen. Es war also nach alledem zu erwarten, dass man beide Körper aus Flechten erhalten werde, da diese Pflanzen sowohl nach der Analyse von Schwendener als auch nach der Synthese von Bonnier bekanntlich aus einer symbiotischen Gemeinschaft von Pilzen und Algen bestehen.

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XX. 1894; Bd. XXI. 1895.

Ich hielt mich bei der Untersuchung an die von Hoppe-Seyler entdeckte Thatsache, dass Chitin beim Erhitzen mit Aetzkali auf 180° in Chitosan umgewandelt¹⁾ wird, während Cellulose unangegriffen bleibt²⁾. Nun ist Chitosan in verdünnten Säuren löslich¹⁾, während Cellulose in denselben unlöslich ist; dadurch lassen sich beide trennen. Das Chitosan kann dann aus der sauren Lösung durch Alkali ausgefällt werden.

I. Versuche mit *Cetraria islandica*.

Das zuerst benutzte Material war die käufliche Flechte, welcher aber immer viele andere Pflanzentheile beigemischt waren. Diese entfernte ich möglichst vollständig mittelst einer kleinen Zange oder einer Nadel. Diese mechanische Reinigung bot Schwierigkeiten dar, weil einige der Stücke ungemein fest an der Flechte hafteten. Es war aber nicht möglich, in dieser Weise alle Beimengungen zu entfernen. Deshalb benutzte ich später nur Exemplare der Flechte, welche ich in den Vogesen frisch gesammelt hatte; diese waren viel besser ausgewachsen und freier von fremden Pflanzentheilen. Es war leichter möglich, viele der anhaftenden Stücke während der Behandlung wegzuwaschen.

Das Extrahiren geschah in einer ziemlich grossen Flasche, und ging in der folgenden Weise nach der von Payen³⁾ benutzten Methode vor sich:

Die *Cetraria* wurde zuerst 3 $\frac{1}{2}$ Stunden mit 96procentigem Alkohol gekocht, und blieb einen Tag⁴⁾ darin liegen; darauf wurde sie wieder 3 $\frac{1}{2}$ Stunden erhitzt. Der Alkohol wurde sodann abgegossen und die Flechte mit Aether versetzt; in diesem blieb sie einen Tag liegen. Hierauf wurde der Aether abgegossen, die Flechte mit destillirtem Wasser abgespült und

¹⁾ Hoppe-Seyler. Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1894, S. 3329; Araki, diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 502.

²⁾ Hoppe-Seyler, diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 77.

³⁾ Husemann-Hilger, «Die Pflanzenstoffe», Lichenin.

⁴⁾ Dieses Wort bedeutet hier und hiernach eine Zeit von 20—24 Stunden.

mit einer 1 procentigen Lösung von Schwefelsäure übergossen; darnach stand die Flasche noch einmal einen Tag unberührt. Die Säure wurde alsdann abgegossen, das isländische Moos mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen und mit einer 1 procentigen Lösung von krystallisirtem Natrium-Carbonat versetzt; in dieser Lösung blieb die *Cetraria* einen Tag. Der braungefärbte Extract wurde weggeworfen, das Extrahiren wiederholt, bis der Extract nur wenig gefärbt erschien. Sodann wurde die Flechte bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction ausgewaschen und darauf mit dem mehrfachen Volumen von dest. Wasser in einer grossen Schale auf dem Wasserbad 1—2 Stunden erhitzt, wodurch viel Lichenin ausgezogen wurde. Diese Behandlung wurde wiederholt, bis Alkohol nur einen unbedeutenden Niederschlag von Lichenin gab.

Durch dieses Verfahren hat die Flechte an Volumen sehr abgenommen; wie oft aber auch das Auskochen mit Wasser geschehen mochte, so war es doch niemals möglich, die Flechte zu zerstören, mit anderen Worten: die Pilz-Hyphen wurden niemals vollständig aufgelöst, was auf die Gegenwart einer in den Extractionsmitteln unlöslichen Substanz oder mehrerer solcher hindeutete.

Mit der Schulze'schen Lösung behandelt, nahmen die Flechtenstücke, welche vorher gelblich aussahen, eine blauschwarze Farbe an. Die Untersuchung mit der Lupe deutete auf eine Färbung der Algen-Membranen hin, während die Hyphen bloss hell bräunlich gefärbt erschienen, was durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt werden konnte.

Das Lichenin wurde aus dem wässerigen Auszug mit Alkohol ausgefällt und für die spätere Bearbeitung aufbewahrt.

Die von Lichenin befreiten Flechtenstücke wurden zum Abtropfen auf einen Trichter gebracht, sodann in einer Retorte mit ungefähr der zehnfachen Menge von Aetzkali auf dem Oelbade erhitzt und um 180° C. einige Zeit erhalten, so zwar, dass die Temperatur einige Male bis 180° erhöht und dann bis 175° erniedrigt wurde. Nach der Abkühlung wurde die Schmelze in dest. Wasser aufgelöst, die Lösung stark

verdünnt und durch möglichst wenig Asbest abfiltrirt. Diese alkalische Lösung wurde nicht untersucht.

Der Rückstand, welcher äusserst fein vertheilt war, wurde mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen. Bei der mikroskopischen Untersuchung einiger dieser Stückchen zeigte es sich, dass die Hauptmasse aus losen Algenzellen der *Cetraria* bestand. Ausserdem waren hie und da Bruchtheile von Hyphen sichtbar, welche aber, sofern ich dies beurtheilen konnte, nicht als diejenigen der *Cetraria*, sondern als solche fremder, beigemischter Flechten anzusehen waren. Jedenfalls war ihre Zahl äusserst gering. Es waren weiter viele Fetzen von Laubmoosen und höheren Pflanzen zu unterscheiden.

Es wurde sodann noch etwas von dem schlammigen Rückstand mit Chlorzink-Jod (der Schulze'schen) Lösung behandelt und mikroskopisch untersucht; es erwies sich, dass die Algen-Membranen ein schönes Blau angenommen hatten. Die fraglichen Hyphen, welche äusserst selten waren, zeigten eine violette Färbung.

Der Rückstand wurde alsbald sammt dem Asbest in ein kleines Becherglas gebracht und mit sehr verdünnter Essigsäure übergossen. Nach einem Tag wurde die saure Lösung, welche hell röthlich braun gefärbt war, wieder durch wenig Asbest abfiltrirt, und mit Natronlauge stark alkalisch gemacht. Kein Niederschlag entstand, was die Abwesenheit von Chitosan zu beweisen schien.

Die Quantität des Rückstandes nach dem Schmelzen war äusserst gering im Verhältniss zu der verarbeiteten Menge von *Cetraria*. Nach dem Ausspülen mit dest. Wasser sah der schlammige Rückstand hell bräunlich und gleichzeitig etwas grau aus. Die Essigsäure schien etwas von demselben aufgelöst zu haben, was aber kaum Chitosan sein konnte.

Eine Portion des gut ausgewaschenen Rückstandes, welcher von der verdünnten Essigsäure nicht angegriffen war, wurde jetzt mit Chlorzink-Jod behandelt und mikroskopisch untersucht. Ich bekam dieselben Resultate wie in dem schon erwähnten ähnlichen Versuch. Um festzustellen, ob die Algen-

Membranen aus Cellulose bestanden, behandelte ich, was von dem Rest übrig blieb, mit der Schweizer'schen Lösung¹⁾ und säuerte mit Salzsäure an: es entstand ein verhältnissmässig voluminöser, flockiger, weisser Niederschlag, was die Gegenwart von Cellulose bewies. Der spärliche Rest, welcher nicht in dieser Lösung aufgelöst war, wurde alsdann mikroskopisch untersucht; es war darin nichts zu finden ausser dunkelbraunen Pflanzentheilen und kleinen Partikelchen, deren Natur nicht festgestellt werden konnte. Daraus folgt, dass die Algen-Membranen ganz sicher aus einer Cellulose bestehen. Es ist ersichtlich, dass der nach der Ansäuerung der Schweizer'schen Lösung auftretende Niederschlag theilweise aus den schon erwähnten Theilchen höhere Pflanzen zusammengesetzt war.

Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und gab jedesmal dasselbe Resultat.

Um etwas Näheres über die Natur der in den Extractionsmitteln unlöslichen Substanz oder Substanzen zu erfahren, wurde eine in der beschriebenen Weise extrahirte Flechtenmenge mit 5 procentiger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht. Dabei gingen die Hyphen-Membranen vollständig in Lösung; der unangegriffene Rückstand war ein Gemenge von losen Algenzellen, Fetzen von höheren Pflanzen und anderen Theilchen. Nach der Abkühlung wurde die freie Säure mit Baryum-Carbonat neutralisirt und die Flüssigkeit mit Thierkohle entfärbt. Eine Portion der farblosen Flüssigkeit wurde auf Pentosen mit Phloroglucin und Salzsäure und mit Anilin-Acetat geprüft; keine rothe Färbung entstand, was die Abwesenheit jener bewies. Noch eine Portion wurde auf d-Fructose mit dem Seliwanoff'schen Reagens (Lösung von Resorcin in Salzsäure) geprüft; auch dieser Versuch ergab ein negatives Resultat.

Die Flüssigkeit wurde darauf bis auf ein ziemlich kleines Volumen abgedampft, von ausgeschiedenem Baryum-Carbonat

¹⁾ Diese Lösung wurde durch Einwirkung von ziemlich starkem Ammoniak auf Kupferspähe bereit. Ihre Brauchbarkeit wurde jedesmal vor dem Versuch festgestellt.

abfiltrirt und noch einmal mit Thierkohle behandelt. Die jetzt ganz farblose Flüssigkeit wurde bis zur Syrupconsistenz eingengt, darauf mit 1,15procentiger Salpetersäure in hinreichender Quantität übergossen und auf-dem Wasserbad unter fortdauerndem Umrühren bei gelinder Temperatur bis zum Syrup abgedampft. Beim Abkühlen schieden sich Mikrokrystalle aus der Mutterlauge in verhältnissmässig grosser Menge aus. Dieselben wurden auf einen Trichter gebracht und erst mit dest. Wasser und hierauf mit 96procentigem Alkohol ausgewaschen. Der Körper besass jetzt ein schönes schneeweisses Aussehen. Nach dem Trocknen in einem mit concentrirter Schwefelsäure versehenen Exsiccator wurde der Schmelzpunkt bestimmt; derselbe wurde zwischen 212° und 213° gefunden, welchen Tollens¹⁾ und Wehmer²⁾ als den richtigen für Schleimsäure angeben. Auch das Aussehen der Substanz wies mit ziemlicher Sicherheit auf Schleimsäure hin; trotzdem führte ich eine C- und H-Bestimmung mit derselben aus, um ihre Natur völlig sicher zu stellen.

Berechnet auf $C_6H_{10}O_8$:		Gefunden:
C	34,29%	34,17
H	4,76 »	5,05

Dieses Resultat sichert die Identität dieser Substanz mit Schleimsäure.

Die von der Schleimsäure abfiltrirte wässerige Flüssigkeit, welche Salpetersäure enthielt, wurde nach dem Verfahren von Tollens³⁾ auf die Gewinnung von Zuckersäure verarbeitet. Die Flüssigkeit wurde mit trockenem Kalium-Carbonat neutralisirt und darauf mit Essigsäure stark angesäuert. Diese saure Lösung blieb sodann eine Zeit lang stehen. Eine äusserst dünne Schicht von farblosen Mikrokrystallen bildete sich am Boden des Becherglases, welche wegen ihrer Spärlichkeit nicht untersucht werden konnten. Es war möglich, dass dieselbe aus saurem zuckersaurem Kalium bestand, jedoch,

¹⁾ «Kohlenhydrate», Bd. I, S. 314.

²⁾ Inaugural-Diss., Göttingen, 1886, S. 40.

³⁾ Loc. cit., Bd. I, S. 308.

wenn das der Fall war, hätte die Quantität von Glucose in der Lösung ganz minimal sein müssen.

Daraus folgt, dass die Hyphen-Membranen nach dem Extrahiren von Fetten, Oelen, Farbstoffen, bitteren Substanzen, Lichenin und sonstigen Körpern wesentlich aus einem in den Extractionsmitteln unlöslichen Anhydrid der Galactose zusammengesetzt waren. Nach seinen Eigenschaften zu urtheilen, ist dasselbe ein Paragalactan.

Da ich etwas Lichenin durch dieses Verfahren in die Hand bekam, schien es mir zweckmässig, dessen Invertirungsproduct zu untersuchen. Tollens¹⁾ citirt die Angaben einiger Autoren, nach welchen d-Glucose aus diesem Product auskrystallisiren und Zuckersäure durch Einwirkung von Salpetersäure gebildet werden soll.

Das zur Invertirung benutzte Lichenin wurde aus dem wässerigen Extract mit Alkohol ausgefällt und zur Reinigung noch einmal in warmem Wasser aufgelöst und niedergeschlagen. Die Substanz wurde abfiltrirt und hernach invertirt, indem sie mit 5 procentiger Schwefelsäure 6 Stunden gekocht wurde. Darauf wurde die Flüssigkeit mit Baryum-Carbonat neutralisirt, von dem Sulfat und überschüssigem Carbonat abfiltrirt, mit Thierkohle entfärbt und das farblose Filtrat mit einer hinreichenden Menge von Phenylhydrazinhydrochlorid und Natrium-Acetat versetzt. Die Flüssigkeit blieb hierauf mehrere Stunden stehen; es bildete sich dennoch kein Niederschlag von Mannosehydrazon, was die Abwesenheit von Mannose bewies. E. Fischer²⁾ hat schon angegeben, dass er keine Mannose aus Lichenin bekommen konnte. Die Flüssigkeit wurde alsdann auf dem Wasserbad erwärmt; es schied sich bald das gelbe Osazon aus. Die Flüssigkeit wurde noch einige Zeit gekocht und darauf von dem Niederschlag abfiltrirt. Der Rückstand wurde mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction und sodann mit 96 procentigem Alkohol ausgewaschen, danach das Osazon durch mehrfaches Umkrystallisiren aus Aceton gereinigt und zuletzt fractionirt krystallisiren gelassen. Die Fractionen wur-

¹⁾ Loc. cit., Bd. I, S. 199.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 22, S. 369.

den im Luftbad bei 110° und im Exsiccator getrocknet. Darauf wurden die Schmelzpunkte bestimmt. Diese fielen alle gleich aus, nämlich 191° — 192° , welche Zahl mit der von E. Fischer angegebenen übereinstimmt.

Eine Portion der das invertirte Lichenin enthaltenden Flüssigkeit diente zu quantitativen Versuchen. Eine kleine Menge dieser farblosen neutralen Lösung wurde auf Pentosen mit Phloroglucin und Salzsäure und mit Anilin-Acetat geprüft; das Resultat war negativ. Ein anderer Theil wurde auf d-Fructose mit dem Seliwanoff'schen Reagens untersucht; auch hier war das Resultat negativ.

Versuche, welche unternommen wurden, um saures zuckersaures Kalium zu gewinnen, ergaben wie in der vorigen ähnlichen Probe ein negatives Resultat. Eine äusserst dünne Schicht wurde am Boden des Becherglases gebildet, welche das betreffende Salz hätte sein können. Daher scheint es, dass Lichenin keine Glucose in seinem Molekül einschliesst. Der Schmelzpunkt des Osazons bestätigt diesen Schluss.

Darnach ist es wahrscheinlich, dass Lichenin ein Anhydrid der Galactose, ein Galactan, ist. Weitere Untersuchung ist jedoch nöthig, um diesen Punkt mit vollkommener Sicherheit festzustellen. Durch die Oxydation mit Salpetersäure wurde eine schleimsäureähnliche Substanz erhalten, welche leider verloren ging. Dieser Annahme widersprechen die Resultate von Muntz¹⁾, der Glucose aus *Cetraria islandica* erhielt. Er hat aber sein Verfahren nur kurz beschrieben. Es ist möglich, dass die von ihm gefundene Glucose von dem Isolichenin, welches in dem alkoholischen Auszug bleiben soll, herrührte, oder vielleicht von einer im Plasma enthaltenen Substanz. Das Isolichenin hatte ich aber keine Zeit zu untersuchen.

Nach alledem scheint zu folgen, dass die Hyphen-Membranen von *Cetraria* hauptsächlich aus Lichenin, einem Galactan, Isolichenin und einem Paragalactan bestehen und weder Chitin, einen Chitin ähnlichen Körper, noch Cellulose enthalten. Die Algen-Membranen scheinen dagegen wesentlich aus einer Cellulose zu bestehen.

¹⁾ Ann. Chim. Phys. (6), S. 566.

II. Untersuchung von *Peltigera canina*.

Ich unterwarf hernach *Peltigera canina* der Untersuchung auf Chitin und Cellulose. Das Material wurde theilweise im Schwarzwald und theilweise in den Vogesen gesammelt; dasselbe war kräftig und schön ausgewachsen.

Ich liess zuerst die Pflanzen in der Luft einigermaassen trocknen; darauf entfernte ich möglichst vollkommen fremde anklebende Pflanzentheile. Diese Arbeit war weit mühsamer als bei der *Cetraria*; sie kostete viele Zeit und war doch niemals annähernd vollkommen.

Es ist ersichtlich, dass diese zurückbleibenden fremden Stücke von grossem Nachtheil waren, indem dieselben sich während der Behandlung verhältnissmässig vermehrten, da die Flechtenstücke in Volumen viel mehr abnahmen, als die fremden Theile. Diese Thatsache verursachte Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Untersuchung. Die erste Behandlungsmethode war dieselbe, wie bei der *Cetraria*.

Das Material blieb 2 Tage in 96 procentigem Alkohol in einer geräumigen Flasche liegen und wurde darnach 2 Stunden darin gekocht, 2 Stunden noch einmal stehen gelassen und darauf wieder eine Stunde gekocht. Die Flechte wurde sodann mit dest. Wasser ausgewaschen und mit einer 1 procentigen Lösung von kryst. Natrium-Carbonat versetzt; in diesem Extractionsmittel blieb das Material einen Tag. Darnach wurde es mit dest. Wasser gut ausgewaschen und der Einwirkung einer 1 procentigen Lösung von Salzsäure 2 Tage überlassen. Hierauf wurden die Flechtenstücke mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen und noch einmal der Einwirkung einer 1 procentigen Lösung von kryst. Natriumcarbonat einen Tag unterworfen. Die *Peltigera* wurde alsdann mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen und sogleich nachher mit dem mehrfachen Volumen dest. Wasser erhitzt, um möglicherweise vorhandenes Lichenin zu entfernen. Der Extract wurde abgossen, eingengt und mit Alkohol versetzt. Es entstand kein Niederschlag, was die Abwesenheit von Lichenin bewies. Dieses

Extrahiren mit heissem Wasser wurde noch einmal wiederholt und der Extract weggegossen.

Das Material sah jetzt hell gelbbraun aus. Ein Theil desselben wurde zur qualitativen Untersuchung benutzt, der andere aber in folgender Weise weiter bearbeitet.

Eine Portion des ersten Theiles wurde mit Kupferoxyd-Ammoniak übergossen und nach einiger Zeit mit Salzsäure angesäuert. Keine Spur von einem Niederschlag entstand; daraus folgt, dass wenn Cellulose vorhanden war, sie durch irgend eine andere Substanz vor der Lösung geschützt war.

Eine zweite Portion wurde mit der Schulze'schen Lösung behandelt. Keine Andeutung von blauer Färbung war zu beobachten; hieraus lässt sich derselbe Schluss wie aus dem vorigen Versuch ziehen.

Was von dem ersten Theil übrig blieb, wurde mit Aetzkali bei 180° in der schon erwähnten Weise geschmolzen. Die Schmelze wurde in dest. Wasser aufgelöst, verdünnt und durch Asbest abfiltrirt, der Rückstand mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen. Derselbe war weiss, mit Ausnahme der meisten Rhizoiden und einiger Thallusstückchen, durchsichtig und äusserst zart; die Umrisse der Stücke waren vollständig erhalten: sobald einige derselben mit Chlorzink-Jod übergossen wurden, nahmen sie purpur-violette Farbe an. Die mikroskopische Untersuchung lehrte, dass die Hyphen-Membranen gefärbt waren, während Algen-Membranen nicht zu finden waren. Da Chitosan sich mit Jod violett färbt¹⁾, schien dieses Resultat darauf zu deuten, dass die betreffenden Membranen in der unbearbeiteten Flechte wesentlich aus Chitin oder einem ähnlichen Körper bestanden, während die Algen-Membranen weder aus Cellulose noch irgend einer anderen unter den Versuchsbedingungen resistenten Substanz zusammengesetzt waren.

Eine andere Portion des Rückstandes wurde mit Kupferoxyd-Ammoniak behandelt. Kein Niederschlag fiel auf Ansäuern aus, was die Abwesenheit von Cellulose bewies. Um

¹⁾ T. Araki, loc. cit.

dieses ganz sicher festzustellen, wurde eine grössere Menge in ähnlicher Weise behandelt; auf Ansäuern entstand ein sehr geringer Niederschlag, welcher zweifelsohne von fremden Pflanzenstückchen herrührte.

Was von dem Rückstand noch übrig blieb, wurde mit verd. Essigsäure übergossen; nachdem die Säure einige Stunden eingewirkt hatte, wurde die Lösung von dem ungelösten Rest abfiltrirt und mit Natronlauge alkalisch gemacht; es entstand dabei ein weisser flockiger gelatinöser amorpher Niederschlag, welcher Aehnlichkeit mit demjenigen von Chitosan, das unter gleichen Bedingungen aus Chitin gewonnen war, besass. Derselbe wurde mit dest. Wasser durch Abgiessen bis zur neutralen Reaction ausgewaschen und auf dem Wasserbad getrocknet. Die Substanz blieb hiernach einen Tag im Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure stehen. Die Ausbeute an derselben war sehr gering.

Ein Theil davon wurde auf Platinblech verbrannt; er brannte unter Verkohlung, ohne viel Asche zu hinterlassen.

Eine andere Portion wurde durch die Lassaigne'sche Methode auf Stickstoff geprüft; ein äusserst geringer Niederschlag von Berliner-Blau bewies die Gegenwart von Stickstoff.

Eine Portion des in verd. Essigsäure unlöslichen Rückstandes wurde mikroskopisch untersucht. Es waren nur kleine unerkennbare Theilchen, immer noch tief braun gefärbte Stücke von Rhizoiden und fremden Pflanzentheilen. Von den Hyphen von Peltigera war gar nichts zu sehen.

Eine andere Portion dieses von verd. Essigsäure unangegriffenen Rückstandes wurde mit Kupferoxyd-Ammoniak übergossen und darin eine Zeit lang gelassen; nachher wurde die Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert: kein nennenswerther Niederschlag entstand, was die Abwesenheit von Cellulose bewies.

Ich fuhr jetzt mit der Bearbeitung des anderen Theiles des Materials fort.

Es war wünschenswerth, eine Methode zu benutzen, welche die Membranen möglichst vollständig zu entfärben vermochte.

Winterstein¹⁾ hat die Methode von Hofmeister für die Bereitung von Cellulose durch Einwirkung von Salzsäure und chlorsaurem Kalium benutzt; diese Methode wollte ich aber vermeiden, weil die Einwirkung dieses Gemenges eine zu tiefgreifende ist. Ich versuchte also die Membranen dadurch zu entfärben, dass ich die Peltigera mit Salzsäure und Kalilauge von steigender Concentration behandelte.

Nach Einwirkung jedes Reagens wurden die Flechtenstücke auf einem grossen Trichter, dessen Mündung mit Stückchen eines dicken Glas-Stabes versehen war, gebracht und mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaction ausgewaschen. Diese Methode bringt den Vortheil mit sich, dass fremde Stücke durch das Auswaschen entfernt werden. Der Kürze halber gebe ich hier nur die Reagentien der Reihe nach sammt Procent-Gehalt und Zeitdauer der Einwirkung in abgekürzter Weise an, wie folgt:

In Kalilauge von 5%: einen Tag. Dieses Mittel wurde benutzt, bis wenig Farbstoff durch die Lauge aufgenommen wurde. In Kalilauge von 7%: einen Tag. Dann in Salzsäure von 2%: einen Tag. Mit 96 procentigem Alkohol anderthalb Stunden gekocht; blieb darnach einen Tag stehen. Mit frischem Alkohol zweiundeinhalb Stunden gekocht. Dann in Kalilauge von 10%: einen Tag. Anderthalb Stunden in derselben erhitzt; blieb hernach einen Tag stehen. In Kalilauge von 14–15%: 2 Tage.

Trotz dieser Behandlung blieben die Rhizoide im nassen Zustand stark gefärbt, während der Thallus hell bräunlich war.

Ich machte wieder mit einigen Stücken die schon erwähnten qualitativen Versuche, bekam aber ganz dieselben Resultate.

Die gut ausgewaschenen Flechtentheile wurden bei 180° mit Aetzkali in der schon erwähnten Weise geschmolzen. Das weitere Verfahren war ganz dasselbe wie vorher. Die essigsäure Lösung wurde alkalisch gemacht und der Niederschlag ausgewaschen und getrocknet.

¹⁾ Loc. cit.

Da die in dieser Weise erhaltene Menge nicht zur Analyse ausreichte, wurde ein weiterer Theil der Flechte bearbeitet. Da es diesmal nicht nöthig war, auf Lichenin Rücksicht zu nehmen, wurde das folgende Verfahren eingeschlagen:

In Salzsäure von 3%: einen Tag. In Aether: 2 Tage. Drei Stunden in Alkohol gekocht: blieb einen Tag stehen. In Salzsäure von 5%: einen Tag, in Kalilauge von 9—10%: einen Tag, in Salzsäure von 5%: einen Tag, in Kalilauge von 9—10%: einen Tag. Ferner in schwefliger Säure und Schwefelsäure (100 Theile der wässerigen Lösung des Schwefel-Dioxyds in 900 Theilen dest. Wasser): zwei Tage.

Das Material sah nach dieser Behandlung heller als nach der vorigen aus, doch waren die Rhizoide immer noch dunkel gefärbt. Deshalb schnitt ich möglichst viele derselben in der mechanischen Vorbereitung des nächsten Theiles weg.

Die Flechten-Stücke wurden sodann geschmolzen. Die nachherige Behandlung war dieselbe wie vorher.

Ein dritter Theil der Flechte wurde in ähnlicher Weise behandelt.

Die Substanz sah nach dem Trocknen auf dem Wasserbad tief braun, beinahe schwarz und amorph aus; ihre Consistenz war hart und spröde. Um den Farbstoff zu entfernen, übergoss ich die Substanz mit Aceton, Chloroform und Aether der Reihe nach; alles war jedoch vergebens, der Farbstoff blieb hartnäckig zurück.

Ich löste nun die Substanz in verd. Essigsäure, in welcher der Farbstoff löslich war, und fügte Eisessig hinzu, in der Erwartung, dass der Körper wieder ausfallen würde, während der Farbstoff in Lösung bliebe. Dieses geschah jedoch nicht und es war daher nöthig, wieder mit Kalilauge auszufällen.

Die Löslichkeit der Substanz in sehr concentrirter Essigsäure scheint zwar gegen dessen Identität mit Chitosan zu sprechen; trotzdem bestand in jeder anderen Hinsicht grosse Aehnlichkeit zwischen Beiden. Nach dem Auswaschen wurde die Substanz getrocknet. Sie sah beinahe schwarz aus, während Chitosan gelblich aussehen soll.

Die Ausbeute war im Ganzen leider sehr gering. Die Quantität reichte nur aus für eine Verbrennung und eine Stickstoff-Bestimmung nach Dumas.

Man sieht, dass die Zahlen mit Chitosan gar nicht übereinstimmen.

Berechnet auf $C_{14}H_{26}N_{21}O_0$:		Gefunden:
C	43,97 %	41,69
H	6,80 »	4,99
N	7,42 »	1,35

Der Gehalt an Asche war 4,94%, der grösste Theil derselben bestand aus Eisen. Ausserdem waren Spuren von alkalischen Erden und Alkalien nachzuweisen.

Die Unterschiede zwischen den für Chitosan berechneten Zahlen und den gefundenen sind geradezu enorm.

Wenn also Chitosan überhaupt vorhanden war, so zeigt die Analyse, dass die benutzte Methode nicht hinreichend war, die Verunreinigungen zu entfernen. Es ist aber immerhin möglich, dass es sich nicht um Chitosan, sondern um einen ähnlichen Körper handelte. Um diesen Punkt festzustellen, müssen weitere Untersuchungen gemacht werden, welche ich jedoch nicht die Gelegenheit haben werde, auszuführen.

Ich kann diesen Theil nicht verlassen, ohne Herrn Professor Schmiedeb erg, der mich in der vorstehenden Untersuchung freundlichst durch seinen Rath unterstützt hat, dafür meinen herzlichen Dank auszusprechen.

III. *Evernia prunastre*.

Da ich zufälligerweise etwas *Evernia prunastre* in die Hand bekam, wurde dieselbe gleichfalls der Untersuchung auf Chitin und Cellulose unterworfen.

Das Material war von fremden Bestandtheilen ziemlich frei.

Das Verfahren war dem bei *Peltigera* benutzten ähnlich, doch abgekürzt, wie folgt:

Aether: einen Tag. Mit 96 procentigem Alkohol zweieinhalb Stunden gekocht; blieb hernach zwei Tage unberührt.

Salzsäure 1%: einen Tag. Kalilauge 2—3%: einen Tag.
Salzsäure 1%: einen Tag.

Die Thallus-Stücke sahen jetzt farblos aus und besaßen eine äusserst gallertige Consistenz.

Einige von denselben wurden mit Chlorzinkjod untersucht. Sie nahmen hierbei bloss eine gelbe Farbe an; die grossen Algenzellen zeigten immer noch einen Inhalt, welcher braun gefärbt war, die Membranen dagegen gar nicht. Auf dieser Stufe der Behandlung war also keine Cellulose qualitativ nachzuweisen.

Darauf blieben die Flechten-Stücke ein Paar Tage auf dem Trichter, damit möglichst viel Wasser ablaufen konnte. Hernach folgte das Schmelzen.

Einige Stücke des ausgewaschenen Rückstandes von der gelösten Schmelze wurden mit Chlorzinkjod behandelt und mikroskopisch untersucht. Die Algen-Membranen waren violett-blau gefärbt, die Hyphen, von welchen bloss eine geringe Menge vorhanden war, gar nicht. Dieses deutete darauf, dass die Membranen der Algenzellen aus einer Cellulose bestanden, dass aber der Hyphenrest nicht aus Chitosan zusammengesetzt war.

Eine andere Portion wurde mit Kupferoxyd-Ammoniak übergossen und die nach einiger Zeit abfiltrirte Lösung mit Salzsäure angesäuert; es entstand ein geringer Niederschlag. Der unbedeutende, nach Auswaschen mit dest. Wasser hinterbleibende Rückstand zeigte bei mikroskopischer Untersuchung keine Algen-Membranen, was bewies, dass diese Membranen sicher aus einer Cellulose bestanden.

Der Rest des Haupt-Rückstandes wurde jetzt in verd. Essigsäure aufgelöst, die saure Lösung nach einiger Zeit abfiltrirt und mit Natronlauge alkalisch gemacht. Am nächsten Tag war zwar eine äusserst dünne Schicht auf dem Boden des Becherglases zu bemerken; dieselbe war gallertartig und farblos und viel zu gering, um genauer untersucht zu werden.

Es ist möglich, dass diese Substanz Chitosan oder ein ähnlicher Körper war. Wenn dies der Fall ist, so musste der

Gehalt an Chitin oder einem ähnlichen Körper in der Flechte sehr gering sein, da im Verhältniss zu der in Arbeit genommenen Quantität der erhaltene Niederschlag ausserordentlich gering war. Der Haupttheil der Hyphen schien aus der nach Behandlung mit Kalilauge gallertartig gewordenen Substanz, welche während des Schmelzens verschwand, zu bestehen. Dieselbe wurde nicht untersucht.

IV. Sclerotium der *Claviceps purpurea*.

Zur weiteren Untersuchung kann das Sclerotium der *Claviceps purpurea*. Ich wurde hierbei von Herrn Professor Schmiedeberg, der mich zur Untersuchung dieses Materials veranlasste und viel Interesse an derselben nahm, mit Rath und That unterstützt. Ich ergreife desshalb diese Gelegenheit, um demselben auch dafür meinen besten Dank auszusprechen.

Das Mutterkorn ist vor einiger Zeit schon von E. Gilson¹⁾ untersucht worden. Da ich bei der Bearbeitung dieses Materials ein Verfahren benutze, welches von dem seinigen abwich, so will ich hier eine kurze Stelle aus seiner Arbeit citiren, in welcher er seine Methode beschreibt:

«Le produit finement pulvérisé et préalablement dégraissé au moyen de l'éther est traité à plusieurs reprises avec une solution de soude caustique alcaline; puis il est lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition de la réaction alcaline. On le soumet alors à l'ébullition pendant 6 heures avec une solution d'acide sulfurique à 2 $\frac{1}{2}$ %. On le lave ensuite complètement à l'eau distillée.

L'ébullition avec l'acide sulfurique dilué a fait passer en solution une notable partie du produit. On abandonne le résidu insoluble pendant quatorze jours avec un mélange de 12 parties d'acide nitrique d'une densité de 1.15 et d'une partie de chlorate de potasse. On débarrasse ensuite le produit de l'excès d'acide par un lavage à l'eau distillée, puis on le fait digérer pendant une heure environ à la température de 60° dans une solution très diluée d'ammoniaque. Finalement,

¹⁾ « Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons ». Extrait de la Revue « La Cellule », t. XI. 1^r fascicule.

on lave complètement à l'eau distillée, puis à l'alcool et l'on sèche».

Die Benutzung so kräftig einwirkender Agentien wie chlorsauren Kaliums und Salpetersäure erschien mir bedenklich, weil sie möglicherweise eine Veränderung der in den Membranen enthaltenen Substanzen bewirken konnten. Deshalb benutze ich das Verfahren, welches ich schon beschrieben habe und welches in abwechselndem Extrahiren mit Kalilauge und Salzsäure bestand.

Die ganzen Körner wusch ich zunächst erst mit gewöhnlichem Wasser tüchtig ab; dadurch wurden viele fremde Theile fortgeschafft und etwas Farbstoff ausgezogen. Darauf reinigte ich noch jedes Korn einzeln. Sie wurden alsdann an der Luft etwas getrocknet und nachher in einem Mörser zerkleinert.

Das weitere Verfahren war wie folgt:

Anderthalb Stunden mit 96 procentigem Alkohol gekocht: blieb einen Tag stehen; in 900 cbcm. Alkohol, welcher 4 cbcm. conc. Salzsäure enthielt, einen Tag; nachher 3 Stunden gekocht: in Alkohol zwei Tage; in Salzsäure von 1% einen Tag; in Kalilauge von 2—3% einen Tag. Noch zweimal in Salzsäure von 1% zwei Tage; 2 Stunden mit Alkohol gekocht: in Aether einen Tag; in Kalilauge von 5% einen Tag; in Kalilauge von 6—7% einen Tag; in Salzsäure von 15% einen Tag; in Aether einen Tag. Mit Alkohol 2 $\frac{1}{2}$ Stunden gekocht: in Salzsäure von 5% einen Tag; in Natronlauge von 9—10% zwei Tage; in Kalilauge von 12° drei Tage.

Mit Ausnahme der Rinde war die Masse schneeweiss geworden. Die Rinde war blass violett-braun gefärbt. Von dem Farbstoff konnten die Extractionsflüssigkeiten zuletzt nur äusserst wenig ausziehen.

Die Stücke blieben eine Zeit lang auf dem Trichter, damit möglichst viel Wasser ablaufen konnte. Darauf wurden sie in einer silbernen Schale auf einem Sandbad bei 180° geschmolzen. Die Schmelze wurde in dest. Wasser aufgelöst, verdünnt und das Ungelöste, welches äusserst fein zertheilt war, abcentrifugirt. Der Farbstoff blieb in der alkalischen Lösung:

eine Portion derselben wurde angesäuert: es fiel ein schmutzig weisser Niederschlag, welcher in Aether löslich war, aus. Nach Abdampfen der ätherischen Lösung blieben ölige Tropfen zurück, welche mit der Zeit krystallinisch erstarrten. Wahrscheinlich lag eine aliphatische Säure vor; die Substanz wurde jedoch, da die vorhandene Menge nicht ausreichte, nicht näher untersucht.

Nach dem Abcentrifugiren wurde die obenstehende alkalische Flüssigkeit abgossen und der Absatz in verd. Essigsäure aufgelöst; die Lösung wurde sodann von dem Ungelösten abfiltrirt.

Zu der Lösung wurden einige Tropfen Oxalsäurelösung hinzugefügt, um auf die Gegenwart von Kalk zu prüfen; dadurch aber wurde ein schleimiger Niederschlag gebildet. Derselbe wurde mit Salzsäure aufgelöst.

Da die Lösung immer noch etwas trübe war, wurde etwas Alkohol zugebracht, und dieselbe centrifugirt.

Darnach wurde die noch opalisirende Flüssigkeit abgossen und mit Natronlauge alkalisch gemacht, wodurch ein schleimiger, schmutzig weisser Niederschlag ausfiel. Die Flüssigkeit wurde alsdann erwärmt und abfiltrirt, der Rückstand noch einmal mit Salzsäure aufgelöst und mit Natronlauge ausgefällt. Zu der Flüssigkeit wurde wieder etwas Alkohol hinzugefügt und der Niederschlag abfiltrirt. Derselbe wurde bis zur neutralen Reaction mit verd. Alkohol ausgewaschen, getrocknet und analysirt.

Die Substanz im getrockneten Zustand sah gerade wie diejenige aus *Peltigera canina* aus, nämlich schwarz und amorph; ihre Consistenz war hart und spröde.

Es wurden zwei Verbrennungen gemacht:

	Berechnet	Gefunden:	
	für $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$:	I.	II.
C	43,97 %	41,33	41,33
H	6,80 »	6,79	6,10
N	7,32 »	—	—

Der Procent-Gehalt an Asche war im ersten Fall 1,98, im zweiten 1,92. Der Haupttheil derselben bestand aus Eisen,

welchem etwas Kalk und Spuren von Alkalien beigemischt waren.

Die Prüfung auf Stickstoff nach Lassaigne ergab, dass der Gehalt der Substanz an Stickstoff sehr gering war und meines Erachtens nicht 7,32% betragen konnte.

Der Unterschied zwischen den zwei Zahlen für Wasserstoff ist gross; es ist zu bedauern, dass ich weder Zeit noch Material hatte, noch mehrere Analysen zu machen.

Es ist merkwürdig, dass der Gehalt an Kohlenstoff ziemlich gut mit dem der aus *Peltigera* erhaltenen Substanz übereinstimmt, welcher 41,69 betrug; der Unterschied ist 0,36%. Der Wasserstoff in *Peltigera* bleibt dagegen weit hinter demjenigen von *Claviceps*: ich glaube aber, dass dieser Unterschied durch einen Verlust an Wasser während der Analyse zu erklären ist. Nun hat Gilson für sein Mycosine die Formel $C_{14}H_{28}N_2O_{10}$ aufgestellt¹⁾, während Araki²⁾ für Chitosan $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$ berechnet hat. Diese Formeln unterscheiden sich nur durch 2 Atome Wasserstoff von einander.

Zur Vergleichung will ich die Procent-Zahlen an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff von Mycosine, Chitosan und meinen Präparaten aus *Peltigera* und *Claviceps* anführen.

	Mycosine.	Chitosan.	Präparat aus		
			Peltigera.	Claviceps.	
				I.	II.
C	43,74 %	43,97 %	41,69 %	41,33 %	41,33 %
H	7,30 »	6,80 »	4,99 »	6,79 »	6,10 »
N	7,31 »	7,32 »	1,35 »	—	—

Trotz der Unsicherheit der Resultate habe ich mich entschlossen, die vorliegenden Untersuchungen zu veröffentlichen, erstens weil ich selbst keine Zeit haben werde, die Sache weiter zu verfolgen, zweitens in der Hoffnung, dass ein Anderer die von mir begonnene Arbeit vervollständigen wird.

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Loc. cit.