

Studien über die Polysaccharide spaltenden Fermente in Pilzpreßsäften.

Von

Hans Pringsheim und Géza Zemplén.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. August 1909.)

Die Übertragung des Buchnerschen¹⁾ Verfahrens zur Darstellung von Hefepreßsaft auf verschiedene andere Pilze ist für die Gewinnung fermentreicher Lösungen in verschiedener Weise empfehlenswert. Die Methode gestattet es, Fermentextrakte darzustellen, welche in einer durch die Entfernung der Membranen von unnützem Ballast befreiten Form vorliegen; durch die filtrierende Wirkung der Kieselgur erhält man so geklärte Säfte, die man z. B. auch zu optischen Bestimmungen verwenden kann.²⁾ Vor allem aber schien die Methode im Gegensatz zur bloßen Extraktion der Pilze mit Wasser, wie sie für Hefe in früherer Zeit verwandt wurde,³⁾ die Abtrennung auch solcher Fermente zu gestatten, die wie das Gärungsferment, die Zymase, von den nicht aufgesprengten Zellen festgehalten werden. Handelte es sich daher um die Bestimmung der Gesamtheit der in Pilzen vorhandenen saccharifizierenden Fermente, so war zuerst an diese Methode zu

¹⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. R. Oldenburg, München und Berlin 1903.

²⁾ Vgl. hierzu E. Abderhalden und H. Pringsheim, Studien über die Spezifität peptolytischer Fermente bei verschiedenen Pilzen. Diese Zeitschrift, Bd. LIX (1909), S. 249.

³⁾ Vgl. E. Fischer, Der Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme, I. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jd. XXVII (1894), S. 2985; II. Jg. XXVII (1894), S. 3479; III. Jg. XXVIII (1895), S. 1429.

denken, zumal nach den Erfahrungen E. Fischers Polysaccharide spaltende Fermente, wie z. B. die den Rohrzucker hydrolysierende Hefeinvertase häufig endoenzymatischer Natur sind.¹⁾ Des weiteren wurde die genannte Methode zur Isolierung der Fermente verschiedener Pilze²⁾ und Bakterien³⁾ mehrfach empfohlen, ja es schien überhaupt eine nicht unberechtigte Erwartung der Enzymologie, daß die Fermente, welche wir in niederen Organismen oder in den Geweben, Organen, Muskeln usw. höherer Organismen nachweisen können, in den aus ihnen nach dem Buchnerschen Verfahren dargestellten Preßsaft übergehen würden.⁴⁾ Diese Anschauung wurde durch unsere experimentellen Prüfungen nicht unbedingt bestätigt.

Wir haben eine Untersuchung der zuckerspaltenden Fermente bei verschiedenen Schimmelpilzen unternommen, weil unsere Kenntnisse dieser Fermente im Gegensatz zu den bei Hefen⁵⁾ und tierischen Organen und Sekreten⁶⁾ aufgefundenen noch lückenhaft sind, zumal die Angaben der Literatur häufig auf ungenügender Bestimmung der Spaltungsprodukte beruhen; meistens wird auf die Anwesenheit der zuckerspaltenden Fermente lediglich aus der bezüglichen gärungserregenden Wirkung des Pilzes auf die Disaccharide gefolgert,⁷⁾ die in gewissen

¹⁾ Vgl. die Zusammenstellung von H. Pringsheim in Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien 1909, Bd. II, S. 192.

²⁾ Vgl. verschiedene Angaben in Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, G. Fischer, Jena 1905/09.

³⁾ Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme, G. Fischer, Jena 1907, S. 95, empfiehlt die Methode zur Entscheidung der Frage, ob die Invertase verschiedener Bakterien durch die lebende Zelle sekretiert wird oder nicht.

⁴⁾ Vgl. z. B. O. Cohnheim, Die Physiologie der Verdauung und Ernährung. Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien 1908, S. 117.

⁵⁾ A. Kalanthar, Über die Spaltung von Polysacchariden durch verschiedene Hefen. Diese Zeitschrift, Bd. XXVI (1898), S. 88.

⁶⁾ E. Fischer und W. Niebel, Über das Verhalten der Polysaccharide gegen tierische Sekrete und Organe. Sitzungsberichte der königl. preußischen Akad. der Wissenschaften, 1906, V 73.

⁷⁾ Vgl. C. Wehmer in Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. IV, S. 526.

Fällen wiederum auch nur durch die Kohlensäurebestimmung in Kulturen im hohlen Objektträger bestimmt wurde!

Zu unseren Spaltungsversuchen verwandten wir fünf Disaccharide und ein Trisaccharid; vier dieser Zucker wurden von Kahlbaum bezogen. Die Cellobiose war aus Filtrierpapier über ihr Oktoacetat dargestellt worden,¹⁾ und es war dasselbe Präparat, welches E. Fischer und G. Zemplén²⁾ für die enzymatische Spaltung derselben benutzt hatten. Die Melibiose wurde durch partielle Hydrolyse der Raffinose mit Obergärhefe und gleichzeitige Vergärung der hierbei gebildeten d-Fruktose gewonnen.³⁾ Wir erhielten aus 50 g Raffinose + 5 H₂O 16 g reine Melibiose + 2 H₂O d. h. 42% der theoretischen Ausbeute.

Zu unseren Studien wählten wir Pilze aus, die bei geeigneter Temperatur zu reichlichem Deckenwachstum auf flüssigen Nährmedien gelangten und die alle auf einer einheitlichen Nährlösung, welche aus Rohrzucker unter gelegentlichem Zusatz von Glukose, oder Glukose allein als Kohlenstoffquelle, schwefelsaurem Ammoniak als Stickstoffquelle und Nährsalzen bestand. Wir machten uns auf diese Weise von allen Einflüssen frei, welche die Zusammensetzung der Nährlösung auf die Produktion der Fermente im Pilzkörper möglicherweise hätte haben können. Der Ersatz des genannten Zuckers durch Milchsucker und der des schwefelsauren Ammons durch Pepton hat, wie im einzelnen ausgeführt wird, keinen Einfluß auf die Art der produzierten Fermente gehabt.

Wir haben mit den Preßsäften von dreizehn verschiedenen Pilzen gearbeitet. Die zuerst mit den Säften von acht dieser Pilze ausgeführten Spaltungen förderten keine auffallenden Resultate zutage; sie bestätigten fast immer die Angaben früherer Autoren, soweit solche bekannt sind. Auffallend war schon, daß der Preßsaft aus *Mucor javanicus* keins der

¹⁾ Skraup und König, Über Cellobiose. Monatshefte für Chemie, Jg. XXII (1901), S. 1011.

²⁾ E. Fischer und G. Zemplén, Verhalten der Cellobiose und ihres Osons gegen einige Enzyme. Liebigs Annalen, Bd. CCCLXV (1909), S. 1.

³⁾ Loiseau, Beitrag zum Studium der Melibiose. Zeitschrift des Vereins der deutschen Zuckerindustrie, Bd. LIII (1903), S. 1050.

Disaccharide spaltete. Noch weniger vertrauenerweckend war der Befund, den wir bei drei *Penicillium*-arten erhielten; auch hier war in keinem Falle eine Spaltung der Disaccharide zu beobachten. Weiterhin zeigte sich, daß auch der Preßsaft aus *Aspergillus Oryzae* keine Spaltung der geprüften Disaccharide auslöste. Da dieser Befund auf einen Mangel der von uns verwandten Methoden zurückgeführt werden mußte, war es das erste, die Versuche zu wiederholen, wozu die Pilze auf neuer Nährlösung herangezogen und neuer Preßsaft gewonnen wurde. Wir wählten dazu das *Penicillium purpurogenum* und den *Aspergillus Oryzae*. Die Versuchsergebnisse waren dieselbe wie vorher bis darauf, daß jetzt bei *Aspergillus Oryzae* eine schwache Rohrzuckerspaltung erhalten wurde. Der Preßsaft aus *Penicillium purpurogenum* spaltete von den verwandten Disacchariden nur Cellobiose in ganz geringem Maße, trotzdem ein äußerst reichliches Pilzwachstum, das durch die Verwendung von Pepton als Stickstoffquelle gegenüber dem ersten Versuch noch gesteigert war, zu ausreichenden Mengen sehr konzentrierten Preßsaftes führte.

Um die Gründe für diesen Ausfall unserer Versuche genau zu erforschen, wählten wir das *Penicillium purpurogenum*, mit dem wir folgende Versuche ausführten. Auf einer Nährlösung wurde zuerst das Mycel des Pilzes herangezogen, dieses wurde nach dem Waschen mit destilliertem Wasser im Exsikkator über Chlorcalcium getrocknet. Das gepulverte Mycel wurde dann in sechs gleiche Teile geteilt und damit die Spaltungsversuche ausgeführt. Von diesem Trockenpräparat wurden Maltose und Cellobiose kräftig gespalten (Reihe 22 der Schluß-tabelle). Ebenso bekamen wir kräftige Spaltung der Maltose, als wir auf einer anderen Nährlösung gezüchtetes Mycel in feuchtem Zustand auf Rohrzucker, Maltose und Milchzucker einwirken ließen (Reihe 23). Dadurch war also klar bewiesen, daß der Pilz Maltase und Cellobiase produziert; die Fermente waren im Mycel enthalten.

Es fragte sich nun, in welcher Weise die Wirkung der Fermente in den Versuchen mit Preßsaft gehindert worden war. Es standen drei Möglichkeiten zur Diskussion. Einmal konnte

bei der Darstellung des Preßsaftes durch die Vermischung des freigelegten Zellinhalts eine Vernichtung der zuckerspaltenden Fermente z. B. durch das proteolytische Zellferment eingetreten sein. Weiterhin konnte der Preßrückstand die zuckerspaltenden Fermente zurückgehalten haben, und schließlich war an die Möglichkeit zu denken, daß die Wirkung der Fermente von der Anwesenheit eines Cofermentes¹⁾ abhängt, das durch die Darstellung des Preßsaftes vom Ferment getrennt worden war. Von diesen drei Möglichkeiten war die zweite, das Zurückbleiben der saccharifizierenden Fermente im Rückstand, von vornherein die wahrscheinlichste. Schon früher war gezeigt worden, daß sich die zuckerspaltenden Fermente verschiedener Hefearten bezüglich ihrer Wasserlöslichkeit verschieden verhalten. Die Hefemaltase z. B. geht in den wässerigen Auszug der Froberg-Hefe nicht über, während der wässrige Auszug aus *Saccharomyces octosporus* Maltase enthält. Erst aus durch Chloroform getöteter Froberg-Hefe läßt sich die Maltase mit Wasser ausziehen. Die meiste Ähnlichkeit haben unsere Beobachtungen mit den an der *Monilia candida* gemachten.²⁾ Die *Monilia*-Invertase wird von den Zellen festgehalten; selbst der wässrige Auszug aus mit Glaspulver zerriebener *Monilia* gab keine Rohrzuckerspaltung. Der Beweis, daß die *Monilia* Invertase enthält und daß sie den Rohrzucker erst nach vorheriger Spaltung in die Monosaccharide vergärt, konnte erst erbracht werden, nachdem der Pilz selbst bei Gegenwart von Chloroform mit Rohrzucker zusammengebracht wurde. Die Technik der Preßsaftdarstellung war noch unbekannt, als diese Versuche angestellt wurden. Neuere Versuche zeigten dann allerdings, daß die Invertase der *Monilia* in wirksamer Form

¹⁾ Harden und Young, Das alkoholische Ferment des Hefepreßsaftes. Zweiter Teil. Das Coferment des Hefepreßsaftes. Proc. of the Royal Soc. London, Bd. LXXVIII, Serie B (1906), S. 369.

E. Buchner und Antoni, Existiert ein Coferment für die Zymase? Diese Zeitschrift, Bd. XLVI (1905), S. 136. E. Buchner und Klätte, Über das Coferment des Hefepreßsaftes. Biochem. Zeitschrift, Bd. VIII (1908), S. 520.

²⁾ E. Fischer und P. Lindner, Über die Enzyme einiger Hefen. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXVIII (1895), S. 3037.

in den Preßsaft dieses Pilzes übergeht, wobei jedoch trotz sehr großer Preßsaftmengen (10 ccm auf 4 g Rohrzucker) keine völlige Spaltung des Disaccharids erzielt worden war.¹⁾

Mit *Penicillium purpurogenum* sind wir wie folgt verfahren. Wir stellten von neuem Preßsaft aus dem Mycel dieses Pilzes dar. Einen Teil dieses Saftes brachten wir mit Rohrzucker, Maltose und Milchzucker zusammen. Einen andern Teil vereinten wir mit einem Teil des Rückstandes und einen dritten mit einer Aufkochung des Rückstandes in Wasser. Schließlich ließen wir einen Teil des Rückstandes allein auf die drei Zucker einwirken. Preßsaft allein (Reihe 24) und Preßsaft + Kochsaft (Reihe 25) gaben uns nur geringe Spaltung der Maltose, der mit dem Rückstand vereinte Preßsaft (Reihe 26) und der Rückstand allein spalteten die Maltose kräftig. Die Hauptmenge des Ferments war also im Rückstand festgehalten worden. Auch durch langes einstündiges Reiben des Mycels mit Sand wurde kein wesentlich stärkerer Übergang des Ferments in den Preßsaft erzielt (Reihe 28).

Der fermentreichste der von uns geprüften Pilze war der *Aspergillus Wentii*. Der Preßsaft dieses Pilzes spaltete Rohrzucker, Maltose, Milchzucker, Cellobiose und Raffinose kräftig. Aber auch der Rückstand einer Preßsaftdarstellung (Reihe 4a) enthielt, wie weitere Versuche zeigten, noch bedeutende Mengen der zuckerspaltenden Fermente. Der Preßsaft aus *Mucor javanicus* hat, wie erwähnt, keine Disaccharide spaltenden Fermente enthalten. Spaltungsversuche mit dem feuchten Mycel dieses Pilzes zeigten aber, daß der Pilz (Reihe 17) doch Maltase enthielt.

Wir müssen aus den angegebenen Resultaten schlußfolgern, daß nicht die Art der Fermente, sondern die Art der Pilze für den eintretenden oder ausbleibenden Übergang der zuckerspaltenden Fermente in die Pilzpreßsäfte entscheidend sind. Der Grund für diesen Befund kann nicht darin gefunden werden, daß uns eine Aufspaltung der Zellen unserer Pilze nicht gelungen ist. Das

¹⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, Über die Enzyme von *Monilia candida* und eine Milchzuckerhefe. Diese Zeitschrift, Bd. XL (1903), S. 167.

Verreiben war in allen Fällen bis zu dem Grade durchgeführt worden, daß eine schleimige, ganz homogene Masse resultierte. Wir können momentan keinen Grund für den Ausfall unserer Experimente in dieser Richtung angeben. Sie müssen aber bei enzymologischen Arbeiten in Zukunft Berücksichtigung finden, und jedenfalls beim Arbeiten mit Preßsäften eine Warnung sein, negative Resultate nicht ohne Reserve auf das Nichtvorhandensein der gesuchten Fermente zu deuten.

In ähnlicher Weise dürften die Resultate zu deuten sein, die der erste von uns mit dem Gärenzym verschiedener gärkräftiger Pilze gewonnen hat. Schon Buchner und Meisenheim geben an, daß der Preßsaft aus *Monilia candida* nicht immer und dann nur sehr schwache Gärwirkung zeigt, während der Pilz selbst 6 % Alkohol und mehr zu bilden imstande ist.¹⁾ Von *Rhizopus tonkinensis*, der 1,76 % Alkohol bildet,²⁾ wurden drei Preßsäfte mit Glukose versetzt. 1. 12 ccm Saft mit 5 g Glukose; 2. 12 ccm Saft mit 5 g Glukose; 3. 24 ccm Saft mit 8 g Glukose. Ebenso waren in zwei Preßsäften der *Allescheria Gayonii* einmal in 33 ccm 10 g Glukose, ein zweites Mal in 10 ccm 4 g Glukose gelöst worden, wobei nur bei *Allescheria* ganz schwache Gärung zu beobachten und durch Gewichtsverlust der Gärkölbchen zu konstatieren war, während der Pilz bis 8 % Alkohol,³⁾ sicher aber 3,5 %⁴⁾ zu bilden imstande ist. Auch Mazé⁵⁾ hat mit dem Preßsaft dieses Pilzes nur schwache Gärung beobachtet, mit 60 ccm Saft und 18 g Glukose z. B. nur eine Bildung von 405 mg Alkohol!

¹⁾ Nach H. Wichmann in Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. IV, S. 336.

²⁾ H. Pringsheim, Über die Fuselölbildung durch verschiedene Pilze. Biochemische Zeitschrift, Bd. VIII (1908), S. 129.

³⁾ Laborde, Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle l'*Eurotiosis Gayonii*. Annal. de l'institut Pasteur, Bd. XI (1897), S. 1.

⁴⁾ H. Pringsheim, Der Einfluß der chemischen Konstitution der Stickstoffnahrung auf die Gärfähigkeit und Wachstumsenergie verschiedener Pilze, II. Biochem. Zeitschrift, Bd. VIII (1908), S. 119.

⁵⁾ P. Mazé, Recherches sur le mode d'utilisation du carbon ternaire par les végétaux et les microbes, Ann. de l'institut Pasteur, t. XVIII (1904), p. 271.

Die Tatsache, daß in mehreren der untersuchten Preßsäfte die nachher im Mycel der Pilze aufgefundenen Fermente nicht nachzuweisen waren, zwingt uns, das Hauptgewicht unserer Arbeit auf die positiven Spaltungsergebnisse zu legen. Es ist möglich, daß auch die zuerst untersuchten Pilze noch zuckerspaltende Fermente gebildet haben, die unserer Auffindung entgangen sind. In einzelnen Fällen haben wir die Versuche mit Mycel wiederholt. Die Einzelheiten unserer Resultate sind im experimentellen Teil zusammengestellt und am Schluß in einer Tabelle vereint. Wir werden in der Diskussion der Ergebnisse von der Berücksichtigung der Spaltungsversuche mit Preßsaft aus *Penicillium brevicaula* und *Penicillium africanum* absehen, da hier offenbar kein Übergang der Fermente in die Preßsäfte stattgefunden hatte und diese Versuche nicht mit Mycel wiederholt wurden.

Der Rohrzucker wurde in der Mehrzahl der Fälle (7mal) gespalten, ebenso häufig die Maltose (7mal). Laktase konnten wir nur bei zwei Pilzen und Melibiase in keinem Falle nachweisen. Die Cellobiase dagegen wurde fünfmal aufgefunden. Die Raffinose wurde in einem Falle (*Aspergillus Wentii*) in die drei Monosaccharide, d-Glukose, d-Fruktose und d-Galaktose, zerlegt; in fünf Fällen wurde sie in d-Fruktose und Melibiose und in dreien in d-Galaktose und Rohrzucker gespalten. Es handelte sich hier natürlich um Pilze, die kein Rohrzucker spaltendes Ferment enthalten und die daher ebenso wie Emulsin wirken.¹⁾

Ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt der verschiedenen Pilze an zuckerspaltenden Fermenten und der Pilzgattung war nicht in auffällender Weise zu beobachten.

Von besonderem Interesse ist, daß Schimmelpilze Disaccharide als Kohlenstoffquelle auszunützen imstande sind, trotzdem sie keine diese Zucker spaltenden Fermente absondern. Sie stehen in der Ausnützung nichthydrolysierter Kohlenhydrate somit in einem Gegensatz zu höheren tierischen Organismen, die Rohrzucker und Milchzucker einfach als Fremdkörper mit dem Harn ausscheiden, wenn man sie dem Körper mit Um-

¹⁾ C. Neuberg, Zur Kenntnis der Raffinose. Abbau der Raffinose zu Rohrzucker und d-Galaktose. Biochem. Zeitschrift, Bd. III (1907), S. 519.

gehung des Darmkanals einführt.¹⁾ Auf welche Weise der Angriff der Pilze auf das ungespaltene Zuckermaterial erfolgt, ist bisher nicht geprüft worden. Verschiedene der von uns untersuchten Pilze wurden auf Rohrzuckerlösungen herangezogen und enthielten doch keine Invertase, so *Rhizopus*, *Mucor javanicus* und die drei *Penicillium*-Arten, von denen *Penicillium purpurogenum*, wie erwähnt, verschiedene Male mit Preßsaft und Mycel auf Invertase geprüft wurde. Den *Mucor corymbifer* züchteten wir auf Milchzucker; in seinem Preßsaft fanden aber wir keine Laktase. Den *Mucor rhizopodiformis* ließen wir zweimal auf Rohrzucker und einmal auf Milchzucker wachsen. Das Wachstum war in beiden Fällen gleich stark. In keinem der drei Fälle konnte im Preßsaft Laktase nachgewiesen werden. Wir erhielten auch mit dem Mycel dieses auf Milchzucker herangezogenen Pilzes bei einem weiteren Kontrollversuch keine Milchzuckerspaltung. Schon Fitz²⁾ machte darauf aufmerksam, daß *Mucor mucedo* und *racemosus* auf Milchzucker wachsen, sie vergären ihn aber erst nach vorheriger Inversion. Nach Duclaux³⁾ handelt es sich in solchen Fällen nicht um eine Vergärung, sondern um eine bloße Assimilation, als deren Produkt Oxalsäure und nicht Alkohol auftritt.

Eine Gewöhnung an die Produktion nicht arteigener Fermente steht unter den Umständen nicht in Erwartung, da die Pilze in solchen Fällen durch die Absonderung eines zuckerspaltenden Fermentes keine Förderung ihrer Lebensbedingungen erreichen würden. In der Tat enthielt die auf Rohrzucker und Milchzucker herangezogene *Mucor*-Art genau dieselben saccharifizierenden Fermente.

Experimenteller Teil.

Die Pilze wurden in allen Fällen auf Nährlösungen, die 2% Zucker (Rohrzucker, Rohrzucker + Glukose, Milchzucker)

¹⁾ Vgl. O. Cohnheim, l. c. 10. Vorlesung, S. 144.

²⁾ Fitz, Über alkoholische Gärung, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. IX (1876), S. 1352.

³⁾ E. Duclaux, Über die intracelluläre Ernährung. Annales de l'institut Pasteur, 1889, S. 67.

als Kohlenstoffquelle, 0,3% schwefelsaures Ammon oder Pepton als Stickstoffquelle und von Nährsalzen KH_2PO_4 0,05%, MgSO_4 0,01%, Spuren von $\text{NaCl} + \text{FeSO}_4$ enthielten. Diese Nährlösungen wurden in eine größere Anzahl — je nach dem Pilzwachstum weniger oder mehr, in manchen Fällen bis zwanzig — Ein- oder Zweiliter-Erlmeyer-Kolben in einer Tiefe von etwa 2 ccm eingefüllt und nach dem Sterilisieren mit Reinkultur der Pilze beimpft. Die Dauer der Inkubation wird im einzelnen angegeben. Der Pilzrasen wurde dann von der Nährlösung durch Filtration getrennt und durch Waschen mit Wasser von den anhaftenden Resten der Nährlösung befreit. Er wurde darauf zuerst mit Seesand fein zerrieben, bis keine Spur der ursprünglichen Struktur zu bemerken war und das Gemisch aus Pilzmycel und Sand eine homogene schleimige Masse bildete. Diese Operation dauerte zwanzig bis dreißig Minuten. Dann wurde von neuem unter Zusatz von Kieselgur gerieben, bis sich die Pilzmasse völlig mit der Kieselgur vereint hatte. Das Pressen geschah bei 300 Atmosphären Druck.¹⁾

Bei den Spaltungsversuchen waren die Zuckerlösungen 10%ig. Sie wurden mit dem Preßsaft der Pilze (wenn keine weitere Angabe später stattfindet) in einem Verhältnis versetzt, daß auf 1 g des Zuckers 1 ccm Preßsaft angewandt wurde. Bei den Versuchen mit frischem oder getrocknetem Mycel oder dem Preßrückstande sind die Mengenverhältnisse näher beschrieben. Die Lösungen standen nach Zusatz von etwa 0,3 ccm Toluol 40—72 Stunden im Brutraum bei 37°.

Zum Nachweis der Spaltungsprodukte diente E. Fischers Osazonprobe.²⁾ Zu dem Zweck wurde die Lösung nach dem Versetzen mit je 1 g krystallisiertem Natriumacetat auf ein Gramm Zucker auf dem Wasserbade erwärmt und nach Zusatz von wenig Tierkohle filtriert. Durch diese Operation werden die Proteine aus der Lösung größtenteils entfernt. Dem klaren

¹⁾ Vgl. H. Pringsheim, Pilzpreßsäfte in geringer Menge in Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Wien-Berlin 1909, Bd. II, S. 197.

²⁾ Vgl. E. Fischer, Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente. Springer 1909.

Filtrate wurden auf ein Teil Zucker 2 Teile Phenylhydrazinchlorhydrat und 3 Teile krystallisiertes Natriumacetat zugegeben und im Wasserbade $1\frac{1}{2}$ Stunden erhitzt. Nach einstündigem Stehen wurden die Osazone abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und mit etwa 40 Teilen Wasser (auf den Zucker berechnet) ausgekocht, heiß filtriert und mit heißem Wasser gewaschen. Hierbei verbleibt auf dem Filter, wenn Spaltung eingetreten ist, bei Maltose und Cellobiose Glukosazon; bei Milchzucker und Melibiose ein Gemisch von Glukosazon und Galaktosazon; endlich bei Raffinose, je nach der Art der Spaltung, Glukosazon, Galaktosazon oder ein Gemisch dieser beiden. Bei dem Rohrzucker unterblieb das Auskochen des gebildeten Osazons, da hier nur Glukosazon gebildet werden konnte und keine Trennung von einem Disaccharidosazon durchgeführt werden mußte.

Die in heißem Wasser unlöslichen Osazone kamen nach dem Trocknen bei 100° zur Wägung; ihre Menge ermöglicht eine annähernde Beurteilung des Grades der Spaltung.

Bei der Raffinose, bei der die Spaltung in verschiedenen Richtungen stattfinden kann, mußten die Osazone näher untersucht werden. Zuerst wurde ermittelt, ob aus dem Filtrat nach dem Auskochen der Osazone Melibiosazon ausfällt oder nicht. Außerdem wurden die unlöslichen Osazone aus 50%igem Alkohol umkrystallisiert und ihr Schmelzpunkt bzw. Zersetzungspunkt bestimmt.

Rohrzucker bildet bekanntlich beim Erhitzen mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat 10% Glukosazon. Um zu ermitteln, ob vielleicht bei der Raffinose eine ähnliche Inversion, ohne die Einwirkung von Enzymen, stattfinden kann, haben wir folgenden Versuch angestellt.

1 g Raffinose mit 2 g Phenylhydrazinchlorhydrat und 3 g Natriumacetat $1\frac{1}{2}$ Stunden im Wasserbade erhitzt, schied in der Wärme kein Osazon aus. In der Kälte erstarrte die Masse zu einem citronengelben Krystallbrei, welcher neben viel unverändertem Phenylhydrazinchlorhydrat auch etwas Osazon enthielt. Die Menge dieses Osazons war aber so gering, daß ihre Berücksichtigung bei unseren Versuchen unnötig erschien.

Im folgenden geben wir die Versuchsergebnisse. Die bei den Zuckern angeführten Osazonmengen beziehen sich, falls nichts angegeben wird, bei Rohrzucker und Milchzucker auf 1 g, bei Maltose, Raffinose und Melibiose auf 0,5 g, bei Cellobiose endlich auf 0,3 g Zucker. Die Nährlösung enthielt, wo spezielle Angaben fehlen, schwefelsaures Ammoniak als Stickstoffquelle.

I. *Allescheria Gayonii*.

Preßsaft Nr. 1. Nährlösung Glukose.

Wachstum 30. November bis 15. Dezember.

Es wurden gefunden an unlöslichem Osazon auf Rohrzucker 0,08 g, auf Maltose 0,047 g, auf Milchzucker 0,08 g, auf Cellobiose 0,092 g, auf Raffinose 0,046 g Galaktosazon. Schmp. 188—190°.

Preßsaft Nr. 2. Nährlösung Glukose.

Wachstum 6. Januar bis 19. Januar.

Es wurden gefunden an unlöslichem Osazon auf Maltose 0, auf Milchzucker wenig, auf Cellobiose viel.

II. *Aspergillus Wentii*.

Preßsaft Nr. 3. Nährlösung 0,5 % Glukose + 2 % Rohrzucker, 0,1 % Asparagin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Wachstum 20. Dezember bis 20. Januar 09.

Es wurden gefunden an unlöslichem Osazon auf Rohrzucker 0,30 g, auf Maltose 0,284 g, auf Milchzucker 0,715 g, auf Cellobiose 0,140 g, auf Raffinose 0,174 g Gemisch von Glukosazon und Galaktosazon (totale Spaltung). Schmp. 203—205°.

Preßsaft Nr. 4. Nährlösung Rohrzucker, 0,1 % Pepton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Wachstum 3. Juli bis 20. Juli 09.

0,3 g Melibiose gab 0 unlöslichen Osazon.

Nr. 4a. Rückstand. Auf 1 g Zucker wurden 5 g Rückstand angewandt.

Ausbeute an unlöslichem Osazon: Rohrzucker 0,412 g, 1 g Maltose 0,844 g, Milchzucker 0.

III. *Rhizopus tonkinensis*.

Preßsaft Nr. 5. Nährlösung Glukose + 0,25 % Asparagin.

Wachstum 2. Dezember bis 9. Dezember 08.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,09 g, 0,3 g Maltose 0,08 g, Milchzucker 0, Cellobiose 0, Raffinose 0.

IV. *Mucor Mucedo*.

Preßsaft Nr. 6. Nährlösung 0,5 % Glukose + 2 % Rohrzucker, 0,1 % Asparagin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Wachstum 28. Januar bis 10. Februar.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,884 g, Maltose 0,232 g, Milchzucker 0, Cellobiose 0,159 g, Raffinose 0,132 g, Glukosazon. Schmp. 205—206°, im Filtrate Melibiosazon.

Preßsaft Nr. 7. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 11. Mai bis 21. Mai.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,645 g, Maltose 0,095 g, Milchzucker 0, Cellobiose 0,057 g, Melibiose 0, Raffinose 0,092 g, Glukosazon. Schmp. 204—206°, im Filtrate Melibiosazon.

Preßsaft Nr. 8. Nährlösung Milchzucker.

Wachstum 25. Mai bis 5. Juni.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,582 g, Maltose 0,024 g, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0,013 g, Raffinose 0,099 g, Glukosazon. Schmp. 205—206°, im Filtrat Melibiosazon.

V. *Mucor corymbifer*.

Preßsaft Nr. 9. Nährlösung Milchzucker.

Wachstum 11. März bis 4. Mai.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,289 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,079 g, Glukosazon. Schmp. 204—206°, im Filtrat Melibiosazon.

VI. *Mucor rhizopodiformis*.

Preßsaft Nr. 10. Nährlösung 0,5 % Glukose + Rohrzucker.

Wachstum 11. Februar bis 10. März.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,784 g, Maltose 0,054 g, Milchzucker 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,066 g, Glukosazon. Schmp. 204—206°, im Filtrat Melibiosazon.

Preßsaft Nr. 11. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 11. Mai bis 19. Mai.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,93 g, Maltose 0,094 g, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,139 g d-Glukosazon. Schmp. 204—206°, im Filtrat Melibiosazon.

VII. *Mucor racemosus*.

Preßsaft Nr. 12. Nährlösung Glukose.

Wachstum 11. März bis 30. April.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,604 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,040 g, Glukosazon. Schmp. 205—206°, im Filtrat Melibiosazon.

VIII. *Hyphomyces rosellus*.

Preßsaft Nr. 13. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 5. Mai bis 23. Mai.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,586 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,084 g, Glukosazon. Schmp. 204—106°, im Filtrat Melibiosazon.

IX. *Penicillium Africanum*.

Preßsaft Nr. 14. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 16. Mai bis 3. Juni.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,11 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,05 g, Galaktosazon. Schmp. 188—192°.

X. *Penicillium brevicaule*.

Preßsaft Nr. 15. Nährlösung Glukose + 0,5% Leucin.

Wachstum 16. Januar bis 5. Mai.

Es wurden gefunden an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,09 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0.

XI. *Mucor javanicus*.

Preßsaft Nr. 16. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 29. April bis 24. Mai.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,094 g,

Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0, Raffinose 0,025 g. Art der Spaltung unentschieden.

Mycel Nr. 17.

Es wurden erhalten an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,08 g, bei 1 g Maltose 0,084 g.

XII. *Aspergillus Oryzae*.

Preßsaft Nr. 18. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 11. Juni bis 18. Juni.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,11 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0.

Preßsaft Nr. 19. Nährlösung 0,5 % Glukose, Rohrzucker.

Wachstum 23. Juni bis 7. Juli.

Es wurden erhalten an unlöslichen Osazonen: Rohrzucker 0,165 g, Maltose 0, Milchzucker 0, Melibiose 0, Cellobiose 0.

Mycel 19 a.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,09 g, bei Maltose 0.

XIII. *Penicillium purpurogenum*.

Preßsaft Nr. 20. Nährlösung Rohrzucker.

Wachstum 3. Mai bis 16. Mai.

Es wurden erhalten an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,09 g, bei Maltose 0, bei Milchzucker 0, bei Melibiose 0, bei Cellobiose 0, bei Raffinose 0,03 g Galaktosazon.

Preßsaft Nr. 21. Nährlösung Rohrzucker + 0,1 % Pepton + $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$.

Wachstum 26. Mai bis 7. Juni.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,085 g, bei Maltose 0, bei Milchzucker 0, bei Melibiose 0, bei Cellobiose 0,019 g, bei Raffinose 0,041 g Galaktosazon.

Nr. 22. Trockenes Mycel. Auf je 1 g Zucker 0,5 g trockenes Mycel.

Es wurden erhalten an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,091 g, bei 0,6 g Maltose 0,228 g, bei Milchzucker 0, bei Melibiose 0, bei Cellobiose 0,155 g, bei 0,6 g Raffinose 0,04 Galaktosazon.

| Pilzspezies | Nummer des Spaltungsversuches | Dauer des Spaltungsversuches in Stunden | Rohrzucker g * |
|----------------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|
| I. Allescheria Gayonii | Preßsaft Nr. 1 | 48 | 0,08 — (—) ¹⁾ |
| | » » 2 | 40 | |
| II. Aspergillus Wentii | Preßsaft Nr. 3 | 72 | 0,30 +++ (+) ²⁾ |
| | » » 4 | 60 | |
| | Rückstand » 4 a | 60 | 0,41 ++ |
| III. Rhizopus tonkinensis | Preßsaft Nr. 5 | 72 | 0,09 — (—) ³⁾ 4) 5) |
| IV. Mucor Mucedo | Preßsaft Nr. 6 | 60 | 0,88 +++ (—) ⁷⁾ (+) |
| | » » 7 | 65 | 0,65 +++ |
| | Preßsaft Nr. 8 (Milchzucker) | 65 | 0,58 +++ |
| V. Mucor corymbifer | Preßsaft Nr. 9 (Milchzucker) | 65 | 0,29 ++ (+) ⁵⁾ |
| VI. Mucor rhizopodiformis | Preßsaft Nr. 10 | 60 | 0,78 +++ |
| | » » 11 | 60 | 0,93 +++ |
| VII. Mucor racemosus | Preßsaft Nr. 12 | 72 | 0,60 +++ (+) ⁹⁾ |
| VIII. Hyphomyces rosellus | Preßsaft Nr. 13 | 65 | 0,59 +++ |
| IX. Penicillium africanum | Preßsaft Nr. 14 | 48 | 0,11 — |
| X. Penicillium brevicaulle | Preßsaft Nr. 15 | 60 | 0,09 — |
| XI. Mucor javanicus | Preßsaft Nr. 16 | 65 | 0,09 — (—) ⁵⁾ |
| | Mycel Nr. 17 | 60 | 0,08 — |
| XII. Aspergillus Oryzae | Preßsaft Nr. 18 | 60 | 0,11 — |
| | » » 19 | 60 | 0,16 + (+) ⁵⁾ 11) |
| | Mycel Nr. 19 a | 60 | 0,09 — |
| XIII. Penicillium purpurogenum | Preßsaft Nr. 20 | 65 | 0,09 — |
| | » » 21 | 65 | 0,09 — |
| | Trockenes Mycel Nr. 22 | 65 | 0,09 — |
| | Feuchtes » » 23 | 65 | 0,09 — |
| | Preßsaft Nr. 24 | 65 | 0,10 — |
| | Preßsaft + Kochsaft Nr. 25 | 65 | 0,10 — |
| | Preßsaft + Rückstand Nr. 26 | 65 | 0,11 — |
| | Rückstand Nr. 27 | 65 | 0,10 — |
| Preßsaft (lange gerieben) Nr. 28 | 65 | 0,10 — | |

* Bedeutet die auf 1 g Zucker gefundene Menge Osazon.

| Maltose g * | Milchzucker g * | Melibiose g * | Cellobiose g * | Raffinose | | |
|--|--|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| | | | | ganz gespalten g * | Galaktose + Rohrzucker g * | Fruktose + Melibiose g * |
| 0,09 + (+) ¹⁾ keine Spaltung — | 0,08 + (+) ¹⁾ geringe Spaltung | | 0,30 +++ starke Spaltung | | 0,09 + | |
| 0,57 +++ (+) ²⁾ | 0,72 +++ | 0 — | 0,46 +++ | 0,35 ++ | | |
| 0,84 +++ | 0 — | | | | | |
| 0,26 ++ (+) ³⁾ 6) | 0 — (—) ³⁾ | (—) ³⁾ 4) | 0 — | keine Spaltung (—) ¹³⁾ | | |
| 0,46 +++ | 0 — (—) ⁸⁾ | | 0,52 +++ | | | 0,26 +++ |
| 0,19 ++ | 0 — | 0 — | 0,19 ++ | | | 0,18 ++ |
| 0,05 + | 0 — | 0 — | 0,04 + | | | 0,20 +++ |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | | | 0,16 ++ |
| 0,11 ++ | 0 — | | 0 — | | | 0,13 ++ |
| 0,19 ++ | 0 — | 0 — | 0 — | | | 0,28 +++ |
| 0 — (+) ¹⁰⁾ | 0 — (—) ⁸⁾ | 0 — | 0 — | | | 0,08 + |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | | | 0,17 ++ |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | | 0,10 + | |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | keine Spaltung | | |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | 0,05 + | (Richtung der Spaltung unentschieden) | |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | | | |
| 0 — (+) ³⁾ 12) | 0 — (—) ¹³⁾ | 0 — | 0 — | | (+) ¹³⁾ | |
| 0 — | | | | | | |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0 — | | 0,06 + | |
| 0 — | 0 — | 0 — | 0,06 + | | 0,08 + | |
| 0,38 +++ | 0 — | 0 — | 0,51 +++ | | 0,07 + | |
| 0,23 ++ | 0 — | 0 — | | | 0,04 + | |
| 0,05 + | 0 — | | | | 0,05 + | |
| 0,06 + | 0 — | | | | 0,05 + | |
| 0,17 ++ | 0 — | | | | 0,08 + | |
| 0,14 ++ | 0 — | | | | 0,04 + | |
| 0,09 + | | | | | | |

Nr. 23. Frisches Mycel. Auf je 1 g Zucker 2 g frisches Mycel.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,09 g, bei Maltose 0,116 g, bei Milchzucker 0, bei Raffinose 0,02 g Galaktosazon.

Preßsaft Nr. 24. Nährlösung Rohrzucker + 0,1 % Pepton + $(\text{N}_4\text{H})_2\text{SO}_4$.

Wachstum 22. Juni bis 9. Juli. $1\frac{1}{2}$ ccm Preßsaft auf je 1 g Zucker.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,10 g, bei 1 g Maltose 0,046 g, bei Milchzucker 0, bei 1 g Raffinose 0,045 g Galaktosazon.

Nr. 25. Preßsaft + Kochsaft (10 ccm) aus je 5 g Rückstand. (Preßsaft 1,5 ccm auf 1 g Zucker.)

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,10 g, bei 1 g Maltose 0,065 g, bei Milchzucker 0, bei 1 g Raffinose 0,050 g Galaktosazon.

Nr. 26. Rückstand + Preßsaft. $1\frac{1}{2}$ ccm Preßsaft und 5 g Rückstand auf je 1 g Zucker.

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,11 g, bei 1 g Maltose 0,17 g, bei Milchzucker 0, bei 1 g Raffinose 0,077 g Galaktosazon.

Nr. 27. Rückstand. (5 g auf je 1 g Zucker.)

Ausbeute an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,10 g, bei 1 g Maltose 0,135 g, bei Milchzucker 0, bei 1 g Raffinose 0,042 g Galaktosazon.

Preßsaft Nr. 28. Vor dem Pressen 1 Stunde lang gerieben.

Es wurden erhalten an unlöslichen Osazonen: bei Rohrzucker 0,10 g, bei Maltose 0,045 g.

In der vorstehenden Tabelle sind die Resultate zusammengestellt. Die Zahlen bedeuten die abgerundeten Werte an unlöslichen Osazonen, auf 1 g Zucker umgerechnet. Die Kreuze zeigen den Grad der Spaltung.

Der Kürze wegen sind die Resultate früherer Autoren in der Tabelle in Klammern hinzugesetzt und die dazugehörigen Literaturangaben zum Schluß beigefügt.

Literaturangaben zur Tabelle.

1. Laborde, Annales de l'institut Pasteur, Bd. XI (1897), S. 1.
2. Schäffer, Dissertation. Erlangen 1901.
3. Sitnikoff und Rommel, Bull. de l'association des chimistes, Bd. XVIII (1900), S. 1049; Zeitschrift f. Spiritusindustrie, Bd. XXIII (1900), S. 391.
4. P. Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgeweben (4. Aufl.). Berlin 1905, S. 230.
5. C. Wehmer in Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. IV, S. 527.
6. C. Wehmer, Zentralbl. f. Bakteriologie (II. Abt.), Bd. VI (1900), S. 353.
7. Gayon, Annal. de chimie et de physique (Serie III), Bd. XIV, S. 258.
8. Fitz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. IX (1876), S. 1352.
9. Bail, Flora, 1857, S. 417. Fitz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. VIII (1875), S. 1540. — Brefeld, Landwirtschaftliche Jahrb., Bd. V (1876), S. 281. — E. Ch. Hansen, Compt. rend. de Carlsberg, Bd. II (1888), S. 143. — O. Emmerling, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXX (1897), S. 454.
10. E. Ch. Hansen, a. a. O.
11. Kellner, Mori und Nagaoka, Diese Zeitschrift, Bd. XIV (1890), S. 297. — Kozai, Zentralbl. f. Bakteriologie (II. Abt.), Bd. VI (1900), S. 385. — Sanguineti, Annal. de l'institut Pasteur, Bd. XI (1897), S. 264.
12. Kellner, Mori und Nagaoka, a. a. O. — Calmette, Annal. de l'institut Pasteur, Bd. VI (1892), S. 605. — Kozai, a. a. O. — Hill, Proc. chem. soc., Bd. XVII (1901), S. 184.
13. Kozai, a. a. O.

Wir fanden nach den Angaben der Tabelle gegenüber früheren Autoren zwei Abweichungen. Die Preßsäfte von *Aspergillus Orycae* und *Mucor javanicus* enthielten die vorher in diesen Pilzen aufgefundene Maltase nicht. Grade dieses Ferment scheint besonders schwer in die Pilzpreßsäfte überzugehen, wodurch wir die Divergenz der Beobachtungen am besten zu erklären glauben.

Charlottenburg und Budapest, Mitte August 1909.