

körper zu prüfen; namentlich bei der Isolirung von Peptonen und anderen intermediären Spaltungsproducten der Proteinkörper verspricht sie, gute Dienste zu leisten. Ferner ist damit begonnen worden, mit Hilfe der Carbaminoreaction Proteinabkömmlinge aus dem Harn zu isoliren.

66. A. Ulander und B. Tollens: Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten¹⁾.

[Mitgetheilt von B. Tollens.]
(Eingegangen am 16. Januar 1906.)

I. Allgemeines²⁾.

Ueber die Bestandtheile der Flechten, d. h. der symbiontischen Combinationen von Pilzhypphen mit Algen, ist seit lange vielfach gearbeitet worden, doch sind, wenigstens in der neueren Zeit, (s. Zopf, Hesse u. A.) mehr die in geringer Menge vorhandenen sog. »Flechtensäuren« berücksichtigt worden als die Kohlenhydrate der Flechten, welche die Hauptmenge der Substanz der Flechten ausmachen.

Von den Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten sind die älteren von Rochleder und Held sowie von Knop und Schnedermann über das »isländische Moos«, *Cetraria islandica*, und das »Rennthiermoos«, *Cladonia rangiferina*, ferner besonders die Arbeiten von Hönig und Schubert über das Lichenin aus dem »isländischen Moos« und diejenigen von Stüde über das Everniiin aus der Flechte *Evernia prunastri* hervorzuheben.

In neuerer Zeit ist von Escombe³⁾ eine grössere Arbeit über die »Chemie der Membranen der Flechten und Pilze« erschienen, und ganz vor kurzem (Juli 1905) und nach Beendigung dieser Arbeit hat Karl Müller⁴⁾ eine ausgedehnte Untersuchung über »die chemische Zusammensetzung der Zellmembranen bei verschiedenen Kryptogamen« veröffentlicht, in welcher die Kohlenhydrate auch der drei oben genannten Flechten näher berücksichtigt sind.

¹⁾ Auszug aus der Inaugural.-Dissertation von Dr. A. Ulander, Göttingen 1905, und einer ausführlicheren Abhandlung in der Zeitschrift d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie.

²⁾ Die Citate dieser Arbeiten findet man in der Dissertation sowie in der ausführlicheren Abhandlung.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 283 [1896]

⁴⁾ Zeitschrift f. physiol. Chem. 45, 264 [1905].

Ferner ist 1898 von v. Wisselingh¹⁾ eine grosse botanische Arbeit »Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi« veröffentlicht, in welcher u. a. die Vorkommen von Cellulose und Chitin besprochen werden.

Das »Rennthiermoos« oder die Rennthierflechte, *Cladonia rangiferina*, welche in den nordischen Ländern eine grosse Rolle spielt, ist von Stenberg auf die Fähigkeit, nach Aufschliessung derselben durch Erhitzen mit Säuren, bei der Gährung Spiritus zu liefern, untersucht worden.

Da nun ausser den drei genannten Flechten noch manche andere existiren, welche nicht untersucht worden sind, und auch in den genannten Flechten neben den von den früheren Beobachtern gefundenen Kohlenhydraten noch andere vorkommen können, welche früher in Ermangelung der Fischer'schen Reagentien, der Phenylhydrazine, nicht aufgefunden werden konnten, haben wir die Prüfung einer Reihe von Flechten in dieser Hinsicht unternommen, und zwar haben wir besonders die in Wasser nicht löslichen, aber der Hydrolyse zugänglichen Kohlenhydrate untersucht, wobei wir die voraussichtlich hierbei störend wirkenden Flechtensäuren durch vorheriges Extrahiren des Materiales mit 2-procentigen Lösungen von kohlen-saurem Kalium in Wasser entfernt haben.

Hr. Dr. Ulander hat sieben verschiedene Flechten nebst einem von Algen freien Pilz, *Bulgaria inquinans*, in zum Theil grossen Mengen sich verschafft und die Untersuchungen mit grosser Sorgfalt angestellt.

II. Untersuchungsmethoden.

Die Untersuchungsmethoden sind in der Dissertation und der ausführlicheren Abhandlung genauer geschildert. Hier möge kurz angegeben werden, dass die Flechten (bis je circa $\frac{1}{2}$ kg) mit der Lösung von Kaliumcarbonat einen Tag lang bei gewöhnlicher Temperatur digerirt und dann von der braun gewordenen Lösung durch Abpressen und ein- oder zwei-maliges Digeriren mit Wasser und neues Abpressen befreit wurden.

Darauf wurde der Rückstand eine bis einige Stunden mit Wasser gekocht, um in heissem Wasser lösliche Kohlenhydrate (Lichenin, Evernin etc.) zu extrahiren, welche aus den abgepressten Flüssigkeiten durch Zusatz von Alkohol, unterstützt durch Ausfrieren der Lösungen, ferner durch Digeriren mit Alkohol und schliessliches Trocknen über Schwefelsäure pulverförmig gewonnen wurden.

¹⁾ Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik 31, 619 [1897].

Die Rückstände vom Auskochen mit Wasser wurden der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure unterworfen, indem sie mit 5—6-proc. oder auch, in anderen Fällen, 8-proc. Säure je 6—10 Stunden lang in einem im kochenden Wasser stehenden Porzellantopf erhitzt wurden.

Die dann abgepressten Flüssigkeiten wurden mit gefällttem, möglichst von Magnesiumcarbonat freiem, kohlensaurem Calcium gesättigt, vom Gyps befreit und zum Syrup abgedampft; durch wiederholtes Digestiren mit Alkohol wurden Gummisubstanzen, Reversionsproducte u. s. w. möglichst entfernt¹⁾ und die schliesslich erhaltenen Syrupe auf die darin enthaltenen Glykosen untersucht.

Von diesen Glykosen sind einige, besonders Galactose, zuweilen auch Glucose, theilweise direct auskrystallisirt, aus den Muttersyrupen wurde ein anderer Theil derselben, sowie die nicht direct krystallisirende Mannose mit Hilfe von Phenylhydrazinen gewonnen, worauf sich schliesslich aus den von den Phenylhydrazonen abgesogenen Flüssigkeiten zuweilen noch etwas Bestimmbares abscheiden liess.

Aus dem Mannose-Phenylhydrazon wurde die Mannose²⁾ durch Zerlegen mittels Benzaldehyd nach dem Verfahren von Herzfeld³⁾ und de Wet abgeschieden; sie krystallisirte nach dem Impfen mit einer Spur Mannose regelmässig und leicht. Aus dem Galactose-Methylphenylhydrazon wurde die Galactose nach Ollendorf und Ruff⁴⁾ mittels Formaldehyd gewonnen.

Auf Pentosan und Methylpentosan wurde durch Destillation des ursprünglichen, mit Kaliumcarbonat digerirten Materiales mit Salzsäure von 1.06 spec. Gewicht und Untersuchung der Destillate durch Spectralreactionen und Fällung mit Phloroglucin geprüft. Man muss hierbei stets bedenken, dass das entstandene Furfurol theilweise nicht aus Pentosan zu stammen braucht, weil auch Stärke und andere Kohlenhydrate beim Destilliren mit Salzsäure, wenn auch wenig, doch etwas Furfurol geben können.

¹⁾ Diese Manipulationen sind u. a. in der Abhandlung von Mütter und Tollens (diese Berichte 37, 298 [1904]) näher beschrieben.

²⁾ Es ist zu bemerken, dass Storer (Bulletin of the Bussey Institution), welcher sehr zahlreiche Pflanzen und Pflanzentheile auf Mannose untersucht hat, in dieser Hinsicht nichts über die Flechten angiebt.

³⁾ Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie 45, II, 794 [1895].

⁴⁾ Diese Berichte 32, 3234 [1899].

III. Resultate.

1. Isländisches Moos, *Cetraria islandica*.

Das aus der vorher mit Kaliumcarbonat gereinigten Flechte durch Auskochen mit Wasser, Fällen mit Alkohol u. s. w. gewonnene Lichenin zeigte nach mehrmaligem Auflösen in heissem Wasser und Wiederfällen mit Alkohol keine blaue oder grünliche Färbung mit Jod, es war optisch inactiv und lieferte bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure *d*-Glucose, welche gut auskrystallisirte ($[\alpha]_D = +51.9^\circ$)⁴⁾. Fructose, Mannose und Galactose waren nicht nachzuweisen, wohl aber lieferte die Destillation mit Salzsäure Destillate, welche Furfurol- und Methylfurfurol-Reactionen gaben (entsprechend 2.1 pCt. Pentosan).

Der Rückstand vom Auskochen mit Wasser lieferte bei den 6-stündigen Hydrolysen mit 5- oder 6-procentigen Schwefelsäuren *d*-Glucose ($[\alpha]_D = +51.9^\circ$), ferner *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +14.5^\circ$) und *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +79.6^\circ$), und zwar neben viel Glucose weniger Mannose und Galactose.

Die Glucose krystallisirte zum Theil direct aus dem Syrup, und ein anderer Theil wurde aus den nach dem Ausfällen der Mannose und Galactose gebliebenen Flüssigkeiten ebenfalls krystallisirt gewonnen, indem die Phenylhydrazine durch Ausschütteln mit Aether beseitigt, die Flüssigkeit eingedunstet, der Syrup mit Alkohol vom Gummi befreit und nach dem Wiedereindunsten sich selbst überlassen wurde.

Pentosan und Methylpentosan sind in der *Cetraria* enthalten, denn 2 g derselben lieferten beim Destilliren mit Salzsäure soviel Furfurol und Methylfurfurol, wie 3.5 pCt. Pentosan entspricht.

Fructose gebende Substanz scheint nicht in der *Cetraria* vorhanden zu sein, denn ein aus 20 g derselben mit 2-procentiger Schwefelsäure durch 2-stündiges Erhitzen im Wasserbade gewonnener, dann mit Calciumcarbonat neutralisirter und eingedampfter Auszug gab mit Resorcin und Salzsäure nicht die bekannte Rothfärbung¹⁾.

⁴⁾ Dies stimmt garnicht zu den Angaben von Escombe, welcher angibt, aus Lichenin ein bei 191—192° schmelzendes Osazon erhalten zu haben, und hieraus schliesst, dass Lichenin nicht Glucose, sondern Galactose bei der Hydrolyse liefert (Zeitschr. für physiol. Chem. 22, 294 [1896]). Wohl aber stimmen unsere Resultate mit denen der früheren Beobachter, sowie den von K. Müller (l. c.) neuerdings erhaltenen.

¹⁾ Auch Escombe (Zeitschr. für physiol. Chem. 22, 292 [1896/1897]) fand keine Fructose in der *Cetraria*, aber er stellt auch die Gegenwart der Pentosane in Abrede.

2. Rennthiermoos oder Rennthierflechte, *Cladonia rangiferina* L.

Zwei Modificationen dieser Flechte wurden untersucht, die Hauptvarietät, welche an der Erdoberfläche gleichmässig verbreitet ist, und die als *var. alpestris* unterschiedene, welche zusammenhängende Polster bildet; die Letztere ist wenig mit Holzstückchen etc. verunreinigt, die Erstere muss dagegen durch mühsames Aussuchen von Beimengungen befreit werden.

Beide Varietäten gaben bei den Untersuchungen ganz dieselben Resultate, obgleich Widmann¹⁾ bei der Untersuchung der Flechtensäure aus diesen Varietäten Unterschiede im optischen Verhalten derselben gefunden hat.

Beim Auskochen der (vorher mit Kaliumcarbonat gereinigten) Flechten mit Wasser zeigte sich gegenüber dem Verhalten des isländischen Moores der grosse Unterschied, dass fast garnichts gelöst wurde, der Auszug nicht klebrig war, nicht gelatinirte, und Alkohol kein Lichenin daraus fällte.

Die Hydrolyse mit 6-procentiger Schwefelsäure ging schwerer, als bei der *Cetraria* vor sich, die Flechten zertheilten sich nicht so wie jene, und die Hydrolyse wurde folglich auf 10 oder auch 12 Stunden ausgedehnt.

Im Gegensatz zu der *Cetraria* wurde hier nur sehr wenig Glucose ($[\alpha]_D = +46.3^\circ$), dagegen viel Mannose ($[\alpha]_D = +14.2^\circ$), und zwar mindestens 30 pCt. der Flechte, und auch erheblich Galactose ($[\alpha]_D = +79.9^\circ$) gefunden.

Pentosan und Methylpentosan sind vorhanden (= 1.7 pCt. Pentosan).

3. *Stereocaulon pascale* L.

Diese Flechte ist der Rennthierflechte ähnlich, doch sind ihre Aestchen dicker, sie bildet in Schwedens Kiefernwäldern ausgedehnte Rasen.

In chemischer Hinsicht ist sie ebenfalls der Rennthierflechte sehr ähnlich. Sie giebt an kochendes Wasser nur Spuren Substanz ab, sie hydrolysiert sich ebenso schwer wie die Rennthierflechte. Sie liefert hierbei erheblich *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +14.5^\circ$) und *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +79.9^\circ$); dagegen gelang es nicht, Glucose zu gewinnen.

Pentosan und Methylpentosan sind vorhanden (= 2.7 pCt. Pentosan).

¹⁾ Chem. Centralbl. 1900, I, 424.

4. *Peltigera aptosa* L.

Obgleich diese mit einem blattartigen Thallus versehene Flechte im Habitus recht unähnlich der Rennthierflechte ist, verhält sie sich doch in chemischer Hinsicht jener ganz ähnlich, denn sie giebt an kochendes Wasser fast nichts ab, und sie hydrolysiert sich schwer.

Durch 10-stündiges Erhitzen mit 7-procentiger Schwefelsäure wurden *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +79.2^\circ$) und *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +14.5^\circ$) abgeschieden, dagegen gelang nicht, *d*-Glucose zu gewinnen.

Pentosan und Methylpentosan (= 3 pCt. Pentosan) sind vorhanden.

5. *Evernia Prunastri* L.

Diese an altem Holz, Zäunen, Baumstämmen und besonders an *Prunus*-Arten vorkommende Flechte ist von Stüde¹⁾ vor langer Zeit untersucht worden. Er hat durch Auskochen mit Wasser das dem Lichenin nahestehende Everniin erhalten.

In der That verhält sich die *Evernia* ganz anders als *Cladonia*, *Stereocaulon* und *Peltigera*, welche (stets nach dem Reinigen mit Kaliumcarbonat) an kochendes Wasser kaum etwas abgeben, und sie verhält sich ähnlich dem »isländischen Moos«. 1½ kg *Evernia* gaben Hrn. Dr. Ulander auf die beschriebene Weise durch Auskochen mit Wasser, Fällen mit Alkohol u. s. w. 40 g Everniin als weisgraues Pulver.

Das Everniin liefert bei der Hydrolyse wie das Lichenin Glucose ($[\alpha]_D = +53.8^\circ$), doch daneben jedenfalls auch etwas Galactose, denn beim Behandeln des Everniins mit Salpetersäure entstanden 4.2 pCt. Schleimsäure.

Wie eine übrigens mit Schwierigkeit verknüpfte Polarisation zeigte, ist das Everniin stark rechtsdrehend ($[\alpha]_D = \text{ca.} +138^\circ$) und folglich nicht identisch mit dem Lichenin, welches inactiv ist.

Pentosan und Methylpentosan sind vorhanden (= 3 pCt. Pentosan).

Der Rückstand vom Extrahiren des Everniins liess sich leicht hydrolysiren und lieferte viel *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +79.6'$) und wenig *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +14.5'$).

Pentosan und Methylpentosan (= 3.8 pCt. Pentosan) sind vorhanden. Ein Versuch, Arabinose mittels Diphenylhydrazin zu isoliren, gelang nicht.

¹⁾ Ann. d. Chem. 131, 241.

6. *Usnea barbata* L.

Die Bartflechte, welche überall in Fichtenwäldern vorkommt, ist von Rochleder und Heldt¹⁾ schon untersucht, und die Genannten haben gefunden, dass die *Usnea* viel in heissem Wasser Lösliches enthält und in dieser Hinsicht sich dem isländischen Moos nähert.

Dr. Ulander erhielt aus der durch Kaliumcarbonat gereinigten Flechte durch Auskochen mit Wasser, Fällern mit Alkohol u. s. w. eine sich wie Lichenin verhaltende optisch inactive Substanz, welche bei der Hydrolyse leicht krystallisirte, *d*-Glucose ($[\alpha]_D = +47.4^\circ$) gab, jedoch auch etwas Schleimsäure lieferte. Beim Destilliren mit Salzsäure lieferte dies Usnin erhebliche Mengen Furfurol und Methylfurfurol (= 6.35 pCt. Pentosan, bezw. nach dem Verfahren von Ellett und Tollens²⁾ = 4.95 pCt. Pentosan und 1.66 pCt. Methylpentosan).

Der Rückstand vom Auskochen hydrolysirte sich leicht und gab viel *d*-Glucose, ferner *d*-Mannose und *d*-Galactose.

Dann wurden aus der Flechte Pentosan und Methylpentosan (= 4.67 pCt. Pentosan) erhalten.

7. *Cornicularia aculeata* Sch.

Diese der Rennthierflechte ähnliche, jedoch braunschwarze Flechte verhielt sich der *Cetraria* ähnlich, denn sie lieferte beim Kochen mit Wasser eine klebrige Flüssigkeit, welche beim Erkalten gallertartig wurde, und aus welcher mit Alkohol ein licheninartiges, bei der Hydrolyse *d*-Glucose ($[\alpha]_D = +48^\circ$) gebendes Pulver gewonnen wurde.

Aus der Flechte selbst wurde hydrolytisch krystallisirte *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +79.6^\circ$) und *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +14.5^\circ$) gewonnen, und beim Destilliren mit Salzsäure Furfurol und Methylfurfurol (= 5.2 pCt. Pentosan).

8. *Bulgaria inquinans* (L.)

Die Pflanze ist keine Flechte, denn ihr fehlen die Algen, und sie wird den eigentlichen Pilzen zugerechnet.

Die schwarzbraunen Fruchtkörper der *Bulgaria* (circa $\frac{1}{2}$ kg trockne Substanz) lieferten nach dem Reinigen mit Kaliumcarbonat, beim Kochen mit Wasser, eine schleimige Lösung, aus welcher durch Fällern mit Alkohol etwa 10 g eines grauen Pulvers erhalten wurden, welches bei der Hydrolyse mit 5-procentiger Schwefelsäure *d*-Glucose ($[\alpha]_D = 49.7^\circ$) gab.

¹⁾ Ann. d. Chem. 48, 11.

²⁾ Diese Berichte 38, 492 [1905].

Der Rückstand vom Kochen mit Wasser hydrolysierte sich schwer; nach 10-stündigem Erhitzen mit 8-procentiger Schwefelsäure wurden etwas *d*-Galactose ($[\alpha]_D = +75.1^\circ$) und *d*-Mannose ($[\alpha]_D = +15.1^\circ$) erhalten. Ferner gab der Pilz Furfurol und Methylfurfurol (= 2.35 pCt. Pentosan).

IV. Aus den Untersuchungen zu ziehende Schlüsse.

Nach dem Verhalten der untersuchten Flechten beim Kochen mit Wasser und bei der Hydrolyse lassen sich diese Flechten in zwei Gruppen theilen:

a) Gruppe des »isländischen Moores«, *Cetraria islandica*. Sie besteht aus *Cetraria islandica*, *Evernia prunastri*, *Usnea barbata*, *Cornicularia aculeata*, und ihr schliesst sich der Pilz *Bulgaria inquinans* an.

Aus den Gliedern dieser Gruppe gewinnt man (nach der Reinigung mit Kaliumcarbonat) durch Kochen mit Wasser, Fällen der Flüssigkeit mit Alkohol u. s. w. amorphe Stoffe, welche aus Lichenin oder ähnlichen Substanzen bestehen. Das Lichenin aus *Cetraria* und das Evernin sind sicher nicht identisch, weil das Erstere optisch inactiv ist, das Letztere dagegen stark rechts dreht; über die Stoffe aus *Usnea* u. s. w. lässt sich in dieser Hinsicht wenig sagen.

Alle diese dem Lichenin nahe stehenden Stoffe liefern bei der Hydrolyse leicht *d*-Glucose.

Die mit Wasser ausgekochten Materialien dieser Gruppe unterliegen leicht der Hydrolyse mit 5–6-procentiger Schwefelsäure und liefern hierbei viel *d*-Glucose und daneben weniger *d*-Mannose und *d*-Galactose.

b) Gruppe der Rennthierflechte, *Cladonia rangiferina*.

Diese besteht aus *Cladonia rangiferina*, *Stereocaulon pascale*, *Peltigera aptosa*; die Glieder derselben haben (nach der Behandlung mit Kaliumcarbonat) im Gegensatz zu der *Cetraria*-Gruppe beim Kochen mit Wasser keine bemerkbaren Mengen gallertartiger Lichenin-Stoffe geliefert, und die Rückstände vom Auskochen mit Wasser hydrolysieren sich schwerer, als diejenigen der ersten Gruppe. Die Hauptproducte der Hydrolyse sind *d*-Mannose und *d*-Galactose, und gegen diese tritt die *d*-Glucose nur in geringeren Mengen auf¹⁾.

¹⁾ Mit Versuchen über die Frage, ob die von Verschiedenen beobachtete Umwandlung von *d*-Glucose in andere Hexosen durch Einwirkung von Säuren hierbei eine Rolle spielt, bin ich beschäftigt. T.

Qualitativ sind somit die Producte der Hydrolyse bei beiden Gruppen dieselben, doch sind in quantitativer Hinsicht bedeutende Differenzen vorhanden.

In beiden Gruppen finden sich ferner Pentosane und Methylpentosane, wenigstens erhält man Furfurol und Methylfurfurol aus ihnen.

Die Rückstände von der Hydrolyse werden der Hauptsache nach aus Cellulose bestehen.

Auf Chitin hat Dr. Ulander die Flechten nicht untersucht, und dieser in anderen Pilzen von Winterstein u. A. gefundene Stoff scheint in den Flechten zuweilen ebenfalls, wenn auch in sehr geringer Menge, vorzukommen, worauf schon der geringe Stickstoffgehalt der Flechten, der doch zum Theil dem vorhandenen Proteïn oder anderen Stoffen angehören muss, hinweist, denn Ulander fand in *Cetraria* nach der Kjeldahl'schen Methode 1.06 und 1.09 pCt. Stickstoff, und in *Cladonia* 0.50 und 0.44 pCt. Stickstoff¹⁾. K. Müller hat in der That in *Cladonia* nur »äusserst geringe Mengen« Chitin gefunden. Nach v. Wisselingh²⁾ enthält *Peltigera* »viel Chitin«, *Cetraria* dagegen gar keins.

In den Flechten sind also ausser sonstigen Stoffen besonders 4 Kategorien von Kohlenhydraten vorhanden:

1. Inulin und ähnliche Stoffe, welche sich in kochendem Wasser lösen und Gallerten bilden,

2. der Hydrolyse leichter zugängliche Stoffe, welche neben Mannose und Galactose viel *d*-Glucose liefern,

3. der Hydrolyse schwerer zugängliche Stoffe, welche neben viel *d*-Mannose und *d*-Galactose wenig *d*-Glucose liefern,

4. der Hydrolyse nicht zugängliche Stoffe, vielleicht Cellulose.

Ueber mikroskopische Reactionen, welche Dr. Ulander mit den Flechten ausgeführt hat, möge man in der Dissertation und der ausführlicheren Abhandlung nachlesen.

Agricultur-chemisches Laboratorium der Universität Göttingen.

¹⁾ Knop und Schnedermann fanden in *Cetraria* im Mittel 0.5 pCt. Stickstoff.

²⁾ Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik 31, 665 [1898].