

Ein eigentümlicher Typus der Pflanzenatmung.

Von

S. Kostytschew.

Mit einer Abbildung im Text.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. März 1910.)

Wie bekannt, werden bei der Pflanzenatmung meistens nur vergärbare Kohlenhydrate verarbeitet. Auch in denjenigen Fällen, wo Fett als Atmungsmaterial dient, findet wahrscheinlich zunächst eine Umwandlung des Fettes in Zucker statt und letzterer wird alsdann in üblicher Weise oxydiert. Bei Sauerstoffabschluß tritt Alkoholgärung an die Stelle von Zuckeroxydation, und es liegt die Annahme nahe, daß auch bei Sauerstoffzutritt die primäre Phase der Zuckerverarbeitung mit der Alkoholgärung identisch ist, wobei aber der Spaltungsprozeß nicht bis zur Alkohol- und Kohlensäurebildung fortschreitet.¹⁾

Vor einiger Zeit habe ich jedoch dargetan,²⁾ daß die anaerobe Atmung vom Champignon ein ganz eigenartiger Prozeß ist: weder in lebenden Pilzen noch in dem aus denselben nach E. Buchners³⁾ Methode dargestellten Preßsaft läßt sich nach dem Verweilen im sauerstofffreien Raume Äthylalkohol nachweisen. Hierdurch wurde die früher vorherrschende Theorie von Müntz⁴⁾ widerlegt. Der genannte Forscher setzte voraus, daß bei der anaeroben Atmung von *Psalliota campestris* eine Vergärung von Mannit unter Bildung von Kohlensäure, Wasserstoff und Äthylalkohol stattfindet.



¹⁾ Kostytschew, Biochemische Zeitschrift, Bd. XV, S. 164 (1908) und Bd. XXIII, S. 137 (1909).

²⁾ Kostytschew, Botanische Berichte, Bd. XXV, S. 188 (1907) und Bd. XXVIa, S. 167 (1908).

³⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Zymasegärung (1903).

⁴⁾ Müntz, Annales de chim. et de physique (5), Bd. VIII, S. 56 (1876).

Was nun die von Müntz tatsächlich beobachtete Wasserstoffbildung anbelangt, so habe ich nachgewiesen,¹⁾ daß dieselbe in frischen und gesunden Pilzen nicht zustandekommt und erst nach dauerndem Verweilen bei Sauerstoffabschluß eingeleitet wird; dieser Vorgang ist aber auf die Tätigkeit der Bakterien, die sich in den Fruchtkörpern von *Psalliota campestris* schnell entwickeln, zurückzuführen. Aus all diesen Ergebnissen geht hervor, daß die anaerobe Atmung vom Champignon und wahrscheinlich auch diejenige von anderen keine löslichen Kohlenhydrate enthaltenden Hymenomyceten mit der Alkoholgärung nichts zu tun hat.

Es ist dies der erste bisher bekannte Fall der vollkommen ohne Alkoholbildung verlaufenden anaeroben Atmung lebender Pflanzen. In einer gemeinsam ausgeführten Arbeit haben Palladin und ich²⁾ gefunden, daß die anaerobe Atmung der durch niedrigere Temperatur abgetöteten Lupinensamen und Lupinenkeimlinge ebenfalls ohne Alkoholbildung zustande kommt; dieses Resultat war um so merkwürdiger, als die anaerobe Atmung lebender Lupinen sich mit der Alkoholgärung identisch erwies, was auch den früheren Angaben von Godlewski³⁾ entspricht. Unsere Versuche wurden von Nabokich⁴⁾ wiederholt und vollkommen bestätigt. Der genannte Forscher erhielt folgende Resultate:

1. Alkoholmenge in zwei Portionen (zu je 205 Stück) der durch niedrigere Temperatur abgetöteten Lupinenkeimlinge nach zweitägigem Verweilen im Vakuum:

I. $C_2H_5OH = 88$ mg, II. $C_2H_5OH = 95$ mg.

2. Alkoholmenge in einer Portion lebender Keimlinge (205 Stück) nach zweitägigem Verweilen im Vakuum:

$C_2H_5OH = 423$ mg.

¹⁾ Kostytschew, Botanische Berichte, Bd. XXV, S. 178 (1907).

²⁾ Palladin und Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 214 (1906).

³⁾ Godlewski, Bulletin internat. de l'Acad. des sciences de Cracovie, S. 115 (1904).

⁴⁾ Nabokich, Botanische Berichte, Bd. XXVIa, S. 327 (1908).

3. Alkoholmenge in Lupinenkeimlingen vor dem Versuche (zwei Kontrollportionen zu je 205 Stück):

I. $C_2H_5OH = 96$ mg, II. $C_2H_5OH = 98$ mg.

Erfrorene Keimlinge haben also keine Spur Alkohol bei Sauerstoffabschluß produziert.

Bei Besprechung unserer Resultate bemerkt jedoch Euler¹⁾ wohl zutreffend: «Der Schluß, daß in diesen Fällen keine Zymasegärung stattgefunden hat, ist nur insofern berechtigt, als die letzte Phase der Gärung ausgeblieben ist bzw. die an dieser Phase beteiligte Zymasekomponente unwirksam gemacht worden ist. Nichts zwingt uns aber zu der sogar wenig wahrscheinlichen Annahme, daß die primäre Kohlensäureabspaltung infolge des Erfrierens anders verläuft, als bei der Zymasegärung des Zuckers.» Die anaerobe Atmung vom Champignon ist dagegen ein vollkommen eigenartiger Prozeß, der auch in lebenden Pilzen von der Alkoholgärung durchaus verschieden ist. Eine weitere Erkenntnis der die CO_2 -Abscheidung vom Champignon bewirkenden Stoffumwandlungen kann selbstverständlich nur durch Versuche mit abgetöteten Pilzen befördert werden; im folgenden teile ich einige Resultate dieser Untersuchungen mit.

Es ist kaum zweifelhaft, daß die CO_2 -Abscheidung der Preßsäfte vom Champignon bei Sauerstoffzutritt zum Teil von Oxydationsvorgängen herrührt; dies ist daraus ersichtlich, daß in meinen vorstehend erwähnten Versuchen der Preßsaft molekularen Sauerstoff mit großer Energie absorbierte und hierbei eine größere CO_2 -Menge lieferte, als bei Sauerstoffabschluß. Nach der Theorie von Bach²⁾ und Engler,³⁾ der ich mich vollkommen anschließe,⁴⁾ sind die Vorgänge der Autoxydation

¹⁾ Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, Bd. II, S. 173 (1909).

²⁾ Bach, Comptes rendus, Bd. CXXIV, S. 951 (1897).

³⁾ Engler und Wild, Chem. Berichte, Bd. XXX, S. 1669 (1897). — Engler und Weissberg, ebenda, Bd. XXXIII, S. 1097 (1900) und Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation (1904). — Engler und Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 327 (1909).

⁴⁾ Die elektrolytische Autoxydationstheorie van t' Hoff's (Zeitschrift für physik. Chemie, Bd. XVI, S. 411, 1895; Verhandl. d. Frankf. Naturforscherges., II. Teil. 1. Hälfte, S. 107, 1897) dürfte nach den bedeutungs-

in der Weise aufzufassen, daß der molekulare Sauerstoff sich in Form ungesättigter Moleküle — O — O — an die autoxydablen Stoffe, welche als Autoxydatoren bezeichnet werden, anlagert. Die bei der Autoxydation entstehenden peroxydartigen

Verbindungen $A \begin{array}{l} \diagup O \\ | \\ \diagdown O \end{array}$ haben Engler und Weissberg¹⁾ Moloxyde genannt.

Auch bei physiologischen Prozessen ist die Aufnahme des molekularen Sauerstoffs gewiß nur durch die Autoxydatoren und zwar unter Peroxydbildung möglich: Bach und Chodat²⁾ haben die Anwesenheit von Peroxyden in lebenden Pflanzenzellen festgestellt.

Den weiteren Verlauf der Oxydationsvorgänge bei der Atmung muß man sich in der Weise vorstellen, daß entweder die im Organismus so verbreiteten induzierten Reaktionen sofort eintreten, wodurch das Betriebsmaterial in Form unbeständiger Verbindungen (Acceptoren) von den Moloxyden oxydiert wird, oder es findet zunächst eine Umlagerung der primären Peroxyde (Oxygenasen) statt unter Bildung von sekundären Peroxyden, welche ein höheres Oxydationspotential zeigen und also Stoffe oxydieren können, die von den Oxygenasen unangreifbar sind; dies ist wenigstens die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung der von Bach und Chodat³⁾ beschriebenen Zusammenwirkung von Oxygenase und Peroxydase. Die Oxydation des Atmungsmaterials geht freilich stufenweise vor, bis schließlich eine vollständige Verbrennung zu den Endprodukten der Atmung erfolgt; es müssen also in den Pflanzengeweben labile, sauerstoffreiche Zwischenprodukte der vitalen Oxydation vorhanden

vollen Versuchen von Engler und Wild (Chem. Berichte, Bd. XXX, S. 1669, 1897 und Bd. XXXI, S. 3055, 1898), Engler (ebenda, Bd. XXXIII, S. 1090, 1900) und Engler und Frankenstein (ebenda, Bd. XXXIV, S. 2933, 1901) als kaum stichhaltig erscheinen. Vgl. auch die theoretischen Einwände von Bodländer in Ahrens Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge, Bd. III, S. 450 (1899).

¹⁾ Engler und Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation, S. 38 (1904).

²⁾ Bach und Chodat, Chem. Berichte, Bd. XXXV, S. 2466, 1902.

³⁾ Bach und Chodat, Archives des sciences physiques et naturelles, Genève, Bd. XVII, S. 477, 1904.

sein; als ein Beispiel derartiger Verbindungen mag die von Euler und Bolin¹⁾ aus *Medicago sativa* isolierte Mesoxalsäure Erwähnung finden. Es ist einleuchtend, daß Mesoxalsäure aus einer Triose durch Oxydation leicht entstehen kann: andererseits enthält sie zwei Carboxylgruppen an einem Kohlenstoffatome und zersetzt sich also leicht unter Abspaltung von CO₂ und Bildung von Glyoxylsäure. Aus den interessanten Untersuchungen von Euler und Bolin geht hervor, daß in lebenden Geweben eine CO₂-Abspaltung von Mesoxalsäure tatsächlich zustande kommt, denn neben Mesoxalsäure wurde auch Glyoxylsäure im selben *Medicago*-präparate aufgefunden.

Die Acceptoren sind nach der Theorie von Engler als labile, ungesättigte Verbindungen aufzufassen, das in den Pflanzengeweben vorhandene Atmungsmaterial wird aber meistens in Form stabiler Stoffe abgelagert; der Oxydation des Betriebsmaterials muß also eine Dissoziation desselben vorangehen: dieser Vorbereitungsprozeß vollzieht sich selbstverständlich auch bei Sauerstoffabschluß; findet keine Oxydation der hierbei gebildeten labilen Verbindungen statt, so wird das molekulare Gleichgewicht durch andere spontane Reaktionen herbeigeführt. Auf den Zusammenhang dieser anaeroben Prozesse mit der Sauerstoffatmung habe ich schon mehrmals hingewiesen.²⁾ Bei Verarbeitung des Zuckers bildet die Alkoholgärung den primären Spaltungsprozeß, wobei aber unter normalen Umständen Alkohol nicht erzeugt wird; als Acceptoren sind allem Anschein nach die intermediären Gärungsprodukte anzusehen.

Folgende Einteilung der bei der Pflanzenatmung stattfindenden Stoffumwandlungen sollte den in der allgemeinen Chemie vorherrschenden Anschauungen über die Autoxydation am besten entsprechen.

1. Primäre (vorbereitende) Prozesse, und zwar die Aufnahme des molekularen Sauerstoffs durch Autoxydatoren

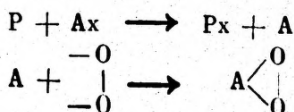
¹⁾ Euler und Bolin, Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 1 (1909).

²⁾ Kostytschew, Botan. Berichte, Bd. XX, S. 327 (1902) und Bd. XXV, S. 44 (1907); Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. XL, S. 563 (1904); Biochem. Zeitschrift, Bd. XV, S. 164 (1908) und Bd. XXIII, S. 137 (1909); Untersuchungen über die anaerobe Atmung der Pflanzen (1907), russisch.

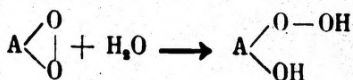
unter Bildung von Moloxyden einerseits und die Spaltung des Atmungsmaterials unter Bildung von Acceptoren anderseits.

2. Sekundäre Prozesse: Oxydation der Acceptoren durch Moloxyde; dieser Vorgang ist als eine Kette mehrerer Reaktionen aufzufassen. Aus Moloxyden werden meistens zunächst sekundäre Peroxyde gebildet, die ein höheres Oxydationspotential haben.

Von diesem Gesichtspunkte aus dürfte es vielleicht ratsam erscheinen, die Bezeichnung «Oxydasen» nur für Stoffe beizubehalten, welche den primären Prozeß der Sauerstoffaufnahme einleiten und also in den sich hierbei abspielenden Reaktionen als Autoxydatoren (A) oder Pseudoautoxydatoren (P) wirksam sind:



Als Oxygenasen sind entweder die primären Moloxyde $A \begin{array}{c} \diagup O \\ | \\ \diagdown O \end{array}$, oder deren nächste unmittelbar entstehenden Umwandlungsprodukte aufzufassen. Unter derartigen spontanen Umwandlungen der Peroxyde ist z. B. die Bildung von Peroxyhydraten wohl denkbar:



Diese Nomenklatur soll den Unterschied zwischen Oxydasen und Peroxydasen, deren Funktionen durchaus verschieden sind, scharf hervorheben. Oxydasen sind nur am primären Prozesse der Sauerstoffaufnahme und Peroxydbildung beteiligt, Peroxydasen bewirken dagegen die Umlagerung der Oxygenasen und hiermit die eigentliche Oxydation des Atmungsmaterials durch den gebundenen Sauerstoff der Peroxyde. Aus dem Gesagten ist ersichtlich, daß Farbenreaktionen mit Guajak-tinktur und anderen leicht oxydierbaren Stoffen für den Nachweis der Oxydasen unbrauchbar sind, da die genannten Reagenzien durch das System Oxygenase + Peroxydase und in einzelnen Fällen vielleicht auch durch die sauerstoffreichen

Zwischenprodukte der Atmung oxydiert werden können. Namentlich in dem Falle, wo die Farbenreaktion erst nach Zusatz von Wasserstoffsperoxyd eintritt, ist sie offenbar durch Peroxydase eingeleitet. Für den Nachweis von Oxydasen ist also nur die Absorption des molekularen Sauerstoffs, die durch gasometrische Methoden ermittelt werden kann, ausschlaggebend.

Obige Auseinandersetzungen dienten mir als Leitfaden bei der Beurteilung der sich im Preßsaft von *Psalliota campestris* abspielenden Vorgänge. Auf Grund der vorstehend dargelegten theoretischen Betrachtungen erscheint es als reiner Zufall, daß bei der anaeroben Zuckerspaltung CO_2 produziert wird, denn für das Zustandekommen der physiologischen Oxydation ist nur von Belang, daß sich dissoziationsfähige Acceptoren bilden; es ist also wohl möglich, daß die primäre Spaltung anderweitiger Stoffe sich ohne CO_2 -Bildung vollzieht; übrigens ist auch in betreff der Zuckerveratmung die Annahme naheliegend, daß bei Sauerstoffzutritt die primäre Spaltung nicht bis zur Alkohol- und Kohlensäurebildung schreitet. Andererseits ist die Sauerstoffaufnahme ebenfalls nur eine primäre Phase der Atmung: für die eigentliche Oxydation des Atmungsmaterials wird der Sauerstoff der Peroxyde verwertet, und die letzten Phasen der Atmung sind also von der Sauerstoffaufnahme unabhängig; die labilen sauerstoffreichen Zwischenprodukte der Atmung können sich auch bei Sauerstoffabschluß unter CO_2 -Abspaltung zersetzen. Die anaerob gebildete Kohlensäure kann somit entweder von den Reaktionen herrühren, durch welche das molekulare Gleichgewicht beim Ausbleiben der Oxydationsvorgänge hergestellt wird (z. B. von der Alkoholgärung), oder von den vorgebildeten Zwischenprodukten der physiologischen Oxydation abgespalten werden. Eine nähere Untersuchung der anaeroben CO_2 -Produktion der Preßsäfte von Champignon ergab, daß wir es hier mit dem letzteren Falle zu tun haben.

Die Preßsäfte wurden immer auf folgende Weise erhalten. Vollkommen frische ausgelesene Pilze wurden mit Quarzsand zu einem Brei zerrieben und bei geringem Drucke abgepreßt;

der Rückstand wurde mit Kieselgur versetzt, fein zerrieben und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären wiederum abgepreßt. Sämtliche Saftportionen wurden in einem mit Eis gekühlten Gefäße aufgefangen und sofort zu den Versuchszwecken verwendet.

Der Preßsaft ist eine dunkelbraune Flüssigkeit, welche keine unversehrten Pilzzellen enthält und bereits bei gelindem Erhitzen einen voluminösen Eiweißniederschlag abscheidet, wonach nur geringste Spuren der Biuretreaktion liefernden Stoffe in der Lösung bleiben. Eine Portion des Preßsaftes wurde immer enteiweißt, entfärbt und mit Fehlingscher Lösung geprüft; eine Reduktion von Kupferoxyd wurde aber keinmal wahrgenommen. Die Reaktion der Preßsäfte war entweder neutral oder schwach alkalisch; die alkalische Reaktion ist offenbar von dem basischen Charakter der Eiweißstoffe des Champignons abhängig.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Einwirkung der Erhitzung auf die CO_2 -Produktion der Preßsäfte bei Sauerstoffzutritt und Sauerstoffabschluß studiert.

Versuch 1.

Es wurden zwei gleiche Portionen A und B des Preßsaftes (zu je 350 ccm) genommen. Portion A wurde mit 3,5 g Natriumfluorid als Antiseptikum versetzt und im Luftstrome belassen. Portion B wurde während 5 Minuten auf 100° erhitzt, dann abgekühlt, mit 3,5 g Natriumfluorid versetzt und ebenfalls im Luftstrome belassen. Bei dem Erhitzen hat sich ein voluminöser Eiweißniederschlag gebildet. Im Verlaufe von 23 Stunden wurden im Luftstrome folgende CO_2 -Mengen gebildet.

Portion A (Kontroll) $\text{CO}_2 = 180,2$ mg

„ B (erhitzt) „ = 123,6 „

Für die CO_2 -Bestimmungen wurden Geisslersche Apparate verwendet.

Versuch 2.

Zwei Portionen des Preßsaftes A und B zu je 650 ccm. Beide Portionen wurden während 5 Minuten auf 100° erhitzt;

dann wurde Portion A mit 6,5 g Natriumfluorid versetzt und im Luftstrome belassen. Portion B wurde filtriert, das vollkommen klare eiweißfreie Filtrat (500 ccm) mit 5 g Natriumfluorid beschickt und im Luftstrome belassen. Der Eiweißniederschlag wurde gut ausgewaschen und mit 200 ccm 1%iger Mannitlösung in einen Kolben gebracht; durch diese Mischung wurde ebenfalls Luftstrom geleitet. Im Verlaufe von 22 Stunden wurden folgende CO_2 -Mengen gebildet.

Portion A:	$\text{CO}_2 = 92,7 \text{ mg}$
> B: 1. Filtrat	> = 81,8
2. Niederschlag	> = 0,0

Die etwas geringere CO_2 -Produktion der Portion B (Filtrat) ist offenbar darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Flüssigkeit vom Niederschlage zurückgehalten wurde; das Waschwasser wurde mit dem Filtrate nicht vereinigt, um eine Verdünnung des Saftes zu vermeiden.

Diese Versuche zeigen folgendes: 1. Die aerobe CO_2 -Produktion der Preßsäfte wird durch kurzdauerndes Kochen nicht eingestellt. 2. Die CO_2 -Abscheidung der gekochten Säfte bei Sauerstoffzutritt ist unabhängig von den Eiweißstoffen.

Durch länger dauernde Erhitzung wird die CO_2 -Produktion des Preßsaftes stark herabgesetzt, doch wird die CO_2 -Bildung selbst durch 15 Minuten dauerndes Kochen nicht ganz aufgehoben.

Versuch 3.

Der Preßsaft (500 ccm) wurde während 15 Minuten gekocht, dann filtriert und abgekühlt. 275 ccm des Filtrates wurden mit 3 g Natriumfluorid versetzt und im Luftstrome belassen. Im Verlaufe von 25 Stunden wurde folgende CO_2 -Menge gebildet.

Nach 6 Stunden:	$\text{CO}_2 = 16,8 \text{ mg}$
> weiteren 19 Stunden:	> = 13,1
<hr/>	
Gesamtmenge von CO_2	= 29,9 mg

Im Gegenteil wird die anaerobe CO_2 -Produktion durch Erhitzen stark herabgesetzt. Aus folgendem Versuche ist ersichtlich, daß nach einem 10 Minuten dauernden Erhitzen auf 100° keine CO_2 -Produktion bei Sauerstoffabschluß stattfindet.

Versuch 4.

Der Preßsaft wurde während 10 Minuten gekocht, filtriert und in zwei gleiche Portionen A und B zu je 400 ccm geteilt. Nach Zusatz von je 8 g Natriumfluorid wurde Portion A im Wasserstoffstrome, Portion B aber im Luftstrome belassen. Im Verlaufe von 25 Stunden wurden folgende CO_2 -Mengen gebildet.

Portion A (Wasserstoffstrom)	$\text{CO}_2 = 3,4 \text{ mg}$
" B (Luftstrom)	" " = 46,9 "

Die Luftportion erscheint am Ende des Versuches bedeutend dunkler gefärbt, als die Wasserstoffportion.

Versuch 5.

Der Preßsaft wurde während 5 Minuten gelinde erwärmt, wobei sich (bei etwa 60°) ein voluminöser Eiweißniederschlag gebildet hat. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat in zwei gleiche Portionen A und B zu je 350 ccm geteilt. Portion A wurde im Wasserstoffstrome, Portion B im Luftstrome ohne Antiseptikum belassen. Im Verlaufe von 24 Stunden wurden folgende CO_2 -Mengen gebildet.

Nach 4 Stunden:	A (H_2 -Strom)	$\text{CO}_2 = 28,8 \text{ mg}$
	B (Luftstrom)	" " = 28,8 "
" weiteren 20 Stunden:	A (H_2 -Strom)	" " = 26,5 "
	B (Luftstrom)	" " = 106,5 "

Am Ende des Versuches erscheint Portion B in dünner Schicht dunkelbraun, Portion A hellbraun gefärbt.

Obige Versuche zeigen, daß im Preßsaft von Champignon Autoxydationsvorgänge, welche bis zur CO_2 -Bildung schreiten, zustande kommen. Diese Vorgänge sind unabhängig von den Eiweißstoffen und werden durch Kochen nicht eingestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die genannten Prozesse nicht durch Fermente eingeleitet werden.

Es liegt gar kein Grund vor zu der Annahme, daß die hier beschriebenen Autoxydationsvorgänge in lebenden Pilzen ohne jede physiologische Bedeutung bleiben und durch andere fermentative Prozesse ersetzt sind.

Die bei Sauerstoffabschluß produzierte Kohlensäure ist im Saft als ein Bestandteil labiler Verbindungen vorhanden.

Folgender Versuch zeigt, daß im Preßsaft von *Psalliota campestris* Stoffe enthalten sind, welche bei der Hydrolyse CO_2 liefern. Es bleibt dahingestellt, ob bei gewöhnlicher Temperatur die Spaltung dieser Stoffe durch ein Ferment hervorgerufen wird.

Versuch 6.

Der Preßsaft wurde in einen Vakuumkolben gebracht und der Kolben mittels der Geryk-Ölluftpumpe bis auf 0,5 mm evakuiert. Alsdann wurde der Kolben geöffnet und der Saft in zwei gleiche Portionen A und B zu je 250 ccm geteilt. Portion A wurde für die Bestimmung von CO_2 der Carbonate verwendet. Der Saft wurde zuerst auf dem Wasserbade in einer flachen Porzellanschale gekocht, dann in den Kohlensäurebestimmungsapparat¹⁾ gebracht und die Kohlensäure der Carbonate durch Kochen unter Zusatz von 30 ccm 10%iger Salzsäure mit nachfolgender Luftdurchleitung ermittelt. Portion B wurde direkt im Kohlensäurebestimmungsapparate bei neutraler Reaktion gekocht und die hierdurch abspaltbare Kohlensäure bestimmt. Alsdann wurde Salzsäure zugegossen und das Kochen wiederholt. Es ergaben sich folgende Resultate:

Portion A: CO_2 der Carbonate	15,7 mg
" B: " nach der Hydrolyse mit Wasser	103,4 "
" " " der Carbonate	15,8 "

Es ist also ersichtlich, daß CO_2 der Carbonate nur einen geringen Teil der Gesamtmenge der beim Kochen erhaltenen Kohlensäure ausmacht. Bei dem Auspumpen wurde nicht nur die gesamte im Saft gelöste freie Kohlensäure, sondern auch der größte Teil von der locker gebundenen Kohlensäure der etwa vorhandenen Bicarbonate (deren Menge aber 16 mg nicht überschreiten kann) entfernt. Die im Kohlensäurebestimmungsapparate ohne Säurezusatz erhaltene CO_2 -Menge ist also weder auf freie Kohlensäure, noch auf Bicarbonate zurückzuführen.

¹⁾ Fresenius, Anleitung zur quantitat. chemisch. Analyse, 6. Auflage, Bd. I, S. 449 (1873). Ich bediene mich eines Apparates mit Rückflußkühler.

Die Anwesenheit der CO_2 leicht abspaltenden Stoffe in verschiedenen Pflanzen wurde schon längst von Berthelot und André¹⁾ nachgewiesen. Bereits früher hat Brenstein²⁾ dargetan, daß die durch Wasserdampf getöteten Pflanzen im Verlaufe mehrerer Tage CO_2 langsam abscheiden. Unter Anwendung derselben Methode zeigte neuerdings Nabokich,³⁾ daß durch Einwirkung von überhitztem Wasserdampf auf einige Pflanzen (u. a. auf Fruchtkörper von Champignon) die Anregung zu einer tagelang dauernden CO_2 -Produktion geschaffen wird.

Über die Natur der CO_2 abspaltenden Stoffe wissen wir zurzeit nichts Bestimmtes. Berthelot (l. c.) dachte an Ester der Kohlensäure; es ist aber einleuchtend, daß die Zahl der sich unter CO_2 -Bildung leicht zersetzenden Stoffe außerordentlich groß ist. In erster Linie gehören hierzu alle Carbonsäuren, welche zwei Carboxylgruppen an einem Kohlenstoffatome haben, ferner alle β -Ketosäuren, unter ihnen die physiologisch wichtige Acetessigsäure usw. Die kaum zu überwindende Schwierigkeit der Identifizierung der einzelnen bei den physiologischen Prozessen wirksamen CO_2 abspaltenden Stoffe erhellt daraus, daß wir trotz so vieler Bemühungen keine bestimmten Erfahrungen bezüglich der CO_2 -Bindung im Blute haben. In neuerer Zeit hat jedoch Siegfried⁴⁾ die, allem Anschein nach, physiologisch sehr wichtige Gruppe der Carbaminsäuren beschrieben. Die Salze dieser Säuren können aus den entsprechenden Aminosäuren, Kohlensäure und Metallhydroxyden synthetisch leicht dargestellt werden; beim Kochen zersetzen sie sich unter Bildung von Aminosäure und Carbonat; derselbe Spaltungsprozeß kommt auch bei gewöhnlicher Temperatur langsam zustande. Die Eigenschaft, sich mit CO_2 und Basen zu den Salzen der Carbaminsäuren zu vereinigen, kommt nicht nur den

¹⁾ Berthelot und André, Comptes rendus, Bd. CXVIII, S. 45, und Bd. CXIX, S. 711 (1894); Berthelot, Chimie végétale et agricole, Bd. III, S. 294 und 308—357 (1899).

²⁾ Brenstein, Habilitationsschrift, Rostock (1887).

³⁾ Nabokich, Botan. Berichte, Bd. XXVIa, S. 324 (1908).

⁴⁾ Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 85 (1905); Bd. XLVI, S. 401 (1906). — Siegfried und Neumann, ebenda, Bd. LIV, S. 423 (1908). — Siegfried und Liebermann, ebenda, Bd. LIV, S. 437 (1908).

Aminosäuren, sondern auch den Eiweißstoffen und Peptiden zu. Späterhin zeigten Siegfried und Howwjanz,¹⁾ daß auch Alkohole in Gegenwart von Basen CO_2 binden können. Die von Siegfried geäußerte Voraussetzung, daß im Blute CO_2 in Form von Carbaminosäuren gebunden ist, erscheint gewiß sehr plausibel; es ist außerdem wahrscheinlich, daß die genannten Verbindungen auch in Pflanzensäften sich bilden können. Aus nachfolgenden Versuchen ist aber ersichtlich, daß CO_2 im Preßsaft von Champignon nicht ausschließlich in Form von Carbaminosäuren enthalten ist.

Versuch 7.

Der Preßsaft wurde in einen dickwandigen Kolben hineingetan und im Vakuum bei 20° zum Sieden gebracht. Alsdann wurden zwei Saftportionen A und B zu je 250 ccm genommen. Portion A wurde direkt im Kohlensäurebestimmungsapparate unter Zusatz von Weinsäure gekocht. Diese CO_2 -Bestimmung ergab: $\text{CO}_2 = 63,9$ mg.

Portion B wurde mit 100 ccm bei 0° bereiteter Kalkmilch unter Eiskühlung und Umschütteln behandelt, wobei sich ein voluminöser Eiweißniederschlag abgesetzt hat. Dann wurde der Saft bei CO_2 -Abschluß filtriert. Das stark alkalisch reagierende Filtrat färbt sich bei Sauerstoffzutritt tief dunkelbraun, scheidet aber selbst nach längerem Stehen in einer CO_2 -freien Atmosphäre keinen Niederschlag von Calciumcarbonat ab. Auch Zusatz von Chlorcalcium bewirkt keine Trübung der Flüssigkeit. 250 ccm des Filtrates wurden unter Zusatz von überschüssiger Weinsäure für die CO_2 -Bestimmung verwendet. Es ergab sich: $\text{CO}_2 = 36,9$ mg. Da der Preßsaft durch Zusatz von Kalkmilch auf 1,4 Volumen verdünnt worden war, so ist die einem Volumen von 250 ccm des nicht verdünnten Saftes entsprechende CO_2 -Menge gleich 51,7 mg. Die Kontrollportion lieferte aber 63,9 mg CO_2 ; die Differenz beträgt also nur 12,2 mg und ist wahrscheinlich auf CO_2 der Carbonate zurückzuführen. Die nach der Behandlung mit Kalkmilch vom Saft

¹⁾ Siegfried und Howwjanz, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 376 (1909).

abgespaltene Kohlensäure war offenbar nicht in Form von freiem Säurehydrat oder von kohlensauren Salzen im Saftes vorgebildet. Auch ist die Annahme wenig wahrscheinlich, daß Carbaminosäuren als Quelle von CO_2 dienen. Durch Behandlung mit Kalkmilch wurde eine beinahe vollkommene Enteiweißung des Saftes bewirkt.¹⁾ Andererseits enthält der Preßsaft von Champignon keine Aminosäuren,²⁾ die in Pilzen überhaupt selten nachgewiesen werden können. Folgende Versuche zeigen deutlich, daß wenigstens ein Teil der CO_2 -abspaltenden Stoffe mit Carbaminosäuren nicht identisch ist.

Versuch 8.

Der ausgepumpte Preßsaft wurde auf die vorstehend beschriebene Weise mit Kalkmilch behandelt, bei CO_2 -Abschluß filtriert, im Filtrate das Calcium mit Oxalsäure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit Salzsäure genau neutral gemacht. 180 ccm der auf diese Weise gewonnenen Flüssigkeit lieferten beim Kochen ohne Säurezusatz 24,0 mg CO_2 . Die abgekochte Flüssigkeit wurde während 24 Stunden im Luftstrome belassen, dann wiederum gekocht, wobei aber keine Spur von CO_2 erhalten wurde.

Versuch 9.

Der Preßsaft wurde ausgepumpt, mit Kalkmilch unter Eiskühlung behandelt, bei CO_2 -Abschluß filtriert, im Filtrate das Calcium mit Oxalsäure quantitativ ausgefällt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde entfärbt durch Ausschütteln mit Tierkohle, welche vorher einmal mit verdünnter Salzsäure und dann wiederholt mit destilliertem Wasser ausgekocht worden war. Nach zweimaligem Ausschütteln und Filtrieren erhielt

¹⁾ Die Eiweißstoffe der Hymenomyceten haben basischen Charakter und sind den tierischen Histonen ähnlich. Sie werden durch Alkalien gefällt und sind in Mineralsäuren löslich. Vgl. Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 438 (1899) und Winterstein und Hoffmann, Hofmeisters Beiträge, Bd. II, S. 404 (1902).

²⁾ Abderhalden und Rilliet, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 395 (1908).

ich eine farblose Flüssigkeit, die mit verdünnter Salzsäure genau neutral gemacht wurde. Diese Flüssigkeit gab nach Zusatz von klarem Kalkwasser bezw. von Chlorcalcium gar keine Trübung, reduzierte nicht Fehlingsche Lösung und lieferte keine Biuretreaktion. Der so bearbeitete Preßsaft ist also frei von Kohlensäure, kohlensauren Salzen, Eiweiß und Farbstoff. Auch waren keine Carbaminosäuren in der Flüssigkeit vorhanden, denn Zusatz von Alkohol lieferte gar keine Fällung, die Salze der Carbaminosäuren werden aber nach den Angaben von Siegfried¹⁾ durch Alkohol gefällt. Diese farblose Lösung scheidet beim Kochen Kohlensäure ab. So gaben 200 ccm des Saftes beim Kochen unter Zusatz von Weinsäure 33,0 mg CO_2 . 140 ccm der aus einem anderen Preßsaft auf dieselbe Weise dargestellten Flüssigkeit gaben 20,3 mg CO_2 . Auch bei Zimmertemperatur wird allmählich CO_2 abgeschieden. 100 ccm einer auf obige Weise dargestellten und mit 1 g Natriumfluorid versetzten Flüssigkeit lieferten bei konstanter Luftdurchleitung während 24 Stunden 24,0 mg CO_2 ; beim Kochen wurde aber sodann keine Spur CO_2 erhalten. Daß tatsächlich CO_2 entweicht, wurde bewiesen durch Einleiten des Gasstromes in klares Barytwasser. Leitet man CO_2 -freie Luft durch den auf obige Weise bearbeiteten und entfärbten Preßsaft, ohne zu erwärmen, so tritt bald eine leichte Trübung des Barytwassers ein; wird nun der Saft schnell auf 100° erwärmt, so entsteht sofort im Barytwasser ein voluminöser Niederschlag, der sich in Essigsäure unter Aufbrausen löst. Das entweichende Gas färbt Lackmuspapier weinrot.

Obige Versuche zeigen also, daß im Preßsaft leicht zersetzliche Substanzen, welche bei 100° in neutraler Lösung CO_2 abspalten, vorhanden sind. Die Aufklärung der Natur so labiler Stoffe bietet gewiß große Schwierigkeiten dar; ich habe mich mit dieser Aufgabe einstweilen nicht befaßt. Es scheint die Annahme nicht unwahrscheinlich zu sein, daß die genannten Stoffe bei den Oxydationsvorgängen entstehen und als Zwischenprodukte der Atmung aufzufassen sind.

¹⁾ Siegfried, l. c.

Nun fragt es sich, ob nicht die gesamte CO_2 -Produktion des Preßsaftes auf die Dissoziation der CO_2 -abspaltenden Stoffe zurückzuführen ist. Diese Voraussetzung ist in betreff der aeroben CO_2 -Produktion von vornherein wenig wahrscheinlich, da bei Luftzutritt die CO_2 -Produktion des Preßsaftes durch Erwärmen auf 100° nicht aufgehoben wird. Folgende Versuche zeigen in der Tat, daß der Preßsaft bei Sauerstoffzutritt eine bedeutend größere CO_2 -Menge bildet, als sie durch Hydrolyse der CO_2 -abspaltenden Stoffe geliefert werden kann. Bei Sauerstoffabschluß ist dagegen die CO_2 -Produktion des Preßsaftes allem Anschein nach auf die Dissoziation CO_2 -abspaltender Stoffe zurückzuführen.

Versuch 10.

Der Preßsaft wurde im Vakuum bei 20° zum Sieden gebracht und alsdann in zwei gleiche Portionen A und B zu je 300 ccm geteilt. Portion A wurde direkt für die CO_2 -Bestimmung verwendet, Portion B wurde während 28 Stunden im Luftstrome belassen, dann ebenfalls für die CO_2 -Bestimmung verwendet. Antiseptikum 5 g Chininchlorhydrat.

Portion A.

1. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion	68,5 mg
2. CO_2 der Carbonate	12,2 »
	<hr/>
Summe . .	80,7 mg

Portion B.

1. CO_2 abgeschieden im Luftstrome:	
a) in 5 Stunden	42,0 mg
b) » 15 »	62,8 »
c) » 8 »	30,3 »
	<hr/>
Gesamtmenge von CO_2 im Luftstrome . .	135,1 mg
2. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion	70,7 »
3. CO_2 der Carbonate	28,3 »
	<hr/>
Summe . .	234,1 mg

Die Menge der durch Kochen abspaltbaren Kohlensäure ist nach 28stündiger Luftdurchleitung unverändert geblieben, was freilich durch Neubildung der CO_2 -abspaltenden Stoffe erklärlich ist. Die Zunahme von CO_2 der Carbonate ist wahrscheinlich auf Bildung von Ammoniumcarbonat zurückzuführen,

da bei der Eiweißspaltung in Pilzen Ammoniak entsteht. Durch direkte Oxydation wurden 135 mg CO_2 während 28 Stunden gebildet.

Versuch 11.

Der Preßsaft wurde bei 20° im Vakuum zum Sieden gebracht und dann in drei gleiche Portionen A, B und C zu je 290 ccm geteilt. Portion A wurde sofort für die CO_2 -Bestimmung verwendet, Portion B wurde während 22 Stunden im Luftstrome, Portion C im Verlaufe derselben Zeit im Wasserstoffstrome belassen. Nach Beendigung der Gasdurchleitung wurden Portionen B und C für die CO_2 -Bestimmungen verwendet. Antiseptikum 3 g Chininchlorhydrat.

Portion A.

1. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion	65,2 mg
2. CO_2 der Carbonate	13,0 »
	<hr/>
Summe . .	78,2 mg

Portion B.

1. CO_2 produziert im Luftstrome:	
a) in 5 Stunden	59,5 mg
b) » 17 »	48,4 »
	<hr/>
Gesamtmenge von CO_2 im Luftstrome . .	107,9 mg
2. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion	40,5 »
3. CO_2 der Carbonate	20,0 »
	<hr/>
Summe . .	168,4 mg

Portion C.

1. CO_2 produziert im Wasserstoffstrome:	
a) in 5 Stunden	24,6 mg
b) » 17 »	5,4 »
	<hr/>
Gesamtmenge von CO_2 im H_2 -Strome . .	30,0 mg
2. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion	23,5 »
3. CO_2 der Carbonate	15,2 »
	<hr/>
Summe . .	68,7 mg

Die im Luftstrome belassene Portion B hat wiederum eine bedeutende CO_2 -Menge durch Oxydationsvorgänge erzeugt. Die Wasserstoffportion C hat dagegen sogar weniger CO_2 geliefert, als die Kontrollportion A; die unbedeutende Differenz läßt sich dadurch erklären, daß ein Teil von CO_2 der Wasserstoffportion bei dem Verdrängen der Luft aus dem Versuchskolben vom Wasserstoffstrome mitgerissen wurde. (Der Geiss-

lersche Apparat war erst nach $1\frac{1}{2}$ stündiger Wasserstoffdurchleitung eingeschaltet.)

Versuch 12.

Der Preßsaft wurde im Vakuum bei 20° zum Sieden gebracht und alsdann in zwei gleiche Portionen A und B zu je 300 ccm geteilt. Portion A wurde direkt für die CO_2 -Bestimmung verwendet, Portion B wurde in einen dickwandigen Kolben gebracht und mit 3 g Natriumfluorid versetzt, der Kolben evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt. Als dann wurde im Verlaufe von 24 Stunden Wasserstoffstrom durch die Saftportion B geleitet. Nach Beendigung der Wasserstoffdurchleitung wurde Portion B ebenfalls für die CO_2 -Bestimmung verwendet.

Portion A.

CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion 61,1 mg

Portion B.

1. CO_2 abgeschieden im Wasserstoffstrome:

a) in 3 Stunden	26,6 mg
b) „ 3 „	8,2 „
c) „ 18 „	6,8 „

Gesamtmenge von CO_2 im Wasserstoffstrome 41,6 mg

2. CO_2 erhalten durch Kochen bei neutraler Reaktion 27,1 „

Summe . . 68,7 mg

Die beiden vorstehenden Versuche zeigen, daß die anaerobe CO_2 -Produktion des Preßsaftes auf eine Zersetzung labiler CO_2 -abspaltender Stoffe zurückzuführen ist; diese Stoffe können mit Wasser bei 100° unter CO_2 -Abspaltung hydrolysiert werden. Da eine Neubildung der CO_2 -abspaltenden Stoffe bei Sauerstoffabschluß nicht stattfindet, so ist die Annahme gerechtfertigt, daß die anaerobe CO_2 -Produktion des Preßsaftes mit der primären Spaltung des Atmungsmaterials nichts zu tun hat; letztere kommt im Champignon auf eine vollkommen eigenartige Weise zustande. Im gewöhnlichen Falle der Zucker-*veratmung* wird die Bildung der Acceptoren aus dem Reservematerial durch Gärungsfermente bewirkt, welche bei Sauerstoffabschluß eine Spaltung des Zuckers zu Kohlensäure und Äthylalkohol hervorrufen. In *Psalliota campestris* wird Äthylalkohol nicht produziert und die anaerob gebildete Kohlensäure entstammt einer Spaltung dissoziationsfähiger Stoffe,

welche nur bei Sauerstoffzutritt, folglich nur unter Mitwirkung von Oxydationsvorgängen entstehen können. Die primäre Spaltung des Atmungsmaterials vom Champignon vollzieht sich ohne CO_2 -Produktion.

Bei Sauerstoffzutritt ist der größte Teil der vom Preßsaft produzierten Kohlensäure auf Oxydationsvorgänge zurückzuführen. Diese CO_2 liefernden Oxydationsvorgänge unterscheiden sich von denjenigen der meisten höher organisierten Pflanzen in der Beziehung, daß sie durch kurzdauerndes Erwärmen auf 100° nicht eingestellt werden. Es wäre von Interesse, zu untersuchen, ob die in den Hutpilzen allgemein verbreitete Tyrosinase an der CO_2 -Bildung des Preßsaftes beteiligt ist. Tyrosinase ist nach den Angaben von Bourquelot und Bertrand¹⁾ ein stark oxydierender Faktor, welcher Tyrosin und andere Phenolderivate in braune und schwarzbraune Pigmente umwandelt. Nach Gonnermann²⁾ entstehen diese Farbstoffe aus Homogentisinsäure, die, seiner Meinung nach, als erstes Oxydationsprodukt des Tyrosins anzusehen ist. Auch Bertel³⁾ glaubte eine Oxydation von Tyrosin zu Homogentisinsäure in Wurzelspitzen von *Vicia Faba* beobachtet zu haben. Die Angaben der genannten Forscher wurden jedoch durch die späteren Untersuchungen von Schulze,⁴⁾ Schulze und Castoro⁵⁾ und Grafe⁶⁾ nicht bestätigt. Bei Umwandlung von Tyrosin in Homogentisinsäure muß eine CO_2 -Abspaltung stattfinden.

Folgende Versuche haben den Zweck, zu erforschen, ob die Farbstoffbildung in Champignon von CO_2 -Produktion begleitet ist. Nachdem Palladin⁷⁾ die allgemeine Verbreitung

¹⁾ Bourquelot et Bertrand, Journ. de pharm. et de chimie (6), Bd. III, S. 177 (1896) und Bullet. de la société mycol. de France, Bd. XVIII, S. 27 (1896); Bertrand, Comptes rendus, Bd. CXXIII, S. 463 (1896).

²⁾ Gonnermann, Pflügers Archiv, Bd. LXXXII, S. 289 (1900).

³⁾ Bertel, Botan. Berichte, Bd. XX, S. 454 (1902).

⁴⁾ Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 508 (1907).

⁵⁾ Schulze u. Castoro, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 396 (1906).

⁶⁾ Grafe, Österreichisch-Ungar. Zeitschrift f. Zuckerindustrie und Landwirtschaft, S. 1 (1908).

⁷⁾ Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 207 (1908); Botan. Berichte, Bd. XXVIa, S. 378 und 389 (1908) und Bd. XXVII, S. 101 (1909).

der leicht oxydierbaren Chromogene in verschiedenen Pflanzen hervorgehoben hat, scheint es von Interesse zu sein, die Rolle der genannten Stoffe in den die Pflanzenatmung begleitenden Stoffumwandlungen womöglich aufzuklären. Sind diese Chromogene nichts anderes als die letzten intermediären Produkte der Atmung, so muß die Farbstoffbildung unter CO_2 -Abspaltung erfolgen.

Zuerst wurde die Oxydation des Tyrosins untersucht. Nach den Untersuchungen von Abderhalden und Rilliet¹⁾ ist im Saft von *Psalliotia campestris* keine Spur von Tyrosin vorhanden. Der Preßsaft spaltete die zugesetzten tyrosinhaltigen Peptide ohne Tyrosinbildung; das bei der Hydrolyse der Peptide entstandene Tyrosin wurde also bei den Oxydationsvorgängen abgebaut. Die Abwesenheit des Tyrosins im Preßsaft konnte ich insofern bestätigen, als der entweißte, mit Bleiacetat entfärbte und mit Schwefelwasserstoff entbleite Saft keine der für Tyrosin charakteristischen Farbenreaktionen lieferte. Ist nun die Tyrosinoxidation von CO_2 -Bildung begleitet, so muß ein Zusatz von Tyrosin zu dem Preßsaft eine Steigerung der CO_2 -Produktion bei Luftzutritt hervorrufen.

Versuch 13.

Zwei Saftportionen A und B zu je 450 ccm. Portion A wurde mit 5 g Natriumfluorid, Portion B mit 5 g Natriumfluorid und 0,75 g Tyrosin versetzt. Dann wurden beide Portionen während 24 Stunden im Luftstrome belassen. Es wurden folgende CO_2 -Mengen erhalten.

1. Nach 5 Stunden:	A (Kontroll) CO_2 = 110,0 mg
	B (Tyrosin) > = 117,2 >
2. Nach weiteren 19 Stunden:	A (Kontroll) > = 166,2 >
	B (Tyrosin) > = 94,0 >
	Summe: A (Kontroll) CO_2 = 276,2 mg
	> B (Tyrosin) > = 211,2 >

Am Ende des Versuches war die Tyrosinportion bedeutend dunkler gefärbt als die Kontrollportion; letztere hat aber eine

¹⁾ Abderhalden und Rilliet, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 395 (1908).

größere CO_2 -Menge produziert. Durch Zusatz von Tyrosin wurde also die CO_2 -Produktion abgeschwächt; es scheint, daß die Tyrosinoxydation einen Teil der oxydierenden Faktoren in Anspruch genommen hat, wodurch die Oxydation der CO_2 -liefernden Stoffe herabgesetzt wurde.

Versuch 14.

Frische Pilze wurden in dünne Scheiben zerschnitten, in eine dickwandige Flasche hineingetan und mit konzentriertem Glycerin übergossen. Glycerin hat sich sofort braunrot gefärbt. Die Flasche wurde evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt; hierdurch wurden die Pilze mit Glycerin injiziert und zu Boden versenkt; gleichzeitig hat sich Glycerin auf einmal entfärbt. Die mit Wasserstoff gefüllte Flasche wurde unter öfterem Umschütteln während 24 Stunden stehen gelassen, dann wurde der Glycerinauszug in das fünffache Volumen von 95%igem Alkohol geseiht, der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Alkohol, dann mit Äther ausgewaschen, im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet und schließlich zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Präparat hat die Eigenschaft, Tyrosin in schwarzbraune Pigmente zu verwandeln. 0,85 g Präparat wurden mit 150 ccm destilliertem Wasser und 0,1 g Tyrosin versetzt und während 20 Stunden im Luftstrome belassen. Am Ende des Versuches war die Flüssigkeit schwarzgrau gefärbt und hat eine große Menge von schwarzen Flocken abgeschieden, aber keine Spur Kohlensäure produziert; das Gewicht des eingeschalteten Geisslerschen Apparates blieb unverändert. Der Inhalt des Versuchskolbens wurde alsdann im Kohlensäurebestimmungsapparate ohne Säurezusatz zum Sieden gebracht; hierbei wurde aber ebenfalls keine Spur CO_2 erhalten.

Versuch 15.

Ein auf die vorstehend beschriebene Weise aus einer anderen Pilzernte erhaltenes Präparat wurde in zwei gleiche Portionen A und B zu je 0,775 g geteilt. Portion A wurde mit 150 ccm destilliertem Wasser, Portion B mit 150 ccm destilliertem Wasser und 0,1 g Tyrosin versetzt. Luftstrom im Verlaufe von 24 Stunden. Die Kontrollportion A hat sich

kaum gelblich gefärbt, die mit Tyrosin versetzte Portion B hat eine große Menge von schwarzen Flocken abgeschieden, aber keine Spur CO_2 geliefert.

Aus obigen Versuchen ist ersichtlich, daß die Verarbeitung von Tyrosin zu den schwarzbraunen Farbstoffen ohne CO_2 -Produktion zustandekommt. Die in den abgetöteten Pilzen entstehenden Farbstoffe, welche, allem Anschein nach, nicht aus Tyrosin gebildet werden, sind an der CO_2 -Produktion ebenfalls nicht beteiligt. In dieser Beziehung sind Versuche mit erfrorenen Pilzen besonders überzeugend. Die von Palladin¹⁾ beschriebene Methode der Abtötung der Pflanzen durch niedere Temperatur läßt sich mit gutem Erfolg auf Champignon anwenden. Die durch eine 24 Stunden dauernde Temperaturerniedrigung auf -15° bis -20° C. getöteten Pilze sind immer hart gefroren und mit Eiskristallen bedeckt. Nach dem Auftauen färbt sich das weiße Versuchsmaterial zuerst braunrot, dann dunkelbraun, schließlich aber vollkommen schwarz; die Pilze werden schlaff und scheiden eine bedeutende Menge von Saft, der sich ebenfalls braun und später schwarz färbt, aus. Bei Sauerstoffabschluß bleiben aber sowohl die Pilze, als der von denselben abgeschiedene Saft ganz farblos. Werden die braunrot gefärbten Pilze eine Zeitlang im Wasserstoffstrome belassen, so tritt vollkommene Entfärbung ein, die aber nicht mehr zu erzielen ist, falls die Oxydation bis zur Bildung von dunkelbraunen bezw. schwarzen Farbstoffen vorgeschritten war.

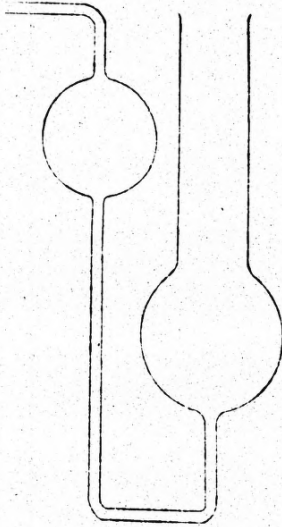
Aus folgenden Versuchen wird ersichtlich werden, daß weder die Oxydation der Chromogene, noch die Reduktion der Farbstoffe mit der CO_2 -Produktion zusammenhängt. Der allgemeine Verlauf der CO_2 -Abscheidung der durch Erfrierung abgetöteten Pilze ist demjenigen der CO_2 -Abscheidung der Preßsäfte vollkommen analog, wie es aus dem folgenden Versuche zu ersehen ist.

Versuch 16.

Frische ausgelesene Pilze wurden in kleine Stücke zerschnitten und in zwei gleiche Portionen zu je 70 g geteilt.

¹⁾ Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 407 (1906).

Beide Portionen wurden nach den Angaben von Palladin¹⁾ erfroren und dann in die auf der Abbildung dargestellten Rezipienten möglichst schnell eingefüllt. Der größte Teil der kugelförmigen Erweiterung des weiten Rohres wurde mit Glaswolle gefüllt, das Versuchsmaterial auf die Glaswolle gelegt und in die obere Öffnung des weiten Rohres ein Kautschuk-



stopfen mit Glasrohr eingepreßt. Der von den Pilzen während des Versuches abgeschiedene Saft gelangte durch die Glaswolle in das untere Rohr, welches Toluol enthielt; das Versuchsmaterial befand sich fortwährend in einem mit Toluoldampf gesättigten Gasmedium. Portion A wurde im Luftstrome, Portion B im Wasserstoffstrome belassen. Für die CO₂-Bestimmungen wurden Pettenkofersche Röhren mit titriertem Barytwasser verwendet. Auf den Titer des Barytwassers hat Toluol keinen Einfluß.

Portion A (Luftstrom).

Zeit in Stunden	CO ₂ in mg	CO ₂ in mg pro 1 St.
2	30,0	15,0
24	127,6	5,3
1½	3,2	1,1
Summe 27½	160,8	—

Portion B (Wasserstoffstrom).

Zeit in Stunden	CO ₂ in mg	CO ₂ in mg pro 1 St.
2	26,0	13,0
8½	33,6	4,0
17	7,8	0,5
Summe 27½	67,4	—

Portion A hat sich tiefbraun gefärbt; Portion B ist vollkommen weiß geblieben. Jetzt wurde Portion A im Wasserstoffstrome, Portion B aber im Luftstrome während 24 Stunden belassen.

¹⁾ Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 407 (1906).

Portion A (H ₂ -Strom)		Portion B (Luftstrom)	
Zeit	CO ₂ in mg	Zeit	CO ₂ in mg
24 Stunden	18,8	24 Stunden	37,2

Portion A hat sich im Wasserstoffstrome etwas entfärbt und ist hellbraun geworden. Portion B hat im Luftstrome binnen kurzer Zeit eine vollkommen schwarze Färbung angenommen. Dieser Versuch zeigt, daß die CO₂-Produktion erfrorener Pilze im Luftstrome bedeutend ausgiebiger ist, als im Wasserstoffstrome; im letzteren Falle ist der größte Teil der produzierten Kohlensäure in den anfänglichen Stunden der Wasserstoffdurchleitung gebildet worden. Ganz analoge Vorgänge waren auch an dem Preßsaft wahrgenommen worden.

Obschon die Wasserstoffportion vollkommen weiß geblieben war, hat sie alsdann bei Sauerstoffzutritt trotz energischer Farbstoffbildung eine im Vergleiche zu der Gesamtmenge von CO₂ der Luftportion A nur unbedeutende CO₂-Menge gebildet; die im primären Spaltungsprozesse gebildeten Acceptoren haben sich wahrscheinlich bei Sauerstoffabschluß umgelagert und die Oxydation wurde auf andere Bahnen gelenkt, wobei sie nicht bis zur Kohlensäurebildung schritt, die Neubildung der normalen Acceptoren war aber wegen des Verbrauches der hierzu notwendigen Faktoren stark herabgesetzt. Folgender Versuch zeigt in überzeugender Weise, daß die Farbstoffbildung und die Farbstoffreduktion mit der CO₂-Bildung nicht zusammenhängen.

Versuch 17.

Zwei Portionen zerkleinerter Pilze zu je 50 g wurden durch Erfrierung abgetötet und in die Rezipienten hineingetan. Portion A befand sich fortwährend im Luftstrome, Portion B abwechselnd im Luft- und Wasserstoffstrome. Antisepticum Toluol. Für die CO₂-Bestimmungen wurden Pettenkofersche Röhren verwendet. Die Resultate des Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Die Ergebnisse von diesem Versuche zeigen, daß durch Farbstoffbildung und nachfolgende Entfärbung die CO₂-Produktion nicht befördert, sondern im Gegenteil unterdrückt wird. Die im Wasserstoffstrome schnell entfärbte Portion B hat sich

	Zeit in Stunden	Portion A (CO ₂ -Bildung) in mg	Portion B	
			CO ₂ -Bildung in mg	Farbenumschlag
I.	1	Luftstrom = 70,0	Luftstrom = 20,8	Braunrotfärbung
	1		H ₂ -Strom = 13,6	Entfärbung
	1 1/2		Luftstrom = 15,2	Braunrotfärbung
	1 1/2		H ₂ -Strom = 8,8	Entfärbung
	Summe 5 Stund.	CO ₂ = 70,0 mg	mg CO ₂ = 58,4	—
II.	2	Luftstrom = 23,6	Luftstrom = 9,2	Dunkelbraun
	2		H ₂ -Strom = 8,4	Hellbraun
	Summe 4 Stund.	CO ₂ = 23,6 mg	mg CO ₂ = 17,6	—
III.	15 Stunden	Luftstrom = 35,2	Luftstrom = 27,6	Schwarzbraun
IV.	4 1/2 >	> = 6,0	> = 5,2	>
V.	4 1/2 >	H ₂ -Strom = 5,6	—	—

alsdann bei Luftzutritt wiederum braun gefärbt, lieferte aber hierbei eine geringere CO₂-Menge (auf Zeiteinheit berechnet), als die fortwährend im Luftstrom belassene Kontrollportion A. Dieser Unterschied ist nicht etwa dem Umstande zuzuschreiben, daß die oxydierenden Faktoren bei Sauerstoffabschluß mit größerer Geschwindigkeit zerstört werden, denn nach 15stündiger konstanter Luftdurchleitung sind die Geschwindigkeiten der CO₂-Produktion beider Portionen wieder gleich geworden. Es liegt also die Annahme nahe, daß bei Sauerstoffabschluß Nebenprodukte entstehen, die ohne CO₂-Abspaltung, wohl aber unter Farbstoffbildung oxydiert werden und hierbei einen bedeutenden Teil der oxydierenden Faktoren in Anspruch nehmen.

Die Gesamtheit der vorstehend beschriebenen Versuche beweist, daß die Farbstoffbildung einen ohne CO₂-Produktion stattfindenden Oxydationsprozeß vorstellt. Die CO₂ liefernden Vorgänge von Champignon sind im wesentlichen auf eine Oxydation der ohne CO₂-Abspaltung entstehenden Acceptoren zurückzuführen. Diese Oxydation schreitet bis zur CO₂-Bildung; außerdem entstehen hierbei unbeständige Verbindungen, welche

durch einfache Spaltung, also ohne Mitwirkung der Oxydation, Kohlensäure liefern. Diese Spaltung kann durch Hydrolyse mit Wasser bei 100° herbeigeführt werden.

Nun taucht die Frage auf, welche Stoffe auf eine so eigenartige Weise verarbeitet werden. Die Voraussetzung, daß nur Eiweißstoffe als Atmungsmaterial dienen, ist wenig wahrscheinlich, denn eine bis zur CO₂-Bildung schreitende Oxydation findet im Preßsaft auch nach Abscheiden der Eiweißstoffe statt. Auch ist dem Umstande Rechnung zu tragen, daß unter den Spaltungsprodukten des Eiweißes am leichtesten oxydierbares Tyrosin nicht zu CO₂ verbrannt werden kann. Eine Veratmung der Kohlenhydrate ist ebenfalls wenig wahrscheinlich, da lösliche Zucker im Preßsaft nicht vorhanden sind, einer Oxydation der unlöslichen komplizierten Kohlenhydrate sollte aber jedenfalls eine Hydrolyse unter Bildung von löslichen Monosen oder Biosen vorangehen. Doch lieferten sämtliche von mir untersuchten Preßsäfte weder Reaktion mit Fehling'scher Lösung, noch Furfurolreaktion. Nach den Angaben von Müntz¹⁾ ist auch die sonst in Hutpilzen ziemlich verbreitete Trehalose im Champignon nicht vorhanden; diese Beobachtung habe ich vollkommen bestätigt. Zum Nachweis der Trehalose habe ich enteweißte und entfärbte Preßsäfte mit konzentrierter Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5% versetzt und den Anweisungen von Winterstein²⁾ gemäß 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht; dann wurde Schwefelsäure mit Baryt quantitativ gefällt, der Saft filtriert und mit Fehling'scher Lösung geprüft. Bei der Hydrolyse wird Trehalose quantitativ in d-Glukose übergeführt, da aber auch die in vorstehend beschriebener Weise mit Schwefelsäure gekochten Preßsäfte CuO nicht reduzierten, so wurde hierdurch die Abwesenheit von Trehalose im Champignon festgestellt.

Der Einwand, daß der eben gebildete Zucker sofort weiter verarbeitet wird, ist nicht stichhaltig, da bei einem derartigen Zuckerhunger eine Steigung der CO₂-Produktion des Preß-

¹⁾ Müntz, *Annales de chimie et de physique* (5), Bd. VIII, S. 56 (1876).

²⁾ Winterstein, *Chem. Berichte*, Bd. XXVI, S. 3094 (1893).

saftes nach Zuckergabe zu erwarten wäre. In meinen früher veröffentlichten Versuchen¹⁾ habe ich dargetan, daß bei Sauerstoffabschluß der Zuckerzusatz erst nach längerer Zeit einen unbedeutenden Einfluß auf die CO₂-Produktion ausübt; dieser Einfluß ist offenbar als eine Nebenwirkung anzusehen. Folgender Versuch beweist, daß auch bei Sauerstoffzutritt keine Beförderung der CO₂-Produktion durch Zuckergabe hervorgerufen wird.

Versuch 18.

2 gleiche Portionen des Preßsaftes zu je 125 ccm. Portion A wurde mit 15 ccm Toluol, Portion B mit 15 ccm Toluol und 10 g krystallinischem Traubenzucker versetzt. Für die CO₂-Bestimmungen wurden Pettenkofersche Röhren verwendet. Im Verlaufe von 18 Stunden wurden folgende CO₂-Mengen im Luftstrome gebildet.

1. Nach 5 Stunden:	A (Kontroll)	CO ₂ = 53,2 mg
	B (Traubenzucker)	» = 52,8 »
2. Nach weiteren 13 Stunden:	A (Kontroll)	» = 24,4 »
	B (Traubenzucker)	» = 28,0 »

Von den übrigen stickstofffreien Verbindungen ist nur d-Mannit im Champignon reichlich vorhanden. Es ist wohl möglich, daß Mannit bei der Atmung verarbeitet wird, obwohl nicht auf die Art und Weise, wie sich Müntz²⁾ die Mannit-spaltung bei Sauerstoffabschluß vorstellte. Die ersten Versuche, bei denen Preßsäfte mit natürlichem Mannit versetzt worden waren, ergaben folgende Resultate.

Versuch 19.

Zwei gleiche Saftportionen zu je 250 ccm. Portion A wurde mit 2,5 g Natriumfluorid, Portion B mit 2,5 g Natriumfluorid und 15 g Mannit versetzt. Luftstrom während 22 Stunden.

1. Nach 2 Stunden:	A (Kontroll)	CO ₂ = 59,6 mg
	B (Mannit)	» = 55,2 »
2. Nach weiteren 3 Stunden:	A (Kontroll)	» = 38,0 »
	B (Mannit)	» = 38,8 »
3. Nach weiteren 17 Stunden:	A (Kontroll)	» = 41,6 »
	B (Mannit)	» = 28,4 »

¹⁾ Kostytschew, Botan. Berichte, Bd. XXVIa, S. 167 (1908).

²⁾ Müntz, Annales de chimie et de physique (5), Bd. VIII, S. 56 (1876).

Versuch 20.

Der Preßsaft wurde in zwei gleiche Portionen A und B zu je 125 ccm geteilt. Portion A wurde mit 15 ccm Toluol, Portion B mit 15 ccm Toluol und 10 g Mannit versetzt. Beide Portionen wurden während 19 Stunden im Wasserstoffstrome und alsdann noch 6 Stunden im Luftstrome belassen.

1. Nach 5 Stunden im Wasserstoffstrome:

A (Kontroll) $\text{CO}_2 = 40,0$ mg.

B (Mannit) „ = 34,4 „

2. Nach weiteren 14 Stunden im Wasserstoffstrome:

A (Kontroll) $\text{CO}_2 = 26,4$ „

B (Mannit) „ = 24,0 „

3. Nach 6 Stunden im Luftstrome:

A (Kontroll) „ = 10,0 „

B (Mannit) „ = 8,8 „

Beide Versuche zeigen, daß ein Zusatz von Mannit die CO_2 -Produktion des Preßsaftes nicht befördert. Dieses Ergebnis ist aber leicht erklärlich. Der Preßsaft enthält eine große Menge von Mannit; ein Zusatz des ohnehin im Überschusse vorhandenen Atmungsmaterials muß entweder ohne jede Wirkung bleiben, oder gar die CO_2 -Produktion unter Umständen beeinträchtigen, wie ich es z. B. schon längst an Schimmelpilzen beobachtet habe.¹⁾ Es muß also eine andere Methode für den Nachweis der Mannitveratmung angewendet werden. In den nunmehr folgenden Versuchen habe ich, behufs Lösung der Frage, ob in abgetöteten Pilzen Mannitverbrauch stattfindet, quantitative Mannitbestimmungen ausgeführt. Untersuchungen dieser Art wurden noch niemals vorgenommen, einige Forscher setzen sogar voraus, daß Mannit in Hutpilzen nicht als Atmungsmaterial, sondern im Gegenteil als ein Produkt der Atmung anzusehen ist.

Die Mannitbestimmungen habe ich an den durch niedere Temperatur getöteten Pilzen ausgeführt, da diese eine im Vergleich zu dem Preßsaft relativ größere CO_2 -Menge abscheiden: während der ersten Stunde der Luftdurchleitung steht die Geschwindigkeit der CO_2 -Abscheidung erfrorener Pilze derjenigen

¹⁾ Kostytschew, Botan. Berichte, Bd. XX, S. 327 (1902).

lebender Pilze wenig nach, wie es aus dem nachstehenden Versuche zu ersehen ist. Die ausgiebige CO_2 -Abscheidung muß aber mit einem entsprechend starken Verbräuche des Atmungs-materials zusammenhängen.

Die Mannitbestimmungen wurden auf folgende Weise ausgeführt. Das Versuchsmaterial wurde mit Quarzsand zerrieben und während einer Stunde mit 70 %igem Alkohol im Wasserbade am Rückflußkühler gekocht, der Alkoholextrakt filtriert, der Rückstand mit frischem Alkohol noch einmal ausgekocht, abfiltriert und mit heißem, 70 %igem Alkohol ausgewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden abdestilliert, der alkoholfreie Rückstand vollkommen eingedampft, dann in heißem Wasser gelöst, mit gereinigter Tierkohle gekocht, die Tierkohle abfiltriert und mit heißem Wasser mehrmals ausgewaschen, das Filtrat mit dem Waschwasser vereinigt und aufs Trockene eingedampft. Auf diese Weise erhielt ich einen Sirup, aus welchem Mannit mit heißem, 95 %igem Alkohol ausgezogen wurde. Die vollkommene Abtrennung eines alkohollöslichen Chromogens bereitete große Schwierigkeiten: es erwies sich als unerlässlich, das Mannit durch Abkühlung des Alkoholauszugs möglichst schnell in feinkrystallinischer Form abzuscheiden. Diese erste Portion wurde alsdann durch zweimaliges Umkrystallisieren gereinigt. Die vereinigten Mutterlaugen wurden aufs Trockene eingedampft und lieferten nach Wiederholung der soeben beschriebenen Operationen eine zweite Portion von Mannit. Dann wurde die Mutterlauge wiederum eingedampft, in Wasser gelöst, mit Tierkohle gereinigt, verdampft und mit heißem Alkohol aufgenommen, wodurch noch einige Milligramm Mannit gewonnen wurden. Diese Methode ist freilich mit einem Verlust an Mannit verbunden, es wurde aber beim Verarbeiten sämtlicher Portionen des Versuchsmaterials immer auf genau dieselbe Weise vorgegangen; infolgedessen dürfen die Resultate als wohl vergleichbar erscheinen. Sind aber andererseits die schweren sirupösen Bestandteile des Alkoholauszuges nicht vollkommen entfernt, so können hierdurch die Resultate total entstellt werden.

Versuch 21.

I. 62 g frische, ausgelesene Pilze wurden in den vorstehend abgebildeten Rezipienten hineingetan und während zwei Stunden im Luftstrome belassen.

Nach der ersten Stunde: $\text{CO}_2 = 32,0 \text{ mg}$
 „ „ zweiten „ : „ = 30,4 „

II. Frische, ausgelesene Pilze wurden zerschnitten und in zwei Portionen A und B zu je 62 g geteilt. Portion A wurde erfroren und dann im Verlaufe von 48 Stunden im Luftstrome belassen, Antisepticum Toluol.¹⁾ Für die CO_2 -Bestimmungen wurden Pettenkofersche Röhren benutzt. Nach Beendigung der Luftdurchleitung wurde das Versuchsmaterial für die Mannitbestimmung verwendet. Portion B wurde ohne vorangehende Luftdurchleitung für die Mannitbestimmung verwendet und diente somit als Kontrollportion.

Portion A.

a) CO_2 -Bestimmungen:

1.	Luftstrom im Verlaufe von 1 Stunde	: $\text{CO}_2 = 22,0 \text{ mg}$
2.	„ „ „ „ 3 Stunden	: „ = 42,4 „
3.	„ „ „ „ 5 „	: „ = 45,2 „
4.	„ „ „ „ 39 „	: „ = 78,0 „
5.	„ „ „ „ 1 Stunde	: „ = 0,0 „

Gesamtmenge von $\text{CO}_2 = 187,6 \text{ mg}$

b) Mannitbestimmung: $\text{CH}_2\text{OH} \cdot (\text{CHOH})_4 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 0,340 \text{ g}$.

Portion B (Kontrollportion).

Mannitbestimmung: $\text{CH}_2\text{OH} \cdot (\text{CHOH})_4 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 0,651 \text{ g}$.

Im Verlaufe von 48 Stunden wurde also 0,311 g Mannit von der Portion A verbraucht.

Versuch 22.

Frische, ausgelesene Pilze wurden zerschnitten und in drei gleiche Portionen A, B und C zu je 70 g geteilt. Nach dem Erfrieren wurde Portion A 26½ Stunden im Luftstrome, Portion B aber im Wasserstoffstrome mit einem Überschuß von Toluol belassen. Für die CO_2 -Bestimmungen wurden Pettenkofersche Röhren benutzt. Nach Beendigung der Gas-

¹⁾ Es wurde ein großer Überschuß von Toluol verwendet und das Versuchsmaterial wurde außerdem mit Toluol getränkt.

durchleitung wurden beide Portionen für die Mannitbestimmungen verwendet. Die Kontrollportion C wurde ohne vorangehende Gasdurchleitung für die Mannitbestimmung verwendet.

CO₂-Bestimmungen:

Portion A (Luftstrom).	Portion B (H ₂ -Strom).
Nach 2 ¹ / ₂ Stunden:	Nach 2 ¹ / ₂ Stunden:
CO ₂ = 43,6 mg	CO ₂ = 36,4 mg
Nach weiteren 24 St.:	Nach weiteren 24 St.:
CO ₂ = 103,2	CO ₂ = 41,2
Gesamtmenge von CO ₂ = 146,8 mg	Gesamtmenge von CO ₂ = 77,6 mg

Mannitbestimmungen:

Portion A (Luftstrom)	CH ₂ OH · (CHOH) ₄ · CH ₂ OH = 0,342 g
» B (H ₂ -Strom)	» = 0,335 »
» C (Kontroll)	» = 0,643 »
	Mannitverbrauch von A = 0,301 »
	» B = 0,308 »

Die beiden vorstehenden Versuche zeigen, daß in erfrorenen Pilzen ein beträchtlicher Mannitverbrauch stattfindet. Beachtenswert ist der Umstand, daß sowohl bei Sauerstoffzutritt als bei Sauerstoffabschluß gleiche Mannitmengen verschwinden, obwohl die CO₂-Produktion bei Sauerstoffabschluß bedeutend geringer ist, als bei Sauerstoffzutritt. Dies deutet darauf hin, daß die primäre Mannitzersetzung ohne CO₂-Abspaltung zustande kommt, was mit den vorstehend dargelegten Betrachtungen über die Herkunft der bei Sauerstoffabschluß gebildeten Kohlensäure in vollem Einklange steht. Die Frage nach den Produkten der Mannitspaltung bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten; an dieser Stelle mag nur erwähnt werden, daß ich eine Bildung von zyklischen Verbindungen für wahrscheinlich halte. Für die Kenntnis der bei der Atmung von *Champignon* stattfindenden Stoffumwandlungen dürfte es von Interesse sein, daß bei den anaeroben Spaltungsprozessen organische Säuren nicht gebildet werden; dies ist übrigens von vornherein naheliegend, denn niemals habe ich saure Reaktion der Preßsäfte wahrgenommen. Folgender Versuch zeigt, daß in lebenden Pilzen bei Sauerstoffabschluß keine nennenswerten Mengen von organischen Säuren entstehen.

Versuch 23.

I. Kontrollportion. 705 g frische ausgelesene Pilze wurden mit etwas Quarzsand zerrieben, mit 3 l destilliertem Wasser versetzt und 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht. Der rote, gegen Lackmus und Kongorot neutrale Extrakt wurde filtriert und in drei Portionen A, B und C geteilt.

Portion A wurde zum Nachweis der flüchtigen Säuren verwendet; sie wurde auf dem Wasserbade stark eingeeengt, von dem entstandenen schleimigen Niederschlage mittels Filtration befreit, mit einem Überschuß von Schwefelsäure versetzt und unter Wasserdampfdurchleitung abdestilliert. Das schwach sauer reagierende Destillat enthielt, den Reaktionen zufolge, eine unbedeutende Menge von Ameisensäure; diese wurde durch Kochen mit Quecksilberoxyd zerlegt, das Unlösliche abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelsäure versetzt und nochmals unter Wasserdampfdurchleitung abdestilliert. Das Destillat war diesmal neutral. Von den flüchtigen Säuren enthielt also das Versuchsmaterial nur eine Spur Ameisensäure in Form von Formiaten.

Portion B wurde mit basischem Bleiacetat versetzt, der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff entbleit und Bleisulfid abfiltriert. Die erhaltene Lösung enthielt eine bedeutende Menge von Phosphorsäure, neben welcher nur Spuren von Äpfelsäure und Weinsäure vorhanden waren. Die für andere Pflanzensäuren charakteristischen Reaktionen ergaben negative Resultate. Für eine Isolierung war die Menge der Weinsäure bzw. der Äpfelsäure zu gering.

Portion C wurde mit Schwefelsäure versetzt und während 24 Stunden im Apparate von Kutscher und Steudel¹⁾ mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde auf Milchsäure geprüft. Der Äther wurde abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgelöst, mit Bleihydroxyd gekocht, heiß filtriert, mit Schwefelwasserstoff entbleit, Bleisulfid abfiltriert, das Filtrat mit Zink-

¹⁾ Kutscher und Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 473 (1903).

carbonat gekocht, filtriert, eingedampft und in aller Ruhe belassen. Hierbei hat sich aber gar nichts auskrystallisiert; es war also höchstens nur eine Spur von Milchsäure im Versuchsmaterial vorhanden.

II. Wasserstoffportion. 1145 g ausgelesenes Pilmaterial wurde 25 Stunden im Wasserstoffstrom belassen, dann auf genau dieselbe Weise verarbeitet wie die Kontrollportion, wobei ebenfalls nur Spuren von Ameisensäure, Weinsäure und Äpfelsäure nachgewiesen werden konnten. Es ist also ersichtlich, daß organische Säuren bei den anaeroben Stoffumwandlungen von *Psalliota campestris* nicht gebildet werden.

Die in dieser Mitteilung beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die Verarbeitung des Atmungsmaterials im Champignon sehr eigenartig verläuft und von den sich bei Zuckeratmung abspielenden Vorgängen durchaus verschieden ist. Die physiologische Oxydation des Betriebsmaterials wird also je nach der Natur der zu oxydierenden Stoffe auf verschiedene Art und Weise herbeigeführt. Es kann wohl nicht bezweifelt werden, daß auch andere mannitführende Hutpilze, welche ihre Betriebsenergie ganz oder teilweise nicht auf Kosten von Zuckerarten entwickeln, Stoffumwandlungen bewirken, die denjenigen von Champignon vollkommen analog sind.
