

Zur Chemie der höheren Pilze.

IV. Mitteilung: Über Maltasen und glykosidspaltende Fermente

von

Dr. Julius Zellner.

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. Juni 1909.)

I.

In meiner letzten Mitteilung¹ habe ich unter anderem gezeigt, daß in den Produkten des diastatischen Stärkeabbaues, wie er durch die Einwirkung von Pilzsäften hervorgerufen wird, neben Dextrin vorzugsweise Dextrose und nur verhältnismäßig wenig Maltose vorhanden sein dürfte. Ich hatte auch versucht, das quantitative Verhältnis dieser Stoffe festzustellen, doch waren die erhaltenen Resultate keine zufriedenstellenden. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich — wenigstens teilweise — in der Unzulänglichkeit der verwendeten analytischen Methoden. Deshalb versuchte ich eine andere Kombination analytischer Verfahren, welche bei einem künstlich hergestellten Gemisch von mit Alkohol gereinigtem Dextrin, reiner Maltose und Dextrose als brauchbar befunden worden war, auf die vorliegende Aufgabe anzuwenden. Das Verfahren besteht darin, daß die Stärke genau so wie in der letzten Abhandlung, p. 15, angegeben ist, mit Pilzsaft abgebaut, die Lösung auf ein kleines Volumen eingedampft, zur Abscheidung des Dextrins mit einem Überschuß von Alkohol versetzt, das Dextrin abfiltriert und gewogen wird; das Filtrat wird zur Vertreibung des Alkohols neuerdings eingedampft, auf ein gemessenes Volumen aufgefüllt und sodann die direkte wie auch die Inversionspolarisation durchgeführt. Genau dieselben Prozeduren werden auch

¹ Monatshefte für Chemie, 30, 231 (1909).

mit einer gemessenen Menge des Pilzsaftes vorgenommen. Aus diesen Bestimmungen lassen sich die gesuchten Werte berechnen; es ergab sich jedoch keine genügende Übereinstimmung mit den nach dem anderen Verfahren gewonnenen Resultaten, wenn sich auch deutlich zeigte, daß ein Gemisch von Dextrose mit einem stärker polarisierenden, in Alkohol löslichen und zu Traubenzucker abbaufähigen Kohlehydrat vorliegt.

Infolgedessen versuchte ich auf einem anderen Wege meine Vermutung, daß die durch den diastatischen Abbau gebildete Maltose durch eine Maltase sofort weiter hydrolysiert wird, zu bewahrheiten, und zwar dadurch, daß ich die Einwirkung des Pilzsaftes auf Maltose selbst studierte. Maltasen sind in niedriger organisierten Pilzen mehrfach nachgewiesen worden,¹ daher war ihr Vorhandensein im vorliegenden Falle sehr wahrscheinlich.

Die verwendete Maltose war vor ihrer Verwendung auf Reinheit geprüft worden.

Wasserverlust im Exsikkator 0·110/0, im Trockenschrank bei 105° 4·880/0 (berechnet 50/0). Eine einprozentige Lösung des Hydrats dreht die Ebene des polarisierten Lichtes um 7·6° Ventzke; 25 cm³ derselben Lösung reduzieren aus Fehling'scher Lösung 0·274 g Cu (nach der Wein'schen Tabelle berechnet 0·269 g).

Die Pilzsäfte wurden genau so hergestellt, wie ich in meiner vorigen Mitteilung angegeben habe. Für jeden Versuch wurden zwei Proben in der Weise hergestellt, daß genau je 1 g des Maltosehydrates in 100 cm³ des Pilzsaftes gelöst wurde; die eine Probe wurde zur Zerstörung des Enzyms in einer Kochsalzlösung während einer halben Stunde auf 100° erhitzt, während die andere unverändert gelassen wurde; hierauf wurden beide mit etwas Toluol versetzt und in einem Wasserbad durch 24 Stunden bei einer Temperatur von 40° digeriert. Dasselbe geschah mit einer gemessenen Menge des betreffenden Pilzsaftes. Sodann wurde nach dem Abkühlen und Wiederauffüllen bis zur Marke in allen drei Flüssigkeiten² das optische

¹ Literatur siehe Czapek, Biochemie der Pflanzen, 1905, I, p. 279.

² Wenn nötig, wird mit einer gemessenen Menge Bleiessiglösung geklärt.

Drehungsvermögen mittels eines Soleil-Ventzke-Scheibler'schen Apparates sowie auch das Reduktionsvermögen gegenüber Fehling'scher Lösung bestimmt.

Da 1 g Maltosehydrat, in 100 cm³ gelöst, die Ebene des polarisierten Lichtes um 7·60° Ventzke, 1 g Dextrose, in 100 cm³ gelöst, aber um 3·06° dreht, so gilt die Gleichung: $7\cdot60x + 3\cdot06(1-x) = d$, wobei x die Menge des Maltosehydrates und d die Drehung der Lösung nach der Inversion bedeutet.

Das Reduktionsvermögen wurde in je 25 cm³ (entsprechend 0·25 g Maltosehydrat oder Dextrose) bestimmt. 0·25 g Maltose (C₁₂H₂₂O₁₁+H₂O) reduzieren 0·274 g Cu, 0·25 g Dextrose hingegen 0·463 g; daher ist

$$\frac{0\cdot274}{0\cdot25}x + \frac{0\cdot463(0\cdot25-x)}{0\cdot25} = a,$$

wenn x die Menge des Maltosehydrates und a die Kupfermenge bedeutet, welche von 25 cm³ der invertierten Flüssigkeit reduziert wurde.

Ich habe zunächst mit dem Saft jener zwei Pilzspezies (*Polyporus fomentarius* L. und *igniarius* Fr.) gearbeitet, welche früher bei der Untersuchung des diastatischen Stärkeabbaues verwendet worden waren. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Spezies, Fundort, Dauer der Aufbewahrung des Pilz- materials vor der Verwendung	Kupfermenge in Grammen, welche von 25 cm ³ der betreffenden Lösung aus 80 cm ³ Fehling'scher Lösung reduziert wurde			Optisches Drehungs- vermögen in Ventzkegraden			Menge der zu Traubenzucker abgebauten Maltose in Prozenten	
	Pilzsaft	Maltoselösung, ungekocht	Maltoselösung, gekocht	Pilzsaft	ungekochte Lösung	gekochte Lösung	Reduktions- methode	Polarisations- methode
<i>Polyporus fomentarius</i> , Beskiden, 8 Tage	0·1915	0·5821	0·4595	0·2	4·8	7·6	62	67
<i>Polyporus igniarius</i> , Bielitz, 8 Tage	0·1172	0·5252	0·3852	0·0	4·2	7·4	72	75

Aus diesen Zahlen erhellt, daß eine kräftige Hydrolyse der Maltose stattgefunden hat. Die nach den beiden Methoden erhaltenen Werte stimmen genügend überein, wenn man berücksichtigt, daß es sich in beiden Fällen um indirekte Bestimmungsweisen handelt. Durch Anwendung konzentrierter Lösungen könnte man auch die Genauigkeit vergrößern, doch war die verwendete Konzentration wegen des Parallelismus mit den früheren Versuchen geboten.

Bei einer Reihe anderer Pilzarten begnügte ich mich mit dem polarimetrischen Nachweis der Maltosespaltung. Im übrigen wurden die Versuche genau so wie die vorigen durchgeführt.

Tabelle II.

Spezies, Fundort, Dauer der Aufbewahrung des Materials vor der Verwendung	Optisches Drehungsvermögen der Lösungen in Ventzkegraden			Menge der zu Traubenzucker abgebauten Maltose in Prozenten
	Pilzsaft	1 g Maltose in 100 cm ³ Pilzsaft		
		ungekocht	gekocht	
<i>Armillaria mellea</i> Vahl, Hallstatt, 6 Monate	5·0	8·5	12·5	90
<i>Hypholoma fasciculare</i> Huds., Mitterndorf im Salzkammergut, 6 Monate	4·9	10·2	12·5	51
<i>Daedalea quercina</i> Pers., Bielitz, 11 Monate	0·8	4·8	8·3	79
<i>Trametes suaveolens</i> Fr., Bielitz, 7 Monate	1·1	6·4	8·6	50

In sämtlichen Fällen zeigt sich eine kräftige fermentative Wirkung auf die Maltose, obwohl die Pilzpräparate zum Teil schon recht geraume Zeit gelegen hatten. Damit ist das Vorhandensein von Maltasen in den baumbewohnenden Pilzen sichergestellt.

II.

Vor einiger Zeit berichtete ich, daß in *Trametes suaveolens* Fr.¹ und *Polyporus igniarius* Fr.² ein Ferment vorhanden sei, welches imstande ist, Salicin zu spalten. Mit Rücksicht auf die ausgedehnten Untersuchungen von Bourquelot³ und Herissey⁴ über glykosidspaltende Enzyme in höheren Pilzen hielt ich ein näheres Eingehen auf diesen Gegenstand für überflüssig. Nun ist vor kurzem eine interessante Untersuchung von Sigmund⁵ erschienen, in welcher gezeigt wird, daß in Weiden und Pappeln ein Ferment enthalten ist, welches Salicin, nicht aber andere Glykoside (z. B. Amygdalin) spaltet und daher als ein vom Emulsin verschiedenes Enzym zu betrachten ist. Nachdem die oben genannten Pilze ausschließlich (*Trametes*) oder vorzugsweise (*Polyporus igniarius*) auf Weiden vorkommen, war die Frage naheliegend, ob das salicinspaltende Ferment derselben der Salikase der Weidenbäume oder aber dem Emulsin in seiner Wirkung analog ist.

Für die folgenden Versuche verwendete ich wässrige Auszüge, welche genau so wie die vorher erwähnten bereitet wurden. Je 1 g des betreffenden Glykosides wurde in einem 100 cm³-Kölbchen abgewogen und mit 100 cm³ Pilzsaft versetzt. Es wurden je zwei Proben in gleicher Weise hergestellt, die eine jedoch einige Zeit in siedender Kochsalzlösung zur Abtötung des Fermentes auf 100° erhitzt. Hierauf wurden beide Kolben nach Zusatz von Toluol in ein Wasserbad von 40° C. gebracht und 24 Stunden darin belassen. Nach dem Abkühlen, Auffüllen und Durchmischen wurde in je 25 cm³ der beiden Lösungen das Reduktionsvermögen gegen Fehling'sche Lösung bestimmt, außerdem in einigen Fällen die Anwesenheit der Spaltungsprodukte des betreffenden Glykosides qualitativ nachgewiesen. Die Resultate, welche bei *Trametes suaveolens* erhalten wurden, sind in der folgenden Tabelle III enthalten.

¹ Monatshefte für Chemie, 28, 757 (1907).

² Ebenda, 29, 1171 (1908).

³ Comptes rendus, 121, 693 (1895); 117, 383 (1893).

⁴ Bulletin de la société mycologique de France, 15 (1899).

⁵ Monatshefte für Chemie, 30, 231 (1909).

Tabelle III.

Glykosid	Kupfermenge in Grammen, welche aus 60 cm ³ Fehling'scher Lösung durch 25 cm ³ der Glykosidlösung reduziert wurde		Differenz im Reduktionsvermögen infolge der Hydrolyse des Glykosides	Bemerkung
	gekochte Probe	ungekochte Probe		
Salicin C ₁₃ H ₁₈ O ₇	0·1748	0·4064	0·2316	Eisenchlorid erzeugt im gekochten Saft eine graugelbe Fällung, im ungekochten eine schwarzviolette Färbung nebst Fällung. Etwa 76% des Glykosides sind gespalten.
Amygdalin C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	0·1753	0·4247	0·2494	Die ungekochte Probe zeigt starken Geruch nach Bittermandelöl und gibt die Blausäurereaktion, die gekochte nicht. Ungefähr 65% des Amygdalins wurden hydrolysiert.
Coniferin C ₁₆ H ₂₂ O ₈ + 2H ₂ O	0·1560	0·3048	0·1488	Ätherextrakt der ungekochten Probe gibt mit Chromsäuremischung Vanillingeruch. Die ungekochte Probe gibt mit Chromsäure eine rotbraune Färbung, die gekochte nicht. Etwa 64% gespalten.
Äsculin C ₁₅ H ₁₆ O ₉ + 1½ H ₂ O	0·2930	0·4430	0·1500	Die ungekochte Probe färbt sich mit Eisenchlorid viel tiefer grün wie die gekochte. Berechnung der Ausbeute ist hier nicht möglich, da auch Äsculetin stark reduziert.
Phloridzin C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀ + 2H ₂ O	0·1912	0·2020	0·0108	Äußerst geringe Einwirkung (6% des Glykosides sind hydrolysiert).

Es ergibt sich wohl eine selektive Wirkungsweise des Enzyms, da Salicin weitaus am leichtesten abgebaut wird, jedoch werden auch die anderen Glykoside mehr oder weniger leicht aufgespalten. *Polyporus igniarius* ergab ganz ähnliche Resultate, doch wurden nur einige Versuche quantitativ aus-

geführt. Es zeigte sich hier eine Erscheinung, welche ich sonst noch nie beobachtet hatte, nämlich die, daß der wässrige Auszug, ob kalt oder warm (bei 40°) bereitet, nahezu keine Wirkung auf die Glykoside ausübt, während das Pulver des Pilzes selbst eine ziemlich energische Reaktion zeigt. Daß die Hydrolyse auch bei anderen Spezies mit dem Pilzpulver rascher vor sich geht wie mit den wässrigen Extrakten, ist wohl nicht überraschend, da die Extraktion ja notwendigerweise eine unvollkommene ist. Eine gänzliche Wirkungslosigkeit des Wasserauszuges habe ich jedoch noch nie beobachtet und dieselbe ist auch durch unvollkommene Lösung des Enzyms nicht erklärlich. Wahrscheinlich ist das Ferment des *Polyporus igniarius* in Wasser nicht löslich; es gelang mir jedoch, durch Auslaugung mit schwacher (ein- bis zweiprozentiger) Kochsalzlösung einen einigermaßen wirksamen Auszug zu bereiten.

Schließlich habe ich auch noch die Wirkungsweise des glykosidspaltenden Fermentes von *Polyporus pinicola* untersucht. Dieser Pilz lebt ausschließlich auf Nadelholz und ich vermutete, daß das Enzym desselben lediglich auf Coniferin einwirkt. Die Versuchsergebnisse habe ich in der folgenden Tabelle IV (siehe p. 662) zusammengestellt.

Auch hier zeigt sich eine mit der Natur des Glykosids wechselnde Intensität der Enzymwirkung und es wird der Voraussetzung gemäß Coniferin verhältnismäßig leicht abgebaut. Doch werden wie bei den früher angeführten Versuchen auch die anderen Glykoside (darunter das Äsculin in hohem Maße) hydrolytisch gespalten. Nur das Phloridzin wird so gut wie gar nicht angegriffen. Bekanntlich wirkt Emulsin auf das zuletzt genannte Glykosid nicht ein, während es die andern vier hydrolysiert. Die glykosidspaltenden Fermente des *Trametes suaveolens* und des *Polyporus pinicola* sind in ihrer Wirkungsweise also dem Emulsin analog, die Identität dieser Enzyme halte ich aber sowohl aus systematischen Gründen wie auch wegen ihrer besonders kräftigen Wirkung auf Salicin beziehungsweise Coniferin für unwahrscheinlich.

Bei vaganten Parasiten, wie bei *Polyporus igniarius* und dem von Bourquelot bezüglich seiner glykosidspaltenden Wirkung genau untersuchten *Polyporus sulfureus*, ist das

Tabelle IV.

Glykosid	Kupfermenge in Grammen, welche aus 60 cm ³ Fehling'scher Lösung durch 25 cm ³ der Glykosidlösung reduziert wird		Differenz im Reduktionsvermögen infolge der Glykosidspaltung	Bemerkung
	gekochte Probe	ungekochte Probe		
Coniferin C ₁₆ H ₂₂ O ₃ + 2H ₂ O	0·0928	0·1896	0·0968	Reaktionen wie in Tabelle III. 41% des Glykosides gespalten.
Amygdalin C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	0·0860	0·2332	0·1472	Reaktionen wie oben angegeben; etwa 38% des Glykosides hydrolysiert; die Zahl ist zu hoch, da sich beim Abbau auch Ameisensäure bildet.
Salicin C ₁₃ H ₁₈ O ₇	0·0784	0·1560	0·0776	Reaktion wie oben. 25% des Glykosides gespalten.
Äsculin C ₁₅ H ₁₆ O ₉ + 1½H ₂ O	0·2220	0·5604	0·3384	Menge des abgebauten Glykosides nicht berechenbar, da auch Äsculetin stark reduziert; doch ist die Wirkung jedenfalls sehr intensiv.
Phloridzin C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀ + 2H ₂ O	0·1124	0·1144	0·0020	Keine Einwirkung.

Vorhandensein eines emulsinartigen Fermentes aus biochemischen Gründen begreiflich, da ein solcher Pilz in die Lage kommt, aus den verschiedenen Wirtspflanzen auch verschiedene Glykoside aufzunehmen; bei solchen Spezies jedoch, welche, wie *Trametes suaveolens* und *Polyporus pinicola*, an ganz bestimmte Gattungen von Nährpflanzen gebunden sind, wäre das Vorhandensein spezifischer Fermente (Salicase, Coniferase) von vornherein wahrscheinlich; der Versuch zeigt jedoch, daß dies nicht der Fall ist. Damit erscheint auch sichergestellt, daß das glykosidspaltende Enzym der weidenbewohnenden Pilze von demjenigen der Weidenbäume selbst verschieden ist.