

Zur Chemie des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria* L.)

(II. Mitteilung)

von

Dr. **Julius Zellner.**

(Mit 2 Textfiguren.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 16. März 1905.)

Fettspaltendes Ferment. Wie in der ersten Mitteilung¹ berichtet wurde, besteht das Fett des Fliegenpilzes vorwiegend aus freier Öl- und Palmitinsäure. Diese Tatsache sowie insbesondere der Umstand, daß sich Buttersäureglyzerid vorfindet, also die Fettsäuren mit kleinem Molekulargewichte noch als Glyceride vorliegen, legten den Gedanken nahe, daß im Fliegenpilz ein fettspaltendes Ferment vorhanden sei. Natürlich mußte zuerst konstatiert werden, ob nicht das Fett des Pilzes von vornherein die Fettsäuren hauptsächlich im freien Zustand enthält. Zu diesem Zwecke wurden im vergangenen Herbst sowohl frische Pilze wie auch verschieden alte, getrocknete Pilzproben mit Petroläther extrahiert und in dem Extrakt die Menge der freien Fettsäuren durch Titration mit $\frac{1}{2}$ n. Lauge und Phenolphthalein bestimmt. Die Ergebnisse waren folgende:

| | Säurezahl |
|---|-----------|
| 1. Ganz junge, frische Pilze (schlesisches Material) . . . | 38·22 |
| 2. ebenso (andere Probe aus derselben Gegend) | 42·57 |
| 3. ältere, im Freien etwas trocken gewordene, aber frische Pilze (Schlesien) | 60·61 |

¹ Monatshefte für Chemie, 1904, p. 172.

| | Säurezahl |
|--|-----------|
| 4. getrocknete Pilze, vier Wochen alt (steirisches Material) | 69·46 |
| 5. dieselben Pilze nach zwei Monaten | 125·20 |
| 6. dieselben Pilze nach vier Monaten | 177·00 |
| 7. getrocknete Pilze (andere Probe aus Steiermark) nach 12 monatlichem Liegen | 180·00 |

Aus diesen Zahlen erhellt, daß das Fett des Pilzes zwar schon in frühem Alter eine erhebliche Menge freier Fettsäuren enthält, daß aber die Hauptmenge des Fettes erst später gespalten wird. Bemerkenswert ist dabei, daß das Trocknen des zerschnittenen Pilzes keinen erheblichen Einfluß auf den Spaltungsvorgang auszuüben scheint, welcher sich langsam mit abnehmender Geschwindigkeit vollzieht und nach etwa vier Monaten beendet ist. Zu einer vollständigen Verseifung kommt es jedoch nicht. Nebenbei sei bemerkt, daß das aus den frischen Pilzen extrahierte Fett hellgelb gefärbt ist, während das aus den getrockneten gewonnene dunkel ist (Ölsäure).

Nachdem nun festgestellt war, daß der Gehalt an freien Fettsäuren eine allmähliche Zunahme zeigt, welche möglicherweise durch ein Ferment bedingt wird, habe ich untersucht, ob auch andere Fette auf diese Einwirkung reagieren. Zu diesem Zwecke wurde zunächst frisches Pilzmaterial verwendet, da aus den Versuchen von Connstein hervorgeht, daß das Ferment, nachdem es einmal zur Wirkung gelangt ist, ein zweites Mal bedeutend schwächer wirkt und, wie bereits erwähnt, in den frischen Pilzen die Fettspaltung erst bis zu einem mäßigen Grade vorgerückt erscheint. Es wurden folgende Versuche angestellt:

1. 50 Gewichtsteile Rüböl (*a*) wurden mit 100 Gewichtsteilen des frisch ausgepressten und filtrierten Pilzsaftes unter häufigem Umschütteln 48 Stunden digeriert (*b*). Eine zweite Probe (*c*) wurde noch mit $10 \text{ cm}^3 \frac{1}{2} \text{ n.}$ Schwefelsäure versetzt.

a) 7·158 g Rüböl wurden durch $1·6 \text{ cm}^3 \frac{1}{2} \text{ n.}$ Lauge neutralisiert, Säurezahl somit 6·25.

b) 9·287 g Rüböl verbrauchten $2·2 \text{ cm}^3 \frac{1}{2} \text{ n.}$ Lauge, Säurezahl 6·63.

c) 9·355 g Rüböl verbrauchten $2\cdot2\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge, Säurezahl 6·58.

Es hatte also keine Einwirkung stattgefunden.

2. 150 Gewichtsteile frischen, nicht filtrierten, sondern bloß durch ein Leinentuch geseihten Pilzsaftes wurden mit 20 Gewichtsteilen Olivenöl (a) durch 48 Stunden auf der Schüttelmaschine miteinander digeriert (b). Eine zweite im übrigen gleiche Probe war noch mit $10\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Schwefelsäure versetzt worden (c).

a) 9·975 g verbrauchten $0\cdot9\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge, Säurezahl 2·52.

b) 9·666 g verbrauchten $3\cdot1\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge, Säurezahl 8·98.

c) 10·290 g verbrauchten $3\cdot3\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge, Säurezahl 8·98.

Die Menge der freien Fettsäuren, welche im Pilzsaft selbst vorhanden sind, ist so gering, daß sie nicht in Rechnung gestellt wurde (für 100 cm^3 Saft $0\cdot1\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge).

In diesem Versuche hatte also eine merkbare Bildung freier Säure stattgefunden.

3. 200 g frische Pilze wurden direkt mit Petroläther extrahiert (a). Eine ebenso große Portion wurde mit 20 g obigen Olivenöles gut verrieben und 24 Stunden im Wasserbade bei 40° stehen gelassen (b).

a) Aus 200 g Pilzen wurden $0\cdot293\text{ g}$ Fett erhalten, welches $0\cdot4\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge zur Neutralisation verbrauchte. Säurezahl 38·22.

b) 9·520 g Olivenöl verbrauchten $2\text{ cm}^3\ \frac{1}{2}$ n. Lauge.

Daraus berechnet sich mit Rücksicht auf die Säurezahl des ursprünglichen Olivenöles 2·52 und die Anwesenheit des Pilzfettes eine Säurezahl von 5·66. Auch hier war eine Säuerung des Fettes eingetreten. Aus diesen Vorversuchen geht hervor, daß das Ferment in Wasser unlöslich sein dürfte (1) und daß eine wenn auch geringe Verseifung fremder Fette

stattfindet. Ich habe die weiteren Versuche aus zwei Gründen mit frisch getrockneten Pilzen, welche möglichst zerkleinert wurden, fortgesetzt: erstens, weil die frischen Pilze sehr rasch der Zersetzung unterliegen und ich mit Rücksicht auf die noch unbekanntenen Eigenschaften der fettspaltenden Substanz kein antiseptisches Mittel anwenden wollte, und zweitens, weil sich zeigte, daß bei trockenem oder wenig feuchtem Pilzpulver die Berührung zwischen Fett und Pilzsubstanz eine viel innigere ist, so daß selbst bei wochenlanger Behandlung keine erhebliche Scheidung des Fettes eintritt; außerdem wirkt das Fett selbst konservierend, so daß niemals irgend welche Gärung oder Schimmelbildung beobachtet wurde, wenn die Gefäße nur lose (mit darüber gebundenem Papier) verschlossen werden. Es wurden nun gleiche Gewichtsmengen lufttrockenen Pilzpulvers und des zu spaltenden Fettes sorgfältig miteinander verrieben, wodurch ein steifer Brei entstand, welchem nun noch eine kleine Menge Wasser, verdünnter Säure oder NH_3 -Lösung unter gründlichem Verreiben inkorporiert wurde. Die Mischungen wurden dann teils bei gewöhnlicher Temperatur (zirka 20°C .), teils bei 45° (Talg) im Wasserbade längere Zeit stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit wurde eine Probe genommen, gewogen, mit Petroläther extrahiert, die Lösung mit Wasser ausgeschüttelt, hierauf der Petroläther abdestilliert und der Rückstand wieder gewogen. Hierauf wurde die Säurezahl desselben durch Titration mit $\frac{1}{2}$ n. Lauge und Phenolphthalein in alkoholischer Lösung ermittelt. Ein Teil des verwendeten Pilzpulvers war vorher durch mehrfache Extraktion mit kaltem Petroläther von Fett befreit worden, da Vorversuche gezeigt hatten, daß das Ferment hiedurch keinen Schaden leidet. Ein anderer Teil des Pilzpulvers wurde unentfettet verwendet. Im letzteren Falle wurde am Schlusse der Versuchsreihe eine Probe des Pilzpulvers mit Petroläther extrahiert, die Menge des Fettes und die Säurezahl desselben bestimmt. Die so gefundene Alkalimenge wurde unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die Mischungen gleiche Mengen Pilzpulver und Fett enthielten, auf die einzelnen analysierten Proben umgerechnet und von der Menge des jeweilig gefundenen Gesamtalkalis abgezogen, wodurch dann die Säurezahl des dem Pilzpulver

zugewetzten fremden Fettes sich ergibt. Da das im Pilzpulver enthaltene Fett selbst eine Säuerung erleidet, so sollte eigentlich bei jeder Probenahme auch eine Bestimmung der freien Fettsäuren im Pilzpulver vorgenommen werden. Da die relative Menge des Pilzfettes aber nicht groß ist, begnügte ich mich mit einer Schlußbestimmung, wodurch allerdings die im Anfange der Versuchsreihe erhaltenen Säurezahlen etwas gedrückt erscheinen.

I. Probe. 40 Teile entfettetes Pilzpulver, 40 Teile Olivenöl, 10 Teile Wasser. Versuchstemperatur 20°.

9·975 g Olivenöl verbrauchten zu Beginn des Versuches 0·9 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 160 Stunden: 6·368 g Öl verbrauchten 6·2 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 304 Stunden: 6·716 g Öl verbrauchten 14·0 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 472 Stunden: 8·771 g Öl verbrauchten 25·4 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 631 Stunden: 7·377 g Öl verbrauchten 23·4 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

II. Probe wie I, nur statt Wasser 10 Teile $\frac{1}{4}$ n. H_2SO_4 .

Nach 48 Stunden: 9·101 g Olivenöl verbrauchten 3·0 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 111 Stunden: 6·479 g Olivenöl verbrauchten 5·1 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 304 Stunden: 7·703 g Olivenöl verbrauchten 14·1 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 497 Stunden: 13·345 g Olivenöl verbrauchten 32·2 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

III. Probe. 40 g desselben Pilzpulvers, 40 g Talg, 10 Teile $\frac{1}{4}$ n. H_2SO_4 . Temperatur 45° C.

9·912 g verbrauchten zu Beginn des Versuches 0·6 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 137 Stunden: 5·572 g Talg verbrauchten 7·2 cm^3
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 304 Stunden: 9·948 g Talg verbrauchten 21·2 cm^3
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 646 Stunden: 10·317 g Talg verbrauchten 31·2 cm^3
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

IV. Probe. 40 g nicht entfettetes Pilzpulver, 40 g obigen
Talges, 10 g $\frac{1}{4}$ n. H_2SO_4 . Temperatur 45°.

Nach 145 Stunden: 9·741 g Talg + Pilzfett verbrauchten
19·8 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 312 Stunden: 9·504 g Talg + Pilzfett verbrauchten
27·9 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 479 Stunden: 9·134 g Talg + Pilzfett verbrauchten
32·2 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 631 Stunden: 8·061 g Talg + Pilzfett verbrauchten
31·0 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

V. Probe. Wie IV, nur statt der Säure 10 g $\frac{1}{4}$ n. NH_3 -
Lösung. Temperatur 45°.

Nach 145 Stunden: 7·492 g Talg + Pilzfett verbrauchten
15·8 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 312 Stunden: 8·403 g Talg + Pilzfett verbrauchten
23·7 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 631 Stunden: 8·002 g Talg + Pilzfett verbrauchten
28·2 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Die Probe reagierte am Schlusse des Versuches sauer.

Das in den Versuchen IV und V verwendete Pilzpulver
enthielt so viel freie Fettsäuren, daß die aus 10 g Pilzpulver
durch Petroläther extrahierbare Menge 4·34 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge
zur Neutralisation benötigte.

Im folgenden sind die erhaltenen Resultate tabellarisch
zusammengestellt:

Tabelle 1.

| Versuchsdauer in Stunden | Säurezahlen | | | | |
|--|----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| | I. Probe Olivenöl | II. Probe Olivenöl | III. Probe Talg | IV. Probe Talg | V. Probe Talg |
| 0 | 2·52 | 2·52 | 1·69 | 1·69 | 1·69 |
| 48 | — | 9·23 | — | — | — |
| 111 | — | 22·07 | — | — | — |
| 137 | — | — | 36·18 | — | — |
| 145 | — | — | — | 44·81 | 46·91 |
| 160 | 27·26 | — | — | — | — |
| 304 | 58·36 | 51·25 | 59·67 | — | — |
| 312 | — | — | — | 70·11 | 66·97 |
| 472 | 81·08 | — | — | — | — |
| 479 | — | — | — | 86·41 | — |
| 497 | — | 67·56 | — | — | — |
| 631 | 89·01 | — | — | 95·52 | — |
| 646 | — | — | 84·67 | — | 86·40 |
| Verseifungszahlen | | | | | |
| | 192 | 192 | 200 | 200 | 200 |
| Daher am Schlusse des Versuches gespaltene Prozente Fett | | | | | |
| | 46 | 35 | 42 | 48 | 43 |

Die Säurezahlen der verwendeten Fette selbst hatten sich während der Versuchsdauer nicht erheblich geändert.

Da die Spaltung langsam vor sich geht und die verwendeten Proben größtenteils aufgebraucht waren, habe ich noch eine weitere Versuchsreihe ausgeführt, bei welcher Pilz-

pulver verwendet wurde, das ein Jahr alt war, um den oben erwähnten Fehler, welcher in der Säuerung des Pilzfettes während der Versuchsdauer begründet ist, auszuschließen. Die Probenahme fand alle sechs Wochen statt, der ganze Versuch währte 18 Wochen, da, wie erwähnt, die Spaltung des Fettes im Pilze selbst etwa vier Monate in Anspruch nimmt. Alle Proben befanden sich in mit Filtrierpapier verschlossenen Gläsern und kamen gemeinsam in ein Wasserbad, welches während der ganzen Zeit auf 40 bis 45° C. erwärmt wurde. Es wurde gleichzeitig die Säurezahl der Fette und der mit Pilzpulver gemischten Proben ermittelt. Die Säurezahl des im Pilzpulver enthaltenen Fettes wurde zu verschiedener Zeit zweimal bestimmt und ergab denselben Wert, so daß sie während der Versuchsdauer als konstant angesehen werden kann.

I. Probe. 60 g Ricinusöl, 20 g Pilzpulver, 10 g Wasser.

Nach 6 Wochen:

11·59 g des Ricinusöles ohne Pilzzusatz verbrauchten 0·8 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

10·633 g desselben Öles mit Pilzzusatz verbrauchten 31·45 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 12 Wochen:

10·140 g des Ricinusöles verbrauchten 0·85 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

9·028 g des Öles mit Pilzzusatz verbrauchten 28·1 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 18 Wochen:

1·927 g Ricinusöl verbrauchten 0·20 cm^3 zur Neutralisation und 12·4 cm^3 zur vollständigen Verseifung.

8·110 g Ricinusöl mit Pilzzusatz verbrauchten 25·5 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

II. Probe. 60 g Rüböl, 20 g Pilzpulver, 10 g Wasser.

Nach 6 Wochen:

8·30 g Rüböl verbrauchten 1·9 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

9·220 g Rüböl mit Pilzzusatz verbrauchten 36·2 cm^3 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 12 Wochen:

7·410 g Rüböl verbrauchten $1\cdot7\text{ cm}^3$ $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

8·844 g Rüböl mit Pilzzusatz verbrauchten $39\cdot2\text{ cm}^3$
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 18 Wochen:

1·893 g Rüböl verbrauchten $0\cdot45\text{ cm}^3$ zur Neutralisation
und $11\cdot85\text{ cm}^3$ zur vollständigen Verseifung.

7·228 g Rüböl mit Pilzzusatz verbrauchten $32\cdot6\text{ cm}^3$
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

III. Probe. 60 g gereinigtes Kokosfett (Kunerol), 20 g Pilz-
pulver, 10 g Wasser.

Nach 6 Wochen:

9·320 g Kunerol verbrauchten $0\cdot1\text{ cm}^3$ $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

9·488 g Kunerol mit Pilzzusatz verbrauchten $42\cdot8\text{ cm}^3$
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 12 Wochen:

9·551 g Kunerol verbrauchten $0\cdot2\text{ cm}^3$ $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

9·798 g Kunerol mit Pilzzusatz verbrauchten $50\cdot4\text{ cm}^3$
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Nach 18 Wochen:

3·830 g Kunerol verbrauchten $0\cdot15\text{ cm}^3$ zur Neutralisation
und $34\cdot4\text{ cm}^3$ zur vollständigen Verseifung.

8·282 g Kunerol mit Pilzzusatz verbrauchten $43\cdot8\text{ cm}^3$
 $\frac{1}{2}$ n. Lauge.

Die in 10 g Pilzpulver enthaltenen freien Fettsäuren ver-
brauchten $3\cdot15\text{ cm}^3$ $\frac{1}{2}$ n. Lauge zur Neutralisation.

Die erhaltenen Resultate, welche nach der oben ange-
deuteten Berechnungsweise gewonnen wurden, sind in der
folgenden Tabelle zusammengestellt, welche ohne weitere Er-
läuterung verständlich ist.

Tabelle 2.

| Versuchsdauer in Wochen | Reinnsöl | | | | Rüböl | | | | Kunseröl | | | |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|
| | Säurezahl | | Verseifungszahl | Prozent Fett gespalten | Säurezahl | | Verseifungszahl | Prozent Fett gespalten | Säurezahl | | Verseifungszahl | Prozent Fett gespalten |
| | ohne Pilzzusatz | mit Pilzzusatz | | | ohne Pilzzusatz | mit Pilzzusatz | | | ohne Pilzzusatz | mit Pilzzusatz | | |
| 6 | 1.93 | 79.5 | 180.1 | 43 | 6.41 | 106.8 | 175.2 | 61 | 0.30 | 123.3 | 251.4 | 49 |
| 12 | 2.3 | 84.2 | 180.1 | 46.5 | 6.5 | 121.1 | 175.2 | 69 | 0.6 | 141.2 | 251.4 | 56 |
| 18 | 2.9 | 85.0 | 180.1 | 47 | 6.65 | 123.3 | 175.2 | 70 | 1.0 | 145.0 | 251.4 | 58 |

Aus den bisher gewonnenen Resultaten ergibt sich mit Bestimmtheit, daß im Fliegenpilz eine Substanz enthalten ist, welche eine langsame, aber weitgehende Spaltung verschiedener Fette bewirkt; diese Spaltung kann wohl nur als eine fermentative Verseifung betrachtet werden. Aber die Unterschiede gegenüber den bisher bekannt gewordenen fermentativen Fettspaltungen sind sehr erheblich. Vor allem fällt die Langsamkeit des Vorganges auf. Schon das im Pilze selbst vorhandene Fett, welches infolge innigerer Berührung mit dem Ferment, feinerer Verteilung und wohl auch infolge seiner chemischen Beschaffenheit bezüglich seiner Spaltung unter günstigeren Bedingungen steht wie die fremden, mit dem Pilzpulver gemischten Fette, bedarf Monate, bis der Verseifungsvorgang beendet ist, ohne daß derselbe auch nur annähernd quantitativ verlief (es werden etwa 78% gespalten). Bei den fremden Fetten wird die Reaktionsgeschwindigkeit schon nach 12 Wochen so klein, daß, wie aus Tabelle 2 ersichtlich, die Zunahme des Säuregehaltes kaum mehr analytisch kontrollierbar ist, um so weniger, als die Bestimmungsweise keine ganz zufriedenstellende ist. (Die Beseitigung der letzten Anteile des Petroläthers aus den Extrakten ist, wenn sich leichter flüchtige Fettsäuren vorfinden, wie beim Kunerol, ohne Verluste an letzteren nicht möglich.) Begreiflicherweise ist auch der Prozentsatz verseiften Fettes unter diesen Umständen geringer wie beim Pilzfett selbst. Immerhin wird in den bisher untersuchten Fällen meist mehr als die Hälfte gespalten. Am besten verseifte sich, wie die Versuche ergaben, Rüböl, ebenso werden auch Olivenöl und Talg gut gespalten, weniger leicht Kokosfett (Kunerol), am schwierigsten Ricinusöl. Das erstgenannte Fett steht dem Pilzfett an Spaltungsfähigkeit kaum nach (70%). Es ist ja auch von vornherein zu erwarten gewesen, daß die chemische Beschaffenheit der zur Verwendung kommenden Fette von wesentlichem Einfluß auf den Vorgang sein muß.

Ein anderer bemerkenswerter Umstand ist der, daß nicht — wie beim Ricinusferment — ein Säurezusatz den Vorgang beschleunigt. Der Pilzsaft reagiert zwar sauer (100 cm^3 desselben brauchen zur Neutralisation $3 \cdot 9 \text{ cm}^3 \frac{1}{2} \text{ n. Lauge}$), ebenso der wässrige Extrakt der getrockneten Pilze (siehe unten

Propionsäure). Aber aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß weder Zusatz von verdünnter Schwefelsäure noch von verdünntem Ammoniak die Reaktionsgeschwindigkeit merkbar beeinflusst.

Die Isolierung oder auch nur die Anreicherung des Fermentes ist mir bisher nicht gelungen. Ich vermute, daß die geringe Menge desselben eine Hauptursache ist, daß der Prozeß so langsam und unvollständig verläuft. Bisher habe ich nur so viel festgestellt, daß das fragliche Ferment in Wasser nicht löslich ist (Vorversuch 1) und daß die Extraktion des Fettes mit kaltem Petroläther die Wirkung des Pilzpulvers nicht beeinträchtigt (Tabelle 1).

Mit Rücksicht auf die mitgeteilten Erfahrungen möchte ich die vorliegende Reaktion nicht der Fettspaltung durch das Ricinusferment unmittelbar an die Seite stellen; eine größere Ähnlichkeit scheint mir der Fall mit der sogenannten Selbstspaltung des Palmöles (auch des Palmkernöles) aufzuweisen, soweit man nach den bisher vorliegenden Angaben urteilen darf.

Jedenfalls erscheinen mir die bisher gewonnenen Resultate bemerkenswert genug, um eine weitere Verfolgung des Gegenstandes zu rechtfertigen. Ich gedenke daher, die Versuche nach zwei Richtungen hin fortzusetzen: erstens sollen verschiedene andere Pilzarten in Untersuchung genommen werden, da, soweit aus den sehr spärlichen und unvollständigen Angaben über Pilzfette zu entnehmen ist, auch andere Pilze erhebliche Mengen freier Fettsäuren enthalten, und zweitens soll die Isolierung oder wenigstens die Anreicherung des fettspaltenden Stoffes angestrebt werden.

Ergosterin. Auf die wahrscheinliche Anwesenheit dieses Körpers ist bereits in der I. Abhandlung hingewiesen worden. Im folgenden beschreibe ich seine Isolierung und Identifizierung. In dem mit kaltem Ligroin bereiteten Extrakt findet sich nur sehr wenig Ergosterin, da dasselbe nur in heißem Petroläther leicht löslich ist. Zu seiner Gewinnung benützt man am besten den ohne vorhergehende Benzinextraktion gewonnenen alkoholischen Auszug. Derselbe wird nach Entfernung des Lösungsmittels mit der zwei- bis dreifachen Menge heißen Wassers angerührt, wobei sich an der Oberfläche eine dicke Emulsion

in reichlicher Menge abscheidet. Dieselbe wird abgetrennt und längere Zeit auf dem Wasserbad erhitzt, wobei sich die fettigen Substanzen klar abtrennen, während der wässerige Anteil mit der übrigen zur Gewinnung des Muscarins dienenden wässrigen Lösung vereinigt wird. Die geschmolzene Fettmasse wird erkalten gelassen und sodann die Hauptmenge des flüssiggebliebenen Anteiles abfiltriert. Der Rückstand wird in der zwei- bis dreifachen Menge siedenden Petroläthers gelöst, worauf sich beim Abkühlen und vier- bis sechsständigem Stehen in der Kälte das Ergosterin in gut filtrierbaren Nadeln abscheidet. Die braune, noch schmierige Rohabscheidung wird auf Tonplatten gestrichen, um Ölsäure u. dgl. zu beseitigen. Nun löst man in heißem Alkohol, welchem man so viel einer starken Lauge zusetzt, daß die Lösung nach halbstündigem Kochen noch deutlich alkalisch reagiert, wobei ein zu großer Überschuß an Lauge zu vermeiden ist. Beim Erkalten kristallisiert die Substanz in mehr oder weniger gelb gefärbten Blättchen aus. Die vollständige Reinigung erfordert oftmaliges Umkristallisieren aus siedendem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle (Anwendung des Heißwassertrichters!) und ist natürlich mit erheblichem Substanzverlust verbunden. Der Schmelzpunkt ist schließlich konstant 154° . Die Benützung anderer Lösungsmittel bei der Reinigung bietet keine Vorteile.

Den von Tanret¹ angegebenen Eigenschaften ist noch hinzuzufügen: Die aus Alkohol gewonnenen Kristallblätter sind wahrscheinlich rhombisch (siehe Fig. 1), obwohl häufig verzogene Kristalle von monoklinem Aussehen vorkommen. Aus siedendem Petroläther erhält man feine Nadeln (Fig. 2), doch scheidet sich die Substanz auch bisweilen gallertig aus. Aus Benzol, in welchem Ergosterin sehr leicht löslich ist, kristallisiert es in Nadeln, ebenso aus Aceton und Schwefelkohlenstoff. Es ist auch löslich in Methylalkohol und Chloroform.

Die Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure und Chloroform stimmt mit der von Tanret angegebenen überein, d. h.

¹ Journal de pharmacie et de chimie (5), 19, 225.

die Schwefelsäure färbt sich schön rot, während das Chloroform fast farblos bleibt. Charakteristisch fand ich noch folgendes

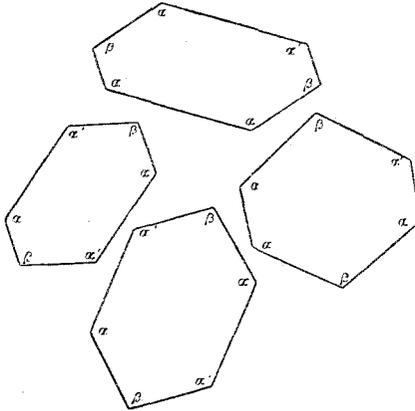


Fig. 1.

$$\alpha = \alpha' = 127^\circ.$$

$$\beta = 106^\circ.$$

Vergrößerung 150fach.

Verhalten: Fügt man der obigen Lösung etwas Wasser hinzu und schüttelt durch, so färbt sich die Schwefelsäure schön

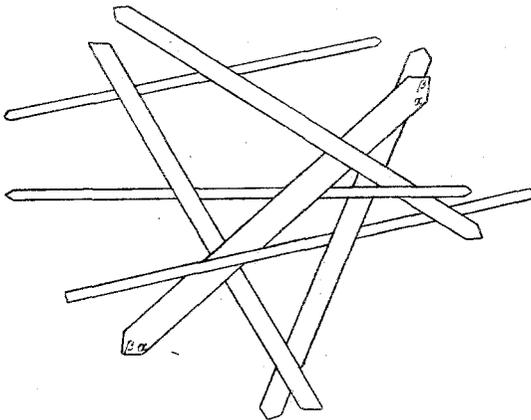


Fig. 2.

Vergrößerung 60fach.

grün, welche Farbe lange bestehen bleibt und endlich in Blau übergeht, während sich an der Oberfläche ein weißer Niederschlag abscheidet. Das Chloroform bleibt farblos. Mit wenig Jod und konzentrierter Schwefelsäure färbt sich die Chloroformlösung tief karminrot, die Schwefelsäure gelbrot mit hellgrüner Fluoreszenz.

Übergießt man einige Kriställchen des Ergosterins mit Essigsäureanhydrid und fügt einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so entsteht eine prachtvoll purpurne Färbung, welche rasch in ein dunkles Blaugrün übergeht. Auch hier entsteht mit Wasser eine schöne smaragdgrüne Färbung.

Das Acetylprodukt, durch mehrstündiges Kochen mit Essigsäureanhydrid gewonnen, bildet schöne Kristallblätter, welche, wie Tanret angibt, in Alkohol schwer löslich sind und den Schmelzpunkt 169° besitzen. Seine Reinigung gelingt leicht, selbst bei unvollständig gereinigtem Ausgangsmaterial, durch Kristallisieren aus einem Gemisch von Alkohol und Benzol. Eine tiefgehende Zersetzung beim Schmelzen konnte ich im Gegensatz zu Tanret nicht beobachten.

Die Analyse ergab:

0·242 g Substanz gaben 0·725 g CO_2 und 0·229 g H_2O .

In 100 Teilen:

| | Gefunden | Berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2$ |
|---------|----------|---|
| C | 81·69 | 81·95 |
| H | 10·51 | 10·24 |

Die Substanz ist auch leicht löslich in Chloroform. Mit Schwefelsäure und Chloroform tritt keine Farbenreaktion ein. Die Reaktion mit Essigsäureanhydrid ist natürlich dieselbe wie beim Ergosterin selbst.

Die Ausbeute an Ergosterin aus dem Fliegenpilz beträgt etwa 0·1 bis 0·2% (auf lufttrockenes Material gerechnet). Über einige neue Derivate dieses Körpers wird später berichtet werden.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß das Ergosterin in Pilzen ziemlich allgemein verbreitet ist. Wenn auch bisher nur in einem Falle, nämlich bei *Lactarius piperatus*,¹ die Identität der betreffenden Substanz mit dem Ergosterin des Mutterkornes festgestellt worden ist, so ist doch die Vermutung naheliegend, daß die mehrfach in der Literatur über Pilzstoffe vorkommenden Angaben² über cholesterinartige Substanzen, welche als Cholesterin selbst, als Phytosterin u. s. w., jedoch ohne analytische Daten, beschrieben werden, sich auf den oben genannten Körper beziehen. Auf die abweichenden Schmelzpunktsbestimmungen möchte ich kein großes Gewicht legen, da, wie bereits erwähnt, die vollständige Reinigung des Ergosterins bis zur Erreichung eines konstanten Schmelzpunktes namentlich bei Aufarbeitung größerer Substanzmengen sehr umständlich ist.

Amanitol. Mit diesem Namen will ich vorläufig eine Substanz bezeichnen, welche man in geringer Menge erhält, wenn man Fliegenpilzpulver mit Wasserdampf destilliert. Es gehen fast farblose, ölige Tröpfchen über, welche in der Vorlage zu feinen, weißen Flocken erstarren und in heißem Äther und Petroläther löslich sind. Der Schmelzpunkt liegt etwa bei 40°. Die Substanz ist in Lauge unlöslich, reagiert neutral und besitzt einen eigenartigen, fast an Petersilie erinnernden Geruch. Ich vermute, daß hier ein der Terpenreihe angehöriger Körper vorliegt, konnte jedoch bisher keine zur Analyse ausreichende Menge reiner Substanz gewinnen.

Ich kann meinen Bericht über die in Petroläther löslichen Körper des Fliegenpilzes nicht schließen, ohne einige Angaben der älteren Literatur zu erwähnen, welche sich auf das Vorkommen von Lichensterinsäure und Agaricin im Fliegenpilz

¹ Gérard, Chem. Zentralblatt, 1891, I, 363.

² Im *Lactarius vellereus*, Gérard, l. c.

In *Psalliota campestris*, als Cholesterin beschrieben. A. Zega, Chemiker-Zeitung, 1900, 285. Siehe auch weiter unten Agaricin.

In *Boletus luridus*, R. Böhm, Chem. Zentralblatt, 1885, 250.

In *Polysaccum pisocarpium*, K. Fritsch, Chem. Zentralbl., 1889, I, 543. Wird als Cholesterin beschrieben. Fritsch fand auch Cholesterin in *Boletus edulis* und *Cantharellus cibarius*. Ob er die Identität sicher nachgewiesen hat, ist nicht angegeben. R. Böhm (l. c.) teilt mit, daß auch in mehreren andern Pilzarten cholesterinartige Körper vorkommen.

beziehen. Was die erstgenannte Substanz betrifft, so hätte mir bei der eingeschlagenen Arbeitsweise und der großen Menge Fett, welche zur Verfügung stand, ihre Anwesenheit auch dann nicht leicht entgehen können, wenn dieselbe nur in vergleichsweise geringer Menge vorhanden wäre. Bolley¹ hatte aus dem Verhalten des NH_4 - und Ag-Salzes einer von ihm aus dem Fliegenpilz gewonnenen Fettsäure auf Lichensterinsäure geschlossen und Kaiser² stützte seine Behauptung von der Anwesenheit der Säure auf eine schlecht stimmende Bleibestimmung in einer zugestandenermaßen unreinen Substanzprobe, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß die Prozentzahlen für den Metallgehalt nicht allzu weit voneinander entfernt liegen [$(\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_3)_2\text{Pb}$ hat 30·21%, $(\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2)_2\text{Pb}$ hat 28·86% Pb, Kaiser fand 31·93%]. Es ist daher als sicher anzunehmen, daß hier unreine Palmitinsäure vorgelegen hatte und daß Lichensterinsäure im Fliegenpilzfett nicht vorkommt.

Was das sogenannte Agaricin betrifft, so besteht kein Zweifel darüber, daß unter diesem Namen zwei ganz verschiedene Substanzen in der Literatur vorkommen. Der Körper, welcher von Goble³ aus dem Champignon mit Äther extrahiert wurde, den Schmelzpunkt 148 bis 150° besitzt und nach Boudier⁴ auch im Fliegenpilz enthalten sein soll, ist jedenfalls nichts anderes als Ergosterin. Doch ist der Nachweis, daß das Agaricin des Champignons mit Ergosterin identisch ist, noch nicht strikte erbracht. Das Agaricin Schoonbrodt's⁵ hingegen ist nach Darstellungsweise und Eigenschaften nichts anderes als Mannit. Der Name Agaricin ist also aus der Literatur vorläufig zu streichen.

Im Petrolätherextrakt des Fliegenpilzes sind nunmehr folgende Körper nachgewiesen:

1. Buttersäure (als Glyzerid),
2. Ölsäure (frei),

¹ Annal. pharm., 86, p. 44 (1853).

² Chem. Untersuchung des *Agaricus muscarius*. Göttinger Dissertation, 1862, p. 28.

³ Journal d. Pharm. (3), 29, 31.

⁴ Die Pilze, bearbeitet von Th. Husemann, Berlin 1867.

⁵ Jahresber. über die Fortschritte der Chemie, 1864, 613.

3. Palmitinsäure (frei und als Glycerid),
4. Glycerin (als Glycerid),
5. Lecithin,
6. Ergosterin (frei),
7. Amanitol,
8. stark nach Pilzen riechendes ätherisches Öl.

In Alkohol lösliche Substanzen.

Zur Extraktion wurde käuflicher absoluter Alkohol verwendet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels, Auflösen des Rückstandes in Wasser und Beseitigung des Fettes (siehe Ergosterin) wird die Lösung mit basischem Bleiacetat (1 Gewichtsteil PbO auf 2 Gewichtsteile kristallisierten Bleizucker) gefällt. Im folgenden sollen zunächst die aus dieser Bleifällung isolierbaren Körper besprochen werden.

I. Durch Bleiacetat fällbare Körper. Die Menge derselben ist ziemlich groß. Die gelblichbraunen Bleisalze werden mit heißem Wasser angerührt und nochmals filtriert, da ein einfaches Waschen zur Beseitigung des massenhaft vorhandenen Mannits nicht genügt. Die Waschwässer laufen rotgelb ab, da die Bleifällung des gelbroten Pilzfarbstoffes merklich löslich ist. Schließlich wird die Bleifällung abgepresst. Der Gehalt an Salzen unorganischer Säuren ist gering, wie die Analyse des im Exsikkator getrockneten Produktes ergab (60% Pb, 0.1% SO₄, 0.63% PO₄, 2.63% Cl). Die Bleisalze werden mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt, Spuren gelösten Bleies mit Schwefelwasserstoff und die überschüssige Schwefelsäure mit der analytisch bestimmten Menge Ätzbaryt beseitigt. Die Lösung wird dann im Kohlensäurestrom eingedampft.

Propionsäure. Das hiebei erhaltene Destillat zeigt einen eigentümlichen Fettsäuregeruch, welcher schon bemerkbar wird, wenn man die Bleisalze mit Schwefelsäure zerlegt. Ich habe versucht, aus dem Destillat durch Neutralisation mit Soda, Eindampfen und Zerlegen des Salzgemisches mit Schwefelsäure die fragliche Säure zu isolieren. Leider gelang es jedoch nicht, dieselbe von der aus dem basischen Bleiacetat stammenden Essigsäure zu trennen. Man kann jedoch die flüchtige Säure gewinnen, wenn man den gepulverten Pilz direkt mit sehr

verdünnter Schwefelsäure destilliert, wie dies seinerzeit Bornträger¹ getan hat. Das Destillat wird vom Amanitol (s. o.) abfiltriert, mit Soda neutralisiert, eingedampft und der Rückstand einige Male aus Alkohol umkristallisiert. Da bereits von Bornträger eine vollständige Analyse des Barytsalzes vorliegt, begnügte ich mich zur Kontrolle mit einer Na-Bestimmung.

1.023 g Substanz (bei 120° getrocknet) gaben 0.761 g Na_2SO_4 .

In 100 Teilen:

| | Gefunden | Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$ |
|--------------|----------|--|
| Na | 24.09 | 23.96 |

Der Geruch der Säure und ihres Äthylesters stimmt mit dem Geruche der entsprechenden synthetischen Produkte überein.

Hiedurch wird die Angabe Bornträger's, daß hier Propionsäure vorliegt, bestätigt. Ihr Vorkommen im Bleiniederschlag erklärt sich daraus, daß Propionsäure, wie ich mich durch Versuche mit dem synthetischen Produkt überzeugt habe, aus schwach saurer Lösung durch einen genügenden Überschuß von basischem Bleiacetat gefällt wird. Die Säure ist teils als Salz, teils auch in freiem Zustand im Pilz vorhanden, da man auch beim Destillieren mit Wasser allein — wenn auch sehr geringe Mengen derselben — erhält.

Fumarsäure. Der nach der Destillation erhaltene dunkle Rückstand scheidet nach längerem Stehen im Exsikkator eine kristallinische Substanz aus, welche man jedoch bequemer erhält, wenn man den Sirup gleich mit reichlichen Mengen Äther ausschüttelt. Der ätherische Extrakt besteht nach Beseitigung des Lösungsmittels aus einer stark gelb gefärbten kristallisierten Substanz. Zur Reinigung wird dieselbe oftmals unter jedesmaligem Zusatze von Tierkohle aus siedendem Wasser umkristallisiert. Die Reinigung kann zum Schluß auch aus Äther erfolgen.

Der Körper ist eine Säure und bildet weiße Blättchen, welche in kaltem Wasser schwer löslich sind. Er sublimiert,

¹ Neues Jahrbuch der Pharmazie, Speier 1857, p. 222.

ohne zu schmelzen, über 200° und ist bei 260° unter Hinterlassung eines geringen kohligen Rückstandes vollständig verflüchtigt.

Die Elementaranalyse ergibt:

0·3215 g im Exsikkator getrockneter Substanz gaben 0·108 g H₂O und 0·4905 g CO₂.

In 100 Teilen:

| | Gefunden | Berechnet für | |
|-------------|----------|--|--|
| | | C ₄ H ₄ O ₄ | C ₄ H ₆ O ₄ |
| C | 41·52 | 41·38 | 40·67 |
| H | 3·73 | 3·44 | 5·08 |

Das schwer lösliche Barytsalz wurde erhalten, indem die Säure mit Ätznatron genau neutralisiert und die Lösung in der Siedehitze mit BaCl₂ gefällt wurde. Es bildet einen feinkörnigen Niederschlag, der nach gründlichem Waschen und Trocknen analysiert wurde.

0·382 g Substanz gaben 0·356 g BaSO₄.

In 100 Teilen:

| | Gefunden | Berechnet für |
|--------------|----------|---|
| | | C ₄ H ₂ O ₄ Ba |
| Ba | 54·79 | 54·58 |

Das Cu-Salz wird aus der Lösung der freien Säure mit Kupferacetat als blauer Niederschlag gefällt. Auch das Silbersalz ist in Wasser sehr schwer löslich. Aus der Analyse der Säure und ihres Salzes sowie aus den übrigen angeführten Tatsachen geht zur Evidenz hervor, daß die Säure Fumarsäure ist. Bezüglich dieser Substanz ist zu bemerken, daß sie schon mehrere Chemiker in Händen gehabt haben, aber stets in zu geringer Menge, um eine gründliche Untersuchung vornehmen zu können. Apoiger¹ titrierte sie und bestimmte den Silbergehalt des Salzes, wonach er sie als Bernsteinsäure

¹ Repert. für Pharm. (3), VII, 289 vom Jahre 1851 und Vierteljahrsschr. für prakt. Pharmazie, II, 481 vom Jahre 1853.

ansprach, Dessaignes¹ vermutete mit Recht, daß hier Fumarsäure vorliege, während Kaiser² mit großer Bestimmtheit die Ansicht aussprach, daß die Säure Bernsteinsäure sei, obwohl ihn schon das Verhalten derselben im Kapillarrohr über die Unrichtigkeit seiner Anschauung hätte aufklären müssen. Ich kann an dieser Stelle den Vorwurf nicht unterdrücken, daß die Angaben Kaiser's, wie ich mich wiederholt überzeugt habe, durchaus nicht verläßlich sind. Nunmehr ist sichergestellt, daß die fragliche Säure Fumarsäure ist und damit werden auch die weitläufigen Erörterungen Kaiser's über die Bildungsart der vermeintlichen Bernsteinsäure im Pilze selbst gegenstandslos. Wie bekannt, ist Fumarsäure bereits in andern Pilzen gefunden worden, nämlich in *Polyporus pseudoigniarius* von Dessaignes³ und *Agaricus piperatus* von Bolley.⁴ Sie soll nach dem erstgenannten Autor auch in *Agaricus torminosus*⁵ vorkommen. Sie dürfte also in Pilzen allgemeiner verbreitet sein.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

¹ Compt. rend., XXXVII, 782 vom Jahre 1854.

² L. c., p. 19.

³ Liebig's Ann., 89, 120.

⁴ Liebig's Ann., 86, 44.

⁵ Zur Nomenklatur sei bemerkt, daß oben die alten, der chemischen Literatur entnommenen Speziesnamen angeführt wurden. Die heutigen botanischen Namen der beiden letztgenannten Pilze sind: *Galorrhheus piperatus* L. und *G. torminosus* Schaef.