

Zur Chemie der höheren Pilze

von

Dr. Julius Zellner.

I. Mitteilung: *Trametes suaveolens* Fr.

(Vorgelegt in der Sitzung am 14. November 1907.)

Im Anschluß an frühere Arbeiten¹ habe ich nunmehr die phytochemische Untersuchung einiger parasitisch lebender Pilzarten in Angriff genommen, weil im Vergleich mit den erdbewohnenden, saprophytischen Pilzen nur wenige Arten von eigentlich parasitischer Lebensweise in den Kreis chemischer Betrachtung gezogen worden sind und gerade das Studium solcher Spezies (wie des Mutterkorns, des Lärchenschwammes u. s. w.) sehr bemerkenswerte Resultate geliefert hat. Zunächst wurde ein Baumschmarotzer, *Trametes suaveolens* Fr., der Untersuchung unterzogen, worüber im folgenden berichtet werden soll.

Der Pilz wurde im Februar und März gesammelt; um diese Zeit ist er in vollem Saft, führt jedoch keine Sporen; er ist bis auf die meist graue Oberseite des Hutes ganz weiß, während später im Frühling die Porenmündungen sich rostgelb färben. Das gesammelte Material wurde sorgfältig von Holz und Rinde der Weidenbäume, auf welchen der Pilz schmarotzt, befreit, zerschnitten, bei Zimmerwärme getrocknet und schließlich auf einer Fleischhackmaschine soweit wie möglich zerkleinert.

Der frische Pilz enthält je nach dem Feuchtigkeitszustand der Luft 65 bis 67% Wasser, also trotz seiner festen Beschaffenheit sehr viel. Im lufttrockenen Zustand beträgt der Feuchtigkeitsgehalt 7 bis 9%.

¹ Monatshefte 1904 p. 172; 1905 p. 253; 1906 p. 105 und p. 119.

1. Mineralbestandteile. Der Aschengehalt des völlig getrockneten Pilzes beträgt 2·9⁰/₀, ist also relativ gering. Die Analyse der Asche ergab folgende Zahlen, wobei zu bemerken ist, daß die meisten Bestimmungen doppelt ausgeführt wurden:

K ₂ O.....	23·16 ⁰ / ₀
Na ₂ O.....	0·38
MgO.....	6·13
CaO.....	19·25
Fe ₂ O ₃ + Al ₂ O ₃	0·30
Cl.....	0·32
SO ₃	29·05
P ₂ O ₅	6·50
Unlösliches und SiO ₂	3·89
CO ₂ und Verlust.....	11·02

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß der Kaligehalt der Asche beträchtlich ist, wie dies bei Pilzaschen regelmäßig der Fall ist; das Kali ist aber vorzugsweise als Karbonat, nicht als Phosphat vorhanden, denn der Phosphorsäuregehalt ist auffallend niedrig. Ebenso auffallend ist die große Menge von Gips; der letztere ist größtenteils als solcher im Pilz vorhanden, denn im konzentrierten, wässerigen Auszug läßt er sich reichlich nachweisen. Ob dieser hohe Gehalt an Calciumsulfat für den *Trametes* spezifisch oder auch sonst in Baumschwämmen zu finden ist, läßt sich vorläufig mangels analytischer Daten nicht beurteilen, doch ist zu bemerken, daß der systematisch nahestehende Lärchenschwamm (*Polyporus officinalis* Fr.) in seiner Asche nur wenig Calcium und Schwefelsäure aufweist.¹ Auch sonst ist die Zusammensetzung seiner Asche eine andere. Die *Trametes*-Asche enthält sehr wenig Chlor. Der Eisengehalt ist auch gering, ein Teil desselben läßt sich auch im wässerigen Pilzextrakt nachweisen. Im ganzen gleicht die Zusammensetzung der Asche mehr den Holzaschen als denen der erdbewohnenden Pilze.

2. Petrolätherauszug. Die Menge desselben ist gering (0·8⁰/₀). Das Rohfett ist gelb gefärbt und scheidet beim Stehen einen kristallisierten Bestandteil ab.

¹ Schmieder, Archiv der Pharmazie, 1886, p. 641.

Fett. Die Säure- und Verseifungszahl des Fettes wurde in bekannter Weise in zwei verschiedenen Proben bestimmt:

	Probe I	Probe II
Säurezahl (nach 14 Tagen)	32·29	29·40
Verseifungszahl	175·2	172·0

Das Fett ist also ziemlich reich an freien Fettsäuren, wie schon früher¹ festgestellt worden war. Es wurde mit alkoholischem Kali verseift, die Seife am Wasserbad getrocknet und mit Äther ausgeschüttelt. Die Menge der Seife war sehr gering. Trotzdem wurde in bekannter Weise die Trennung der Fettsäuren in ungesättigte und gesättigte durchgeführt. Die ersteren sind gelb gefärbt, haben einen unangenehmen Geruch und zeigen die Säurezahl 186·1. Sie geben die Elaidinreaktion und bestehen wohl vorwiegend aus Ölsäure. Die festen Fettsäuren sind nur in sehr kleiner Menge vorhanden; einmal aus Alkohol kristallisiert, zeigen sie den Fp. 74°; für eine nähere Untersuchung reichte das Material nicht aus.

Fettpaltendes Ferment. Das Pilzpulver wurde in ähnlicher Weise wie dies bei früheren Versuchen² der Fall war, auf Rüböl einwirken gelassen. Das Ergebnis war folgendes:

Säurezahl des Rüböls zu Beginn des Versuches	3·6.
» » » nach 3 Wochen	18·75.
» » » nach 6 Wochen	27·10.

Es findet also eine schwache, aber doch merkliche Spaltung des Fettes statt, woraus auf die Anwesenheit eines lipolytischen *Fermentes* zu schließen ist.

Körper der Ergosteringruppe. Der mit Äther aus der Seife extrahierte Körper ist im Rohfett in freiem Zustand vorhanden und kristallisiert beim Stehen desselben aus. Doch ist es besser, das Fett vorher zu verseifen, da dann die Reinigung rascher von statten geht. Der Rückstand des Ätherextraktes kristallisiert sofort beim Erkalten: die Kristalle

¹ Zellner, Monatshefte für Chemie, 1906, p. 124.

² Zellner, Monatshefte für Chemie, 1905, p. 119.

werden abgesaugt, mit kaltem Petroläther gewaschen und aus Äther oder Alkohol umkristallisiert. Der Stoff hat die weitestgehende Ähnlichkeit mit dem Ergosterinkörper, welchen ich früher¹ aus dem Fliegenpilz isoliert habe. Aus Äther kristallisiert er in Nadeln, aus Alkohol in perlmutterglänzenden rhombischen Blättchen, welche ganz den damals beschriebenen gleichen (Kantenwinkel 107° und 127°). Ebenso ist der Körper auch in Benzol und Chloroform leicht löslich und gibt ganz ähnliche Farbenreaktionen:

Hesse-Salkowski'sche Reaktion: Chloroform fast farblos, Schwefelsäure rotgelb mit grüner Fluoreszenz.

Liebermann'sche Reaktion: rotviolette Färbung, welche tief blauviolett und nach Wasserzusatz grün wird.

Schiff-Mach'sche Reaktion (Eindampfen mit HNO_3 und Behandlung mit NH_3): rotbraune Färbung.

Schiff'sche Reaktion (Eindampfen mit FeCl_3 und Behandlung mit HCl): keine Färbung.

Obwohl der Stoff unter dem Mikroskop ganz einheitlich aussieht, zeigt er doch eine Schmelzlinie von 158 bis 167° und ist ein Gemisch zweier Körper, welche sich nur schwer voneinander trennen lassen. Der in Alkohol schwerer lösliche zeigte nach öfterem Umkristallisieren den Fp. 165 bis 167° . Derselbe wurde der Analyse unterworfen.

$0\cdot1455$ g Substanz verloren im Vakuum $0\cdot0065$ g H_2O .

$0\cdot139$ g trockener Substanz gaben bei der Verbrennung $0\cdot4245$ g CO_2 und $0\cdot147$ g H_2O .

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
H_2O	4·46	4·61
C	83·28	83·87
H	11·74	11·82

3. Der alkoholische Auszug. In Alkohol sind etwa $2\cdot5\%$ der Trockensubstanz löslich. Das Lösungsmittel wird zum großen Teil aber nicht vollständig abdestilliert. Nach längerem Stehen scheidet sich

¹ Monatsheft für Chemie, 1905, p. 264.

Mykose in körnigen Kristallen ab. Man filtriert dieselben ab und wäscht sie mit Äther und Alkohol. Einige Kristalle werden aufbewahrt, die übrigen in Wasser gelöst, mit Tierkohle eingedampft, der Rückstand mit heißem, etwas wasserhaltigem Alkohol aufgenommen und filtriert. In die konzentrierte Lösung wird ein Kristall eingesät, worauf fast farblose Kristalle der Mykose sich bilden, welche noch durch Kristallisation aus Alkohol gereinigt werden können. Die Ausbeute ist leider sehr gering. Das Verhalten der Substanz beim Erhitzen im Kapillarrohr ist das für die Mykose angegebene: erster Schmelzpunkt bei 100° , Entweichen des Kristallwassers bei 120 bis 130° , Festwerden und nochmaliges Schmelzen bei 210° . Die Analyse gibt für die Formel $C_{12}H_{22}O_{11} + 2H_2O$ stimmende Zahlen:

0·246 g Substanz verloren bei 130° 0·024 g H_2O .

0·222 g getrocknete Substanz gaben bei der Verbrennung 0·340 g CO_2 und 0·1325 g H_2O .

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{22}O_{11} + 2H_2O$
H_2O	9·75	9·52
C.....	41·75	42·10
H.....	6·63	6·43

Glukose ist reichlich anwesend. Der Nachweis geschah durch die Darstellung des Osazons nach E. Fischer in einem Teil des alkoholischen Auszugs. Aussehen, Löslichkeit und Schmelzpunkt (306°) stimmen mit denen des Glukosazons überein. Der wässrige Auszug des Pilzes reduziert stark Fehling'sche Lösung. Doch sind an dieser Reaktion noch andere Stoffe beteiligt. 1·16 g trockene Pilze wurden mit heißem Wasser erschöpft und die Lösung mit Fehling'schem Reagens behandelt. Es wurden 0·084 g Cu erhalten, entsprechend 3·77% Dextrose.

Mannit ist nicht vorhanden.

Trehalase. Dieses von Bourquelot¹ aufgefundenene Ferment bewirkt bekanntlich die Spaltung der Mykose zu

¹ Bulletin de la société mycologique de France, 9, 189 (1893) und 21, 1. Heft (1905).

Traubenzucker und zwar so rasch, daß in den meisten Pilzen schon wenige Stunden nach dem Einsammeln die Mykose nicht mehr nachweisbar ist. Nachdem im vorliegenden Fall aus dem getrockneten Pilz Mykose gewonnen wurde, so geht daraus hervor, daß im *Trametes* keine Trehalase vorhanden sein kann. Dieser Fall, daß auch der getrocknete Pilz Mykose enthält, ist erst bei wenigen Pilzarten beobachtet worden.¹

Harz bildet den Hauptbestandteil des alkoholischen Extraktes. Es ist braun, halbweich, in Alkohol, Äther, Benzol leicht, teilweise auch in Petroläther löslich. Durch Kochen mit Lauge wird es zum Teil verseift, auch Sodalösung bringt einen Teil des Harzes in Lösung; aus derselben scheidet sich beim Ansäuern eine braune amorphe Masse aus. Die alkoholische Harzlösung gibt mit Bleizuckerlösung eine gelbe, flockige Fällung, mit Kupferazetat eine gelbgrüne Fällung, mit Magnesium- und Bariumazetat gelbliche Trübungen (alle Reagenzien in alkoholischer Lösung). Eisenchlorid gibt Braunfärbung; Kaliumbichromat liefert keine Farbenänderung.

Organische Säuren, Gerbstoffe und basische Körper konnten durch die gebräuchlichen Methoden bei den mir zur Verfügung stehenden Mengen des Rohmaterials (einigen Kilogrammen) nicht in greifbarer Menge isoliert werden. Falls sie vorhanden sind, ist ihre Menge außerordentlich gering.

4. Der wässrige Extrakt. Die Menge desselben ist ziemlich bedeutend (18 bis 20⁰/₀). Leider ergaben sich bei der Untersuchung desselben ganz ähnliche Schwierigkeiten, wie sie früher bei der Untersuchung des Fliegenpilzes auftraten. Der lufttrockene Pilz wurde mit der zehnfachen Gewichtsmenge Wasser ausgekocht, die schleimige opalisierende Lösung etwas konzentriert und mit dem gleichen Volumen 96prozentigen Alkohols versetzt. Es fällt eine flockige, gut filtrierbare Masse aus. Dieselbe wird mit Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst und der Dialyse unterworfen, um sie von Salzen zu befreien, was jedoch nicht befriedigend gelingt. Nun wird die Lösung nochmals mit Alkohol gefällt. Die bei der Fällung ganz blaßbräunliche Substanz wird beim Trocknen im Exsikkator

¹ Bourquelot, Bulletin de la société chimique de Paris (1894).

schwarz. Diese unangenehme Erscheinung wurde auch schon bei den analogen Fällungen des Fliegenpilzes bemerkt. Ihre Ursache ist vorläufig unbekannt. Dampft man eine Lösung des Körpers ein, so findet keine Dunkelfärbung statt und man erhält einen braungelben, glasigen Rückstand, der sich aber auch in heißem Wasser nicht mehr völlig löst. Der mit Alkohol gefällte Körper löst sich aber in heißem Wasser zu einer opalisierenden Flüssigkeit. Diese Lösung wird durch Bleizucker nicht, wohl aber durch basisches Bleiazetat in weißen, amorphen Klumpen gefällt, reduziert Fehling'sche Lösung ziemlich kräftig, stärker noch nach längerem Kochen mit verdünnter Salzsäure, gibt mit Jod keine Reaktion, wird durch Eisenchlorid nicht gefällt und gelatiniert beim Schütteln mit Äther nicht. Man hat es hier höchst wahrscheinlich mit gummi- oder dextrinartigen Kohlehydraten zu tun.

Pentosane sind, wie es scheint, in nicht unbedeutender Menge vorhanden. Wenigstens erhält man bei der Destillation von 8 bis 10 g lufttrockener Pilze mit verdünnter Salzsäure so viel Furol, daß mit essigsauerm Phenylhydrazin ein starker Niederschlag entsteht. Das Furol wurde auch noch durch die Fichtenspanreaktion und die Rotfärbung mit Anilinazetat nachgewiesen. Es braucht wohl kaum bemerkt zu werden, daß die für diesen Versuch verwendete Pilzprobe ganz besonders sorgfältig von Holzresten u. dgl. befreit worden war.

Ein glykosidspaltendes Ferment von kräftiger Wirkung, welches in Wasser löslich sein dürfte, ist im *Trametes* enthalten. In Hinblick auf das natürliche Substrat des Pilzes wurden die Versuche mit Salicin durchgeführt. Frisch gesammelte Pilze wurden tunlichst zerkleinert und das breiartige Material sofort in Verwendung genommen. Es schien nötig, drei Proben anzusetzen; Probe *A* bestehend aus 15 g Pilzmaterial, 0·5 g Salicin, welches in 50 g H₂O gelöst worden war, und 0·2 g Chloroform, Probe *B* war ebenso zusammengesetzt, nur enthielt sie kein Salicin, während Probe *C* bei sonst gleicher Zusammensetzung kein Pilzmaterial enthielt. Alle drei Proben wurden in verschlossenen Kölbchen 48 Stunden stehen gelassen und hierauf in je 20 cm³ der Lösung (beziehungsweise des Filtrates) die Menge der reduzierend wirkenden Stoffe mit

Fehling'scher Lösung bestimmt. Probe *A* ergab 0·258 g, Probe *B* 0·074 g und Probe *C*¹ 0·012 g Kupfer. Nach Abzug der von *B* und *C* reduzierten Kupfermengen ergeben sich 0·172 g als jene Menge Kupfer, welche durch die aus dem Salicin abgespaltene Glukose reduziert wurden. Die weitere (wegen des feuchten Pilzmaterials) nur annähernd gültige Rechnung ergibt, daß 70%₀ des angewandten Salicins gespalten worden sind.

Nunmehr wurde auch noch untersucht, ob das Pilzpulver auch diastatische und invertierende Wirkungen auszuüben vermag. Die Versuche wurden mit Lintner'scher Stärke und mit Rohrzucker angestellt, die Resultate seien der Kürze halber in tabellarischer Form zusammengestellt:

Nr.	Zusammensetzung der Probe	Kupfermenge, welche durch 25 cm ³ der Probenflüssigkeit aus 60 cm ³ Fehling'scher Lösung abgeschieden wurde	Prozentsatz d. hydrolysierten Kohlehydrates
1	10 g lufttrockenes Pilzpulver, 100 cm ³ Wasser	0·172 g	—
2	10 g lufttrockenes Pilzpulver, 100 cm ³ Wasser, 1 g Lintner'sche Stärke	0·510 g	63
3	100 cm ³ Wasser, 1 g Lintner'sche Stärke	nicht wägbare Spur	—
4	10 g lufttrockenes Pilzpulver, 100 cm ³ Wasser, 1 g Rohrzucker	0·289 g	24
5	100 cm ³ Wasser, 1 g Rohrzucker	keine Reduktion	—

Sämtliche Proben befanden sich in Kölbchen, welche bis zum Beginn des Halses damit gefüllt waren, und wurden zum

¹ Die Reduktion des Kupfers rührt von der in die wässrige Lösung übergegangenem kleinen Menge Chloroform her.

Schutz gegen Infektion mit Petroläther überschichtet. Die Versuchsdauer war 48 Stunden. Bei der Berechnung wurde natürlich die von der Probe 1 reduzierte Kupfermenge in Abzug gebracht, die Menge der verzuckerten Stärke mittels der Allihn'schen Tabelle, die des invertierten Rohrzuckers nach der Methode von Meissl und Hiller berechnet. Die letztere Zahl ist nur eine ungefähre. Immerhin ergibt sich, daß eine kräftige Verzuckerung der Stärke stattgefunden hat, welche einem diastatischen Ferment zugeschrieben werden muß. Ob dasselbe mit dem glykosidspaltenden Ferment identisch ist, kann ich nicht sagen. Auch die invertierende Wirkung des Pilzpulvers ist eine, wenn auch ungleich schwächere, so doch nicht unerhebliche, so daß es auch sehr wahrscheinlich ist, daß ein invertierendes Ferment vorhanden ist. Auffallend ist dann nur, daß die Mykose während des Trocknens der Pilze nicht durch dieses Ferment abgebaut wird; es muß also jedenfalls von der Trehalase verschieden sein (siehe oben p. 49).

Eiweißkörper sind nur in geringer Menge im wässerigen Auszug enthalten. Ein kleiner Teil derselben wird durch Kochen koaguliert, auch Ferrocyankalium und Jodquecksilberjodkalium geben in dem kaltbereiteten Wasserauszug nur schwache Fällungen.

5. Flüchtige Bestandteile. Der Pilz enthält einen angenehm nach Anis riechenden Stoff; der Geruch tritt namentlich beim Trocknen der zerschnittenen Pilze deutlich hervor. Doch scheint der Körper sehr subtiler Natur zu sein; destilliert man nämlich frisches Material mit Wasserdampf, so erhält man ein trübes Destillat, in welchem feine Flocken suspendiert sind; dasselbe riecht aber durchaus nicht nach Anis, sondern der flüchtige Stoff zeigt ganz denselben Geruch wie das von mir im Fliegenpilz gefundene Amanitol. Auch die Löslichkeit in Alkohol, Chloroform und Benzol ist die gleiche, so daß es sich vielleicht hier um einen allgemein in den Pilzen verbreiteten Stoff handelt. Destilliert man das Pilzpulver mit sehr verdünnter Lauge, so erhält man ein nach Ammoniak riechendes Destillat, welches vielleicht auch kleine Mengen Trimethylamin enthält. Doch ist die relative Menge dieser Körper außerordentlich gering.

6. Unlösliche Bestandteile. Das Zellgerüst des *Trametes* gibt keine der gebräuchlichen Ligninreaktionen. Es ist also sicher keine Holzsubstanz vorhanden. Behandelt man den Pilz in der für die Darstellung der Zellulose üblichen Weise mit verschiedenen Lösungsmitteln, so erhält man schließlich eine hornartige Masse von gelblicher Farbe, welche unter dem Mikroskop keine deutliche Struktur mehr erkennen läßt und keine Zellulosereaktionen gibt. Die Untersuchung derselben soll demnächst mit größeren Mengen Materials in Angriff genommen werden.

Der graue Farbstoff, welcher bei älteren Pilzindividuen auf der Oberseite des Hutes sich vorfindet, ist in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich, zeigt sich auch unter dem Mikroskop nicht lokalisiert, sondern das ganze periphere Gewebe erscheint — abgesehen von Staubkörnern und Algenzellen — dunkler gefärbt als die Hyphen des Pilzinnern. Der Gedanke ist nicht abzuweisen, daß die allmähliche Graufärbung des Hutes ein Vorgang ist, der dem Vergrauen des Holzes, wie es Wiesner¹ und Schramm² beschrieben haben, gleich oder ähnlich ist.

¹ Sitzungsberichte d. kais. Akademie d. Wissensch. in Wien, Bd. 49 (1864), p. 61.

² Jahresbericht d. Vereinigung d. Vertreter d. angewandten Botanik, 1906, p. 140.
