

Zur Chemie der höheren Pilze.

V. Mitteilung: Über den Maisbrand (*Ustilago Maydis* Tulasne)

von

Dr. Julius Zellner.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. April 1910.)

Im Anschluß an meine früheren Arbeiten über die chemische Zusammensetzung parasitischer Pilze habe ich nunmehr den Maisbrand einer genaueren Untersuchung unterworfen. Dieser Pilz steht den früher untersuchten Arten (Polyporeen) systematisch ziemlich ferne und die Kenntnis seiner chemischen Beschaffenheit scheint daher geeignet zu sein, die Beantwortung der Frage näherzurücken, ob und inwiefern bei den parasitischen Pilzen der Verschiedenheit in der Organisation (der systematischen Stellung) eine Verschiedenheit in der chemischen Zusammensetzung entspricht.

Das Material wurde im September (zur Zeit der Sporenreife) in Frohnleiten (Steiermark) gesammelt, die Beulen und Auswüchse sorgfältig von den gesunden Gewebeteilen der Maispflanze befreit und sodann an der Luft getrocknet. Hierauf wurde das Material gröblich zerkleinert und durch ein feines Sieb geschüttet, um das Sporenpulver von dem degenerierten Gewebe zu trennen. Das erstere beträgt dem Gewichte nach drei- bis viermal soviel wie das letztere. Sporen und degeneriertes Gewebe wurden separat verarbeitet, und zwar wurde das Hauptgewicht auf die Untersuchung des Sporenpulvers gelegt, da man nur bei diesem sicher ist, wirklich bloß Pilzmaterial zu untersuchen, während in dem wenn auch sehr veränderten, vom Mycel durchsetzten Gewebe der Maispflanze das Vorhandensein von Stoffen, welche aus dieser und nicht

aus den Pilzhyphen stammen, zum mindesten nicht ausgeschlossen ist.

Über die chemischen Bestandteile des Maisbrandes liegt bereits eine Arbeit von Rademaker und Fischer¹ vor.

Die beiden Autoren fanden folgende Stoffe: eine krystallisierbare Base, welche in ihren Eigenschaften den Basen des Mutterkorns ähnlich zu sein scheint und Ustilagin genannt wurde, eine zweite amorphe Base und Trimethylamin, ferner eine in Nadeln krystallisierende Säure, die als Sklerotinsäure bezeichnet wurde, fettes Öl, Wachs, Harz, Chlorophyll, Zucker (nicht näher charakterisiert), Pektinstoffe, Extraktstoffe und Salze. Analysen des Ustilagins und der Sklerotinsäure liegen nicht vor. Sporen und Gewebe wurden, wie es scheint, zusammen verarbeitet. Leider war mir die Originalabhandlung nicht zugänglich. Die in dem zitierten Referat für die Mengen der einzelnen Stoffe angegebenen Prozentzahlen sind größtenteils unrichtig, und zwar viel zu hoch.

Im ganzen habe ich etwa 10 kg der Pilzwucherungen (lufttrocken gewogen) verarbeitet, welche zu ungefähr gleichen Teilen 1907 und 1909 gesammelt worden waren. Fast die ganze Untersuchung ist zweimal ausgeführt worden.

I. Mineralstoffe.

Das lufttrockene Sporenpulver enthält im Mittel von drei Bestimmungen 10·86% Wasser und 4·14% Asche (auf Trockensubstanz gerechnet 4·64%).² Die Asche ist sehr hygroskopisch und zeigt folgende Zusammensetzung:

K ₂ O	55·02%	SO ₃	4·49%
Na ₂ O	0·40	P ₂ O ₅	17·96
MgO	3·90	SiO ₂	4·44
CaO	1·74	Freier C	0·05
Fe ₂ O ₃ + Al ₂ O ₃	1·04	CO ₂ und Verlust	6·63
Cl	4·33		

Die gefundenen Werte bieten nichts Auffallendes dar und liegen den Zahlen nahe, die man bei der Analyse verschiedener anderer Pilzaschen erhalten hat. Im wässrigen Auszug des Sporenpulvers findet man sehr viel K, sämtliches Cl, reichliche

¹ Zeitschr. d. allgem. österr. Apothekervereines, 25, p. 419 (1887).

² Parsons (Pharmaz. Journal 1882, p. 810) fand 5·47% Asche.

Mengen von P_2O_5 , hingegen nur sehr wenig Ca und Mg und nur Spuren von SO_3 . Daraus folgt, daß das Kalium in den Sporen teils als (saurer) Phosphat, teils als Chlorid (siehe p. 627) sowie in Form organisch-saurer Salze vorliegt. Ca und Mg dürften zum Teil wohl auch als saure Phosphate vorhanden sein, zum Teil in Form unlöslicher organischer Verbindungen.

II. Petrolätherauszug.

Die lufttrockenen Sporen enthalten etwa 1·4% ihres Gewichtes an Stoffen, welche in Petroläther löslich sind. Das degenerierte Gewebe ist reicher an solchen Körpern. Da die Sporen infolge ihrer derben Membranen schwer extrahierbar sind, müssen sie vor der Extraktion getrocknet werden oder man zieht mit ätherhaltigem Alkohol aus, verdampft das Lösungsmittel und schüttelt den Rückstand mit Petroläther aus. Dieser Petrolätherextrakt ist dunkel gefärbt, das Rohfett aus den Sporen mehr rotbraun als dasjenige aus dem Gewebe; es zeigt in beiden Fällen einen eigentümlichen, nicht unangenehmen Geruch, ist dickflüssig, wird aber auch bei 0° noch nicht fest, sondern bloß salbenartig. Nach längerem Stehen zeigt sich eine mikrokristallinische Ausscheidung, herrührend von ergosterinartigen Stoffen, welche in dem Gewebeöl reichlicher vorhanden sind wie im Sporenöl. Stets zeigt sich ein beträchtlicher Gehalt an harzigen, unverseifbaren Stoffen. Die folgende Tabelle enthält einige analytische Daten zur Charakterisierung des Rohfettes. Alle Werte wurden doppelt bestimmt.

	Sporenöl (1907)		Sporenöl (1909)		Gewebeöl (1909)	
	Rohfett	auf Reinfett berechnet	Rohfett	auf Reinfett berechnet	Rohfett	auf Reinfett berechnet
Säurezahl	84·0	98·8	96·6	110·3	109·0	121·1
Verseifungszahl . . .	166·8	196·2	175·1	199·9	171·2	190·2
Jodzahl	68·1	80·1	68·0	77·6	72·8	80·9
Unverseifbares . . .	15·0	—	12·4	—	10·0	—
Säurezahl der unlöslichen Fettsäuren	—	199·0	—	202·0	—	193·1
Brechungsquotient bei 20° C.	1·470	—	1·468	—	1·478	—

Die Säurezahl ist sehr hoch, was bei Pilzfetten sehr häufig vorkommt, hier indessen auffallend ist, da die Sporen doch Dauerformen sind, in denen man das Fett bis zur Zeit der Keimung unzersetzt erwarten sollte. Übrigens habe ich diese Erscheinung auch bei Sporen anderer Pilze beobachtet.¹ Die übrigen Zahlen bieten nichts Auffallendes dar. Zum Vergleich wurde Maisöl (aus Körnern vom selben Feld) analysiert; es zeigte die Säurezahl 3·38, die Verseifungszahl 200·0, die Jodzahl 110·1, den Brechungsquotienten 1·476 und enthält nur sehr geringe Mengen unverseifbarer Bestandteile.

Das aus den Sporen gewonnene Rohfett wurde mit alkoholischer Lauge verseift und die Lösung mit Petroläther erschöpfend ausgeschüttelt. Der nach dem Verdampfen des Petroläthers hinterbleibende Rückstand ist eine salbenartige, etwas trübe, rotbraune Masse. Dieselbe wurde mit Essigsäureanhydrid einige Stunden gekocht, das Reaktionsprodukt mit Alkohol versetzt und erwärmt, wobei sich eine schwarze harzige Masse ausschied, während ein in warmem Alkohol leicht lösliches Acetylprodukt in Lösung ging, das beim Erkalten auskrystallisierte. Dasselbe kann durch Umkrystallisieren aus Alkohol-Benzol- oder Alkohol-Petroläthermischung gereinigt werden und bildet perlmutterglänzende, unter dem Mikroskop als sechsseitige Blättchen erscheinende Krystalle, welche in Benzol und Petroläther leicht löslich sind, mit konzentrierter Schwefelsäure die Liebermann'sche Reaktion geben und eine Schmelzlinie von 147 bis 157° zeigen. Die Ausbeute ist sehr gering. Der Körper ist nicht einheitlich, sondern ein Gemisch von Acetylprodukten ergosterinartiger Stoffe. Später fand ich, daß man die Acetylierung umgehen und aus dem oben erwähnten amorphen Petrolätherextrakt sehr einfach die ergosterinartigen Körper dadurch krystallisiert erhalten kann, daß man den Rückstand in wenig heißem Petroläther löst und den letzteren abdunsten läßt. Man saugt die Krystallisation ab und reinigt sie durch Umkrystallisieren aus heißem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle. Das nach zweimaligem Umkrystallisieren erhaltene Produkt bildet unter dem Mikroskop als sechsseitige

¹ Monatshefte für Chemie, 1906, p. 123.

Tafeln erscheinende Krystalle, ganz ähnlich den in anderen Pilzen aufgefundenen Ergosterinen. Es schmilzt bei 128 bis 138° und gibt sehr schön die Liebermann'sche sowie die Hesse-Salkowski'sche Reaktion. Die Ausbeute ist sehr gering, etwa 0·6% auf Rohfett gerechnet. Der Körper ist nicht einheitlich. Die Hauptmenge der unverseifbaren Stoffe bildet ein tiefrotbraunes Harz.

Das aus dem degenerierten Gewebe erhältliche Fett zeigt in seinen Konstanten keine besonders auffälligen Abweichungen von dem Sporenfett. Es ist etwas heller gefärbt, enthält etwas weniger Harz und daher auch weniger Unverseifbares, dafür etwas mehr von den ergosterinartigen Körpern. Die Ausbeute an letzteren betrug, auf Rohfett gerechnet, etwa 1·3%. Sie sind den aus dem Sporenöl gewonnenen sehr ähnlich. Wenn man bedenkt, daß diese Körper höchstens in Hundertelprozenten im ursprünglichen Material vorhanden sind, so wird es begreiflich, daß man selbst bei Verarbeitung großer Substanzmengen nur so wenig davon erhält, daß eine Trennung der Gemische unmöglich ist. Dazu kommt noch, daß das Produkt aus dem Gewebeöl noch Phytosterin aus der Maispflanze enthalten kann.

Was den verseifbaren Anteil betrifft, so wurde bloß das Sporenfett untersucht. Die Seife wurde mit Salzsäure zersetzt, die Fettsäuren scheiden sich als fast schwarze Masse ab, welche öfters schwer sich scheidende Emulsionen (z. B. beim Ausschütteln mit Äther) bildet. In der wässerigen Unterlage finden sich geringe Mengen flüchtige Fettsäuren, etwas Glycerin und Cholin sowie aus Lecithin abgespaltene Phosphorsäure. Die Fettsäuren selbst sind anfangs flüssig, krystallisieren aber bei längerem Stehen teilweise. Sie wurden mit Hilfe der Bleisalze getrennt. Die in Äther löslichen Bleisalze lieferten nach der Zersetzung eine ölige Substanz, welche vorzugsweise aus Ölsäure besteht.

	Gefunden	Für Ölsäure berechnet
Verseifungszahl.....	197·0	198·5
Jodzahl	85·2	90·0

Außerdem ist der dunkle Körper, welcher durch alle chemischen Operationen mit hindurchgeht, vorhanden. Mehrfach

ungesättigte Säuren dürften wohl nicht vorhanden sein. Unter der letzteren Annahme ergibt sich, daß 85 bis 90% des Fettes aus Ölsäure und deren Glyzerid bestehen. Die festen Fettsäuren, deren relative Menge also nur gering ist, wurden aus dem im Äther unlöslichen Bleisalz abgeschieden, auf Tonplatten von noch anhaftenden öligen Anteilen befreit und aus Alkohol umkrystallisiert. Sie sind ein Gemisch, welches eine Schmelzlinie von 48 bis 70° und eine Säurezahl von 190 bis 196 zeigt. Eine Trennung der Bestandteile würde weit mehr Material erfordern, als zur Verfügung stand.

III. Der Ätherextrakt.

Derselbe beträgt etwa 0·6% vom Gewicht des Sporenpulvers und ist rotbraun gefärbt. Er wird mit heißem Wasser behandelt, wobei ein Harz ungelöst bleibt, welches halbfest, in Alkohol und Aceton leicht, in Benzol wenig und in Petroläther fast unlöslich ist. Es ist also von dem Harz des Petrolätherauszuges verschieden. In wässrigem Alkali ist es löslich und daraus durch Säuren fällbar. Die alkoholische Lösung des Harzes gibt mit Kupferacetat eine braune, mit Bleizuckerlösung eine graugelbe, mit Bleiessig eine ähnliche, heller gefärbte, mit Quecksilberoxydnitratlösung eine hellbraune, mit Silbernitrat sowie mit Kaliumbichromat eine bräunliche Fällung. Mit Ammoniak oder Alkalien färbt sich die Lösung dunkler und hellt sich beim Ansäuern wieder auf. Mit Eisenchlorid entsteht eine dunkelolivgrüne Färbung. Das Harz bildet den Hauptbestandteil des Ätherauszuges. Das degenerierte Gewebe liefert ein ganz ähnliches Harz, aber relativ weniger.

Die wässrige Lösung wird konzentriert, wobei sich eine Substanz in feinen Nadeln ausscheidet. Es ist dies die von Fischer und Rademaker entdeckte sogenannte Sklerotinsäure. Durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser kann die Substanz in zentimeterlangen, haardünnen, leicht sich verfilzenden Nadeln gewonnen werden. In kaltem Wasser ist sie ziemlich schwer, in Alkohol leicht löslich. Die möglichst gereinigte Säure sintert bei 155° und schmilzt unscharf bei 169°. Es ist trotz des homogenen Aussehens nicht ausgeschlossen, daß ein Gemisch vorliegt. Die Substanz ist nicht, wie ich anfangs

vermutete, mit Fumarsäure identisch. Leider ist die Ausbeute so gering, daß nicht einmal die Durchführung von Elementaranalysen möglich war. Vielleicht läßt sich durch eine andere Isolierungsweise die Ausbeute erhöhen, was später versucht werden soll. Jedesfalls war der außerordentlich geringe Prozentsatz, in welchem die Säure sich vorfindet, die Ursache, warum die Entdecker das Studium dieser interessanten Substanz nicht weiter verfolgt haben. Aus dem degenerierten Gewebe konnte sie nicht erhalten werden.

IV. Der Alkoholauszug.

Der dunkel gefärbte Extrakt beträgt etwa 3% des Rohmaterials. Er wird mit Wasser behandelt, wobei nur ein geringer Anteil ungelöst bleibt, welcher nach gründlichem Auswaschen mit Wasser und mit Äther, worin er fast unlöslich ist, ein Pulver von bräunlicher Farbe bildet, dessen rotgelbe alkoholische Lösung mit Alkali oder Ammoniak eine dunkelrotbraune Farbe annimmt und durch Bleiacetat gefällt wird. Auch in wässrigen Basen ist der Körper löslich und wird daraus durch Salzsäure wieder gefällt. Mit Eisenchlorid gibt die alkoholische Lösung eine olivenbraune Färbung. Charakteristisch ist das Verhalten des Körpers beim Erhitzen; zuerst schmilzt er, dann zersetzt er sich unter sehr starkem Aufblähen, welches an die sogenannten Pharaoschlangen erinnert. Es liegt offenbar ein Phlobaphen vor, sehr ähnlich jenem, welches ich seinerzeit aus *Polyporus igniarius* darstellte. Auch dieser Stoff findet sich nur in sehr geringer Menge (Hundertelprozenten) vor.

Der oben erwähnte wässrige Auszug wird auf dem Wasserbade konzentriert, der sirupöse Rückstand mit 95prozentigem Alkohol im zehnfachen Überschuß versetzt und erwärmt. Dabei bleibt ein Teil ungelöst; es sind dies gummiartige Stoffe, welche bei der ursprünglichen Extraktion mit großen Mengen 95prozentigen Alkohols infolge des Wassergehaltes desselben in Lösung gegangen waren. Von diesen Stoffen wird abgessogen und die klare alkoholische Lösung konzentriert. Dieselbe scheidet nach einigem Stehen eine reichliche Krystallisation ab, welche abgesaugt und durch Umkrystallisieren aus siedendem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle leicht farblos

erhalten wird. Die Krystallisation erweist sich durch die Schmelzlinie 110 bis 160° und das Aussehen unter dem Mikroskop (nadelförmige und oktaedrische Krystalle) als ein Gemisch. Zur Trennung der Komponenten muß eine fraktionierte Krystallisation (aus Alkohol) durchgeführt werden, welche man dadurch abkürzen kann, daß man durch langsame Krystallisation möglichst große Krystallindividuen zur Ausscheidung bringt und diese mechanisch durch Auslesen trennt, was bei dem sehr verschiedenen Aussehen derselben nicht sehr schwierig ist. Schließlich gelingt die Isolierung zweier unter dem Mikroskop fast völlig einheitlicher Stoffe. Der in Alkohol schwerer lösliche bildet aus Alkohol Nadeln, aus Wasser Prismen, welche bei 165 bis 166° schmelzen. Er ist optisch inaktiv. Seine Analyse ergab:

0·252 g Substanz lieferten 0·1750 g H₂O und 0·3645 g CO₂.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für C ₆ H ₁₄ O ₆
H	7·71	7·69
C	39·44	39·56

Der Körper ist also Mannit. Der Schmelzpunkt eines Gemisches mit auf andere Weise gewonnenem Mannit lag bei 165°.

Der zweite in Alkohol etwas leichter lösliche Körper bildet, aus Alkohol oder Wasser krystallisiert, körnige Krystalle, schmeckt stark süß, ist optisch inaktiv, reduziert Fehling'sche Lösung nicht, ist schon bei 110° etwas flüchtig und schmilzt bei 111 bis 113°.

0·280 g Substanz ergaben bei der Verbrennung 0·2045 g H₂O und 0·4025 g CO₂.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für C ₄ H ₁₀ O ₄
H	8·11	8·19
C	39·20	39·34

Diese Daten weisen auf Erythrit hin. In der Tat ergab sich der Schmelzpunkt eines Gemisches dieses Körpers mit

einem Merk'schen Erythrit (vom Schmelzpunkt 112 bis 114°) zu 112 bis 114°. Zur völligen Sicherstellung der Identität wurde auch das Acetylprodukt dargestellt: 3 g des Körpers wurden mit der vierfachen Menge Essigsäureanhydrid und einigen Körnchen wasserfreiem Chlorzinks 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Flüssigkeit erkalten gelassen und in Wasser gegossen, wobei das Acetylprodukt sofort krystallinisch ausfällt. Es wird abgesaugt und zweimal aus wässrigem Alkohol, zuletzt unter Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert; es bildet körnige, unter dem Mikroskop als rhombische oder monokline Prismen erscheinende, völlig einheitlich aussehende Krystalle, welche bei 83 bis 85° schmelzen, in Wasser schwer, in wässrigem und absolutem Alkohol sowie in Äther gut löslich sind und einen bitteren Geschmack besitzen. Der Körper siedet über 300° ohne wesentliche Zersetzung. Die Analyse ergab:

0·3932 g Substanz lieferten 0·2223 g H₂O und 0·7101 g CO₂.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für C ₁₂ H ₁₈ O ₈
H	6·23	6·20
C	49·25	49·65

Zum Vergleich wurde aus einem großkrystallisierten, reinen Merk'schen Erythritpräparat das Tetraacetylprodukt dargestellt. Es zeigte genau das gleiche Aussehen, dieselben Eigenschaften und den Schmelzpunkt 83 bis 85°. Auch der Schmelzpunkt des Gemisches lag bei 83 bis 85°.

Damit ist das Vorhandensein von Erythrit wohl einwandfrei nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist vom phytochemischen Standpunkt aus wichtig, da Erythrit bisher nur in Algen und (als Ester) in Flechten aufgefunden, bei Pilzen aber noch nicht nachgewiesen worden ist. Der Körper findet sich in den Maisbrandsporen viel reichlicher wie Mannit (etwa fünfmal soviel). Die Ausbeute an diesen beiden Stoffen beträgt etwa 0·6 bis 0·8%.

Aus dem degenerierten Gewebe wird auf gleiche Weise eine Krystallisation erhalten, welche bei 110 bis 116° schmilzt

und unter dem Mikroskop völlig einheitliche, dem Erythrit angehörige Krystallformen zeigt, so daß sie als nahezu reiner Erythrit angesehen werden kann. Mannit ist, wenn überhaupt, so nur in Spuren vorhanden.

Die Mutterlauge von der ersten Krystallisation des Mannit-Erythritgemisches wurde geteilt. Der eine Teil wurde nach Beseitigung des Alkohols mit Phenylhydrazinchlorhydrat und essigsauerm Natrium versetzt und in bekannter Weise das Glukosazon gewonnen, welches nach vier- bis fünfmaligem Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol den Schmelzpunkt 205° und die sonstigen Eigenschaften dieses Körpers zeigte. Die Menge des Traubenzuckers ist jedoch gering und dürfte 0.1% der Trockensubstanz kaum erreichen.

Der andere Teil der Mutterlauge wurde mit Bleiacetat versetzt, wobei eine geringe Fällung entsteht, aus welcher man nach dem Entbleien mit H_2S eine kleine Menge eines stark sauren, nicht krystallisierenden Sirups erhält. Derselbe enthält jedesfalls organische Säuren, welche nicht identifiziert werden konnten, ferner scheint auch ein Gerbstoff vorhanden zu sein ($FeCl_3$ gibt eine braunviolette, $K_2Cr_2O_7$ eine rote Färbung, Kupferacetat eine grünliche Fällung).

Das Filtrat von der Bleizuckerfällung wurde zur weiteren Reinigung mit Bleiessig geklärt, mit verdünnter Schwefelsäure vom Bleiüberschuß befreit und die schwach schwefelsaure Lösung mit Kaliumquecksilberjodid versetzt. Es fällt ein gelber krystallinischer Niederschlag heraus, welcher mit kaltem Wasser gewaschen und in bekannter Weise auf Basen verarbeitet wird. Mit Sicherheit konnte die Anwesenheit von Trimethylamin nachgewiesen werden, ebenso das Vorhandensein einer zweiten, nicht flüchtigen Base, welche wahrscheinlich Ustilagin ist oder demselben nahesteht, doch wegen zu geringer Menge nicht näher untersucht werden konnte. Die zuletzt genannten Körper wurden im Auszug der Sporen nachgewiesen, der Gewebeextrakt wurde nicht weiter untersucht.

V. Der wässrige Auszug.

Das mit Alkohol extrahierte Sporenpulver gibt an heißes Wasser 9 bis 11% seines Gewichtes an löslichen Substanzen

ab. Diese Lösung ist dunkelbraungelb und etwas opalisierend. Sie wird konzentriert und mit Alkohol gefällt. Es scheidet sich eine gelbliche, aus zusammenhängenden Flocken bestehende Masse aus, welche durch Wiederauflösen in Wasser (eventuell unter Zusatz von Salzsäure in der Kälte) und neuerliches Ausfällen mit Alkohol gereinigt wird. Der Zusatz von Salzsäure ist darin begründet, daß das Kohlehydrat nach Art des arabischen Gummis wenigstens teilweise an Basen, und zwar an Kali gebunden zu sein scheint. Die feuchte Fällung wird mit Äther gewaschen, zuerst im Vakuumexsikkator und schließlich im indifferenten Gasstrom vollends getrocknet. Sie ist nämlich in feuchtem Zustand auffallend luftempfindlich und färbt sich rasch dunkel. Diese Erscheinung habe ich auch in ähnlichen Fällen bei anderen Pilzen beobachtet.¹ Getrocknet und zerrieben, bildet der Körper ein gelbliches Pulver, welches nur wenig Mineralsubstanz enthält, in heißem Wasser leicht, in kaltem langsam löslich ist. Die Lösungen opalisieren schwach, reagieren deutlich sauer, sind etwas klebrig und werden durch Bleizucker nicht, wohl aber durch Bleiessig gefällt. Eisenchlorid fällt die Substanz als Gallerte, ebenso Fehling'sche Lösung (besonders beim Kochen), wobei keine Reduktion eintritt. Wohl aber zeigt sich eine solche in starkem Maße, wenn die Substanz vorher einige Zeit mit etwas verdünnter Salzsäure gekocht worden war. Aus all diesen Eigenschaften geht hervor, daß der Körper ein gummiartiges Kohlehydrat ist.

Aus dem Filtrat von der ersten Alkoholfällung scheiden sich nach einiger Zeit würfelförmige Krystalle aus, welche abgesaugt und aus heißem Wasser umkrystallisiert wurden. Sie erwiesen sich als Chlorkalium, welches also präformiert im Pilz anzunehmen ist. Außer diesem Salz enthält die Lösung Körper, welche (nach Beseitigung des Alkohols) durch Bleizucker und Quecksilberoxydnitrat gefällt werden können. Sie sind saurer Natur und keine durch Salzsäure abbaufähigen Kohlehydrate. Es gelang mir vorläufig nicht, sie näher zu charakterisieren.

¹ Monatshefte für Chemie, 1906, p. 115; 1907, p. 1290.

Der aus dem nativen Material kalt bereitete Wasser-auszug wurde auf Eiweiß geprüft. Die opalisierende, sauer reagierende Lösung gibt beim Kochen für sich oder unter Zusatz von etwas Essigsäure nur eine schwache Trübung, keine Fällung, so daß lösliche Eiweißstoffe nur in sehr geringer Menge vorhanden sein können. Das geht auch aus den Stickstoffbestimmungen in den ursprünglichen und den mit kaltem Wasser erschöpften Sporen hervor (siehe unten p. 632).

Von Fermenten findet sich ein kräftig wirkendes invertierendes Enzym vor, wie die folgenden Versuche zeigen:

1. Eine Lösung von 0·5 g Rohrzucker in 50 cm^3 Wasser wurde mit 5 g Sporenpulver bei gewöhnlicher Temperatur durch 48 Stunden digeriert, sodann in 25 cm^3 das Reduktionsvermögen (nach Meissl) bestimmt; es wurden gefunden 0·3495 g Cu. Bei einem Parallelversuch ohne Zucker, sonst gleichen Bedingungen betrug die Menge des reduzierten Kupfers 0·0045 g. Somit wurden 76 $\frac{0}{10}$ des Rohrzuckers invertiert.

2. 1 g Rohrzucker wurde in 50 cm^3 Pilzsaft, welcher durch 24stündiges Digerieren des Sporenpulvers mit der zehnfachen Menge Wassers erhalten worden war, gelöst und 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde auf 100 cm^3 aufgefüllt und in 10 cm^3 dieser Lösungen das Reduktionsvermögen bestimmt. Es wurden gefunden 0·2076 g Cu. Derselbe Versuch, mit gekochtem Pilzsaft durchgeführt, ergab 0·0297 g Cu. Daraus berechnet sich, daß 94 $\frac{0}{10}$ des Rohrzuckers invertiert worden sind.

Hingegen konnte die Anwesenheit einer Diastase nicht mit Sicherheit konstatiert werden. Die Versuche wurden genau wie oben ausgeführt, nur statt Rohrzucker Lintner'sche Stärke verwendet.

1. In 50 cm^3 Wasser 0·6025 g Lintner'sche Stärke (= 0·5 g Trockensubstanz) gelöst, 48 Stunden mit 5 g Sporenpulver digeriert; 25 cm^3 reduzierten 0·021 g Cu. Der Leerversuch (ohne Stärke) ergab 0·008 g Cu.

2. 1·205 g Lintner'sche Stärke (= 1 g Trockensubstanz) in 50 cm^3 Pilzsaft gelöst, 48 Stunden digeriert, auf 100 cm^3 aufgefüllt; davon 25 cm^3 zum Reduktionsversuch verwendet, gefunden 0·0375 g Cu. Parallelversuch mit gekochtem Saft 0·0285 g Cu.

Auch eine Maltase ließ sich nicht nachweisen.

Das Drehungsvermögen einer dreiprozentigen Maltosehydratlösung war nach 2 Tagen, ob gekochter oder ungekochter Pilzsaft verwendet worden war, genau dasselbe.

Ebenso gelang es nicht, das Verhandensein eines peptonisierenden Fermentes nachzuweisen. Weder bei Albumin noch bei Casein (mit oder ohne Salzsäurezusatz) ließ sich eine merkliche Peptonisierung dieser Eiweißkörper feststellen.¹ Wohl aber ist ein fettspaltendes Enzym vorhanden. Die Versuche wurden wie in früheren Fällen² angestellt. Es kam Oliven-, Mais- und Rüböl zur Verwendung.

	Olivenöl		Rüböl		Maisöl	
	Säurezahl	Prozente Fett gespalten	Säurezahl	Prozente Fett gespalten	Säurezahl	Prozente Fett gespalten
Zu Beginn	1·72	0·89	10·07	5·73	3·38	1·69
Nach 4 Wochen	134·2	69·53	142·5	81·89	113·4	56·70
Nach 6 Wochen	138·8	71·91	142·5	81·89	118·5	59·25
Verseifungszahl	193·0	—	174·0	—	200·1	—

Die Wirkung des Enzyms ist eine recht kräftige, wie sich schon früher bei Sporen anderer Pilze gezeigt hat.³ Maisöl wird nicht leichter gespalten wie die anderen Öle. Daraus ist zu schließen, daß das Ferment wohl hauptsächlich nur für den internen Stoffumsatz der Sporen bei der Keimung (sowie beim Rizinussamen) von Bedeutung ist.

¹ Nach Herzberg (Zopf's Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen. 5. Heft, 1895) vermögen, wie aus Kulturversuchen zu schließen ist, die zur Gruppe des *Ustilago carbo* D. C. gehörigen fünf Arten: *U. Jensenii*, *avenae*, *perennans*, *hordei* und *tritici*, Traubenzucker und Rohrzucker leicht, Milchsücker wenig oder nicht, Galaktose überhaupt nicht zu assimilieren. Die drei erstgenannten Arten können auch Maltose sowie Mannit, weniger gut Stärke verarbeiten. Alle fünf Spezies sind auch imstande, Dextrin, Inulin und auch Glyzerin zu assimilieren; ferner enthalten sie eine peptonisierendes Ferment, wie Kulturversuche auf Nährgeatine ergaben, aber kein Labferment. Aus mikroskopischen Untersuchungen schließt der Autor auch auf ein zelluloselösendes Enzym.

² Monatshefte für Chemie, 1906, p. 119.

³ Monatshefte für Chemie, 1906, p. 126.

VI. Der alkalische Extrakt.

Das mit Alkohol und Wasser erschöpfte Sporenpulver wird mit zehnpromzentiger Lauge am Wasserbad erwärmt. Dabei tritt tiefgreifende Zersetzung unter Braunfärbung ein und es geht viel Substanz in Lösung. Diese Lösung gibt nach dem Absättigen mit Essigsäure auf Alkoholzusatz eine fädige, zu einem Klumpen sich zusammenballende Fällung (*A*), während ein Teil der durch Alkali gelösten Stoffe in Lösung bleibt (*B*). Die Fällung *A* erhärtet nach dem Auswaschen mit Alkohol zu einer schwarzen, etwas elastischen Masse, welche in Alkali leicht, aber auch in Wasser langsam löslich ist; diese wässrige Lösung ist fast vollständig fällbar durch Bleiessig oder Eisenchlorid und Ammoniak, teilweise fällbar durch Bleizucker und Fehling'sche Lösung, welche beim Kochen nicht reduziert wird. Kocht man die wässrige Lösung mit verdünnter Salzsäure, so fällt ein feiner schwarzer Niederschlag aus, welcher in Lauge löslich und daraus wieder durch Säuren fällbar ist, ein anderer Teil bleibt in Lösung. Diese letztere gibt nach der Neutralisation eine starke Kupferoxydulausscheidung mit Fehling'scher Lösung und liefert mit essigsauerm Phenylhydrazin ein krystallisiertes Osazon. Destilliert man die Substanz *A* mit Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·06, so gibt das Destillat keine Reaktion mit essigsauerm Anilin, wohl aber eine deutliche Fällung mit Phloroglucin. Die Maquenne'sche Reaktion auf Methylfurol gibt ein negatives Resultat. Das ganze Verhalten des Stoffes oder Stoffgemisches weist auf ein Kohlehydrat hin, welches mit den als Hemizellulosen bezeichneten Stoffen Ähnlichkeit zeigt. Bedenkt man, daß der größere Teil der derben Sporenmembranen, welche das Hauptgewicht des Sporenpulvers ausmachen, in Lauge löslich ist, so wird man nicht anstehen, zu sagen, daß es sich hier um Körper handelt, welche eine der Reservezellulose gewisser Samen analoge Funktion und Zusammensetzung besitzen, nur daß hier wahrscheinlich stickstoffhaltige Abkömmlinge der Chitin enthaltenden Membransubstanz vorliegen. Ich sage: wahrscheinlich, weil es bisher nicht gelang, diese Körper in genügend reinem Zustand zu erhalten und zu konstatieren, ob der vorhandene Stickstoff

ihnen selbst oder gewissen Begleitstoffen angehört. Das Filtrat *B* ist durch Bleiessig fällbar; nach dem Entbleien erhält man gummiartige Stoffe, welche nicht näher untersucht wurden.

VII. Unlöslicher Rückstand.

Die nach der Laugenbehandlung zurückbleibende Masse wird gut mit heißem Wasser gewaschen, dann mehrfach mit Wasser ausgekocht, schließlich kalt mit sehr verdünnter Essigsäure digeriert, neuerdings ausgewaschen und getrocknet. Sie stellt eine schwarze, harte, krümelige Masse dar, welche unter dem Mikroskop die einzelnen Sporen nicht mehr erkennen läßt. Diese Substanz wurde in heißem Wasser suspendiert und in dieses so lange Natriumperborat portionenweise eingetragen, bis das Unlösliche gelblich geworden war. Nun wurde filtriert, gut ausgewaschen und der Rückstand mit kalter verdünnter NaOCl-Lösung so lange behandelt, bis er völlig weiß geworden war, sodann auf einem Leinenfilter abgesaugt und gut ausgewaschen, was viel Zeit erfordert. Das Trocknen muß bei gewöhnlicher Temperatur geschehen, da der Körper im feuchten Zustand höchst empfindlich ist und beim Erwärmen sich rasch gelb bis schwarz färbt. Selbst bei gewöhnlicher Temperatur wird er beim Trocknen dunkler und stellt schließlich eine gelbliche oder grünliche, krümelige Masse dar. Nach Scholl¹ ermöglicht die Laugenbehandlung eine Reindarstellung des Chitins bei *Boletus edulis* Bull. Hier war das augenscheinlich nicht der Fall, wie die folgenden Analysen zeigen:

1. Das ursprüngliche Sporenpulver (getrocknet): 3·6110 g gaben 0·1675 g Asche, 1·1000 g verbrauchten nach Kjeldahl zur Absättigung des gebildeten Ammoniaks 22·0 cm³ 1/10 normaler H₂SO₄.

2. Mit kaltem Wasser erschöpftes Sporenpulver: 2·221 g gaben 0·014 g Asche, 1·3056 g verbrauchten 23·0 cm³ 1/10 normaler H₂SO₄.

3. Mit zehnprozentiger Lauge behandeltes, dann ausgewaschenes Material: 2·686 g gaben 0·057 g Asche, 1·6425 g verbrauchten 30·25 cm³ 1/10 normaler H₂SO₄.

4. Material wie 3. aber noch mit Natriumperborat und NaOCl gebleicht: 1·488 g gaben 0·0205 g Asche, 1·2078 g verbrauchten 20·5 cm³ H₂SO₄. In Prozenten:

¹ Monatshefte für Chemie, 29 (1908), p. 1023.

	Asche	Stickstoff	Stickstoff, auf aschefreie Substanz gerechnet
1	4·64	2·80	2·93
2	0·63	2·46	2·47
3	2·12	2·58	2·62
4	1·37	2·38	2·41

Aus diesen Zahlen ergibt sich folgendes: Durch die Behandlung mit kaltem Wasser sinkt der Stickstoffgehalt merklich, was begreiflich ist, da Eiweißstoffe, Fermente, Basen etc. in Lösung gehen. Die nun folgende Behandlung mit Lauge hätte, wie zu erwarten stand, ein starkes Ansteigen des Stickstoffgehaltes in der Zellsubstanz bewirken sollen, was jedoch nicht der Fall ist. Die geringe Abnahme des Stickstoffgehaltes bei der folgenden Einwirkung der Bleichmittel mag eine Folge der Oxydationswirkung sein, liegt aber schon an der Grenze der analytischen Fehler.

Da bei der Laugenbehandlung relativ große Substanzmengen in Lösung gehen, der Stickstoffgehalt des Rückstandes aber fast unverändert bleibt, so mußten die in Alkali löslichen Stoffe auch erhebliche Mengen Stickstoff enthalten, was auch experimentell nachgewiesen wurde. Sie können also der Hauptsache nach nicht Kohlehydrate sein, wie es ihren Eigenschaften nach den Anschein hat. Für die Annahme, daß in Wasser unlösliche, hingegen in Alkali lösliche Eiweißkörper in größerer Menge vorhanden seien, liegen keine Anhaltspunkte vor und so werden wir zu dem Schlusse gedrängt, daß die stickstoffhaltige Zellsubstanz durch die Lauge in der Weise angegriffen wird, daß sich stickstoffhaltige Abbauprodukte bilden, welche zu der ursprünglichen Substanz in einer ähnlichen chemischen Beziehung stehen wie die Hemizellulosen und verwandte, in Alkali lösliche Kohlehydrate zur Zellulose. Die Ansicht Scholl's, daß wahrscheinlich die Membranen aller chitinhaltigen Pilze aus reinem Chitin bestehen, das höchstens in ganz lockerer Bindung mit einem stickstofffreien Kohlehydrat sich befindet,¹ wird durch meine am Maisbrand gemachten

¹ Monatshefte für Chemie, 1908, p. 1027.

Erfahrungen nicht bestätigt; meiner Ansicht nach bestehen bei den Membranen verschiedener Pilzarten, je nachdem sie fleischig, holzig, korkig, lederig etc. sind, erhebliche Verschiedenheiten in der chemischen Beschaffenheit des sogenannten Fungins, welche die Möglichkeit, das Chitin stets nach ein und derselben Methode rein zu gewinnen, zweifelhaft erscheinen lassen.

Die in der oben geschilderten Weise gewonnene Zellsubstanz ist weder im Kupferoxydammoniak löslich, noch gibt sie mit Chlorzinkjod oder Jod und Schwefelsäure eine Blaufärbung. In konzentrierter Schwefelsäure löst sie sich allmählich unter Braunfärbung auf. Wird die Lösung in Wasser gegossen, so scheidet sich eine schwarze, harzige Masse aus; der wasserlösliche Teil zeigt nach dem Filtrieren und Übersättigen mit Lauge eine kräftig reduzierende Wirkung auf Fehling'sche Lösung. Was das Verhalten zu konzentrierter Salzsäure betrifft, so steht die Substanz zwischen den von Winterstein¹ und Iwanoff² einerseits, von Scholl³ andererseits erhaltenen Präparaten gewissermaßen in der Mitte. Beim Kochen mit rauchender Salzsäure bleibt nämlich ein Teil der Substanz in Form eines schwarzen Pulvers ungelöst, während ein Teil mit gelber Farbe in Lösung geht. Aus dieser Lösung scheidet sich beim Eindampfen direkt (ohne Dialyse) das Glukosaminchlorhydrat in wenig gefärbten Krystallen aus, welche leicht durch Umkrystallisieren rein erhalten werden können. Die Identität ergab sich aus den gesamten Eigenschaften und der Analyse. Die Ausbeute betrug 30% der Zellsubstanz.

0·5114 g Substanz ergaben 0·3395 g AgCl, entsprechend einem Chlorgehalt von 16·42% Cl. Die Theorie fordert 16·47% Cl.

VIII. Flüchtige Bestandteile.

Bei der Destillation des Sporenpulvers mit Lauge erhält man Trimethylamin. Destillation mit Wasser oder verdünnter Schwefelsäure liefert jenen flockigen Körper, den ich seinerzeit Amanitol⁴ nannte.

¹ Zeitschr. f. physiolog. Chemie, 19, 537.

² Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie. I, 524.

³ L. c., p. 1032 ff.

⁴ Monatshefte für Chemie, 1905, p. 268; 1907, p. 1293; 1908, p. 773.

Zum Schlusse will ich noch bemerken, daß sich im Laufe meiner Untersuchungen die Angaben Rademaker's und Fischer's (siehe oben) bestätigt haben, nur das Ustilagin habe ich nicht isoliert, weil dessen Abscheidung den systematischen Gang meiner Untersuchung zu sehr erschwert hätte und für die Darstellung des Körpers aus einer anderen Partie des Rohmaterials die verfügbaren Mengen des letzteren nicht ausreichten. Die außerordentlich kleinen Prozentsätze, in welchen viele der im vorausgehenden besprochenen Stoffe sich vorfinden, erschweren derartige Untersuchungen ungemein und sind zum großen Teil an deren Unvollständigkeit schuld.

In den Sporen des Maisbrandes sind nunmehr folgende Körper nachgewiesen:

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 1. ergosterinartige Stoffe, | 14. Glykose, |
| 2. Ölsäure, | 15. Trimethylamin, |
| 3. feste Fettsäuren, | 16. Ustilagin, |
| 4. flüchtige Fettsäuren, | 17. eine amorphe Base, |
| 5. Lezithin, | 18. ein gummiartiges Kohle- |
| 6. Glycerin, | hydrat, |
| 7. Harz I (in Petroläther lös- | 19. in Alkali lösliche kohle- |
| lich), | hydratartige Körper, |
| 8. Harz II (in Petroläther un- | 20. chitinhaltige Gerüst- |
| löslich), | substanz, |
| 9. sogenannte Sklerotinsäure, | 21. Eiweißkörper, |
| 10. Phlobaphen, | 22. ein invertierendes Ferment, |
| 11. Gerbstoff, | 23. ein fettspaltendes Ferment, |
| 12. Mannit, | 24. Amanitol. |
| 13. Erythrit, | |

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil mit Hilfe einer von der kaiserl. Akademie der Wissenschaften (aus dem Legat Scholz) bewilligten Subvention ausgeführt, für welche der Autor an dieser Stelle seinen Dank ausspricht.