

## Zur Chemie der höheren Pilze.

VIII. Mitteilung: Über den Weizenbrand (*Tilletia levis* Kühn und *tritici* Winter)

von

Julius Zellner.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Oktober 1911.)

Der Weizenbrand steht dem früher von mir untersuchten Maisbrand systematisch sehr nahe und ist bisher chemisch nicht untersucht worden. Das Material verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Dr. A. v. Jaczewski in St. Petersburg, welcher die Güte hatte, mir eine größere Menge des mit den Pilzen infizierten Getreides zu senden. Der mit *Tilletia levis*<sup>1</sup> behaftete Weizen stammte aus der Gegend von Cherson und war 1908 geerntet worden. Das Material war hochgradig infiziert, so daß fast 20% an Sporenmehl gewonnen werden konnten. Der von *Tilletia tritici*<sup>2</sup> befallene Weizen war in Ussuri (im östlichsten asiatischen Rußland) im Jahre 1909 geerntet worden. Er lieferte bloß 4% an Sporenpulver. Die Gewinnung des letzteren geschah in der Weise, daß man das Getreide portionenweise mit einem großen Pistill verrieb, wobei die brandigen Körner zerdrückt wurden, während die gesunden unverletzt blieben. Nun wurde zunächst durch ein Sieb von 1 mm Maschenweite abgesiebt und das hindurchgegangene Produkt mittels eines feinen Siebes von Bruchstücken der Fruchtschalen, Unkrautsamen u. dgl. befreit. Leider ist eine völlige Beseitigung fremder Partikeln nicht möglich, doch ist der Prozentsatz derselben sehr gering. Die an den abgesiebten Körnern und deren Fragmenten haftenden, nicht unbedeutenden

<sup>1</sup> Winter, Die Pilze, p. 277 (1884).

<sup>2</sup> Rabenhorst, Fungi Europaei; Winter, Die Pilze, p. 109.

Mengen des Sporenpulvers können durch Abschlämmen mit Petroläther gewonnen werden. Schließlich standen für die Untersuchung von *Tilletia levis* 1750 g, von *T. tritici* 820 g (im lufttrockenen Zustand) zur Verfügung.

Zunächst wurde Feuchtigkeit und Aschengehalt bestimmt.

	<i>Tilletia levis</i>	<i>Tilletia tritici</i>
Wasser.....	7·92 %	7·97 %
Asche.....	4·35 %	5·94 %

Die Petrolätherauszüge betragen bei beiden Arten etwa 1·5% und bilden dickflüssige grünlichbraune Öle mit einer krystallinischen Ausscheidung. Dieselbe besteht in beiden

	<i>Tilletia levis</i>	<i>Tilletia tritici</i>
Säurezahl.....	106·3	104·6
Verseifungszahl....	182·0	184·8
Unverseifbares ....	15·3 %	18·1 %

Fällen zum Teil aus freien Fettsäuren. Das Unverseifbare bildet zunächst eine gelbe salbenartige Masse. Wird diese in heißem Alkohol oder Essigester gelöst, so scheidet sich beim Erkalten ein weißer, wachsähnlicher, nicht krystallisierender Körper aus, welcher schon bei etwa 60° schmilzt. In der Schmelze bleiben minimale Quantitäten krystallinischer Stoffe suspendiert, welche der Ergostergruppe angehören, da sie die Reaktion mit Chloroform und Schwefelsäure sehr deutlich, die Liebermann'sche Reaktion allerdings weniger ausgesprochen geben. Für eine genauere Untersuchung waren die erhaltenen Mengen ganz unzureichend. Der verseifbare Anteil der Rohfette ist sehr dunkel gefärbt; aus den Seifen werden bei beiden Arten sehr dunkel gefärbte, halbfeste Fettsäuren abgeschieden. Durch Aufstreichen auf Tonplatten und Umkrystallisieren aus Alkohol unter Tierkohlezusatz lassen sich die festen Fettsäuren,

deren relative Menge nicht gering ist, in reiner Form abscheiden. Der Schmelzpunkt der aus *Tilletia levis* isolierten Fettsäuren lag bei 58 bis 60°, bei den aus *T. tritici* gewonnenen bei etwa 52°. In beiden Fällen liegen wohl Gemische vor. Ausbeute 0·1 bis 0·2%, auf lufttrockene Substanz bezogen. In den sauren, eigentümlich blaugrün gefärbten Unterlagen der Fettsäureabscheidung ließ sich keine Phosphorsäure, wohl aber Glycerin in sehr kleiner Menge nachweisen.

Die Ätherauszüge, deren Gewicht etwa 0·6% beträgt, bilden sehr zähflüssige, harzige Massen, welche bei *Tilletia levis* grünlichbraun, bei *T. tritici* rotbraun gefärbt sind und einen eigentümlichen Geruch besitzen. Diese Harze sind löslich in Alkohol, Äther sowie in Chloroform und Essigester, wenig löslich in Benzol, noch weniger in Schwefelkohlenstoff, fast gar nicht in Petroläther. Ihre alkoholische Lösung wird durch Blei- und Kupferacetat gefällt, alkoholisches Kali färbt die Lösungen dunkler und gibt allmählich eine Trübung, Bichromat fällt gelbliche Flocken, Eisenchlorid färbt tief grünbraun. Die Säure- und Verseifungszahl konnte wegen der dunklen Farbe der Lösungen nur annähernd bestimmt werden.

	<i>Tilletia levis</i>	<i>Tilletia tritici</i>
Säurezahl.....	138·6	127·0
Verseifungszahl....	229·2	231·8

Keines der beiden Harze gibt die Storch-Morawski'sche Probe. Eine krystallisierende Säure, wie sie beim Maisbrand gefunden wurde, ließ sich nicht nachweisen.

Die alkoholischen Extrakte enthalten etwa 3% der lufttrockenen Sporenmasse. Werden dieselben konzentriert, so scheiden sich bräunliche gallertige Substanzen aus, welche in Wasser unlöslich sind und dadurch von den übrigen Körpern leicht getrennt werden können. Sie bilden getrocknet amorphe, spröde, bräunliche Massen, welche etwa folgende Eigenschaften zeigen: in heißem Wasser quellen sie, ohne sich zu lösen, von heißem starken Alkohol werden sie in der Kochhitze leicht

aufgenommen und diese Lösungen können stark mit Wasser verdünnt werden, ehe Ausscheidung erfolgt; sie werden durch Bleiacetat gelblich, durch Kupferacetat blaugrün, durch Eisenchlorid (allmählich) bräunlich und durch Kaliumbichromat gelblich gefällt. Ferner geben Kaliumquecksilberjodid und gelbes Blutlaugensalz nach Zusatz von etwas Säure Niederschläge.

Verdünnte wässrige Laugen nehmen die erwähnten Stoffe unter Quellung allmählich auf; solche Lösungen werden durch verdünnte Säuren wieder gefällt. In den alkoholischen Lösungen erzeugt alkoholische Lauge eine Trübung, welche auf der Ausscheidung eines (in Wasser löslichen) Kalisalzes beruht. Gleichzeitig färbt sich die Lösung dunkler. Dasselbe geschieht bei Zusatz von Ammoniak, welches jedoch keine Fällung bewirkt. Die Körper geben eine Säure- und Verseifungszahl.

	<i>Tilletia levis</i>	<i>Tilletia tritici</i>
Säurezahl.....	56·97	62·31
Verseifungszahl....	119·80	125·60

Es fällt auf, daß die Verseifungszahl ungefähr das Doppelte der Säurezahl beträgt. Wird die Lösung nach der Verseifung mit verdünnter Säure versetzt, so fällt ein gelbbräunlicher Niederschlag aus, der nach dem Waschen mit Wasser zu einem blaß lehmfarbigen Pulver eintrocknet.

Konzentrierte Salzsäure löst in der Wärme, beim Verdünnen fallen fast farblose Flocken aus. Auch in Essigester sind die Körper löslich, wenn auch schwieriger wie in Alkohol. Aus der heiß gesättigten Lösung fallen die Körper beim Erkalten teilweise in Form von Flocken aus. Dieses Verfahren wird sich zur Reinigung empfehlen, wenn größere Mengen zur Verfügung stehen. In Chloroform sind die Stoffe nur sehr wenig löslich, gar nicht in Äther. Fehling'sche Lösung wird weder direkt noch nach dem Kochen mit Salzsäure reduziert. Die Körper enthalten reichlich Stickstoff, hingegen nur Spuren von Phosphor und Schwefel; die beiden letzteren Elemente stammen vielleicht von Verunreinigungen her.

Welcher Art sind nun diese Körper? Die Annahme, daß sie aus beigemengten Weizenfragmenten herrührende Stoffe aus der Gruppe des Gliadins seien, ist mit Rücksicht auf ihre erhebliche Menge (0·4%) und den, wie erwähnt, sehr geringen Gehalt des Materials an fremden Stoffen wohl auszuschließen. Auch spricht ihre Löslichkeit in 96prozentigem Alkohol, in Holzgeist und Essigester dagegen. Andererseits weisen ihre amorphe Beschaffenheit, der beträchtliche Stickstoffgehalt, die schwach sauren Reaktionen und einige Fällungserscheinungen auf eine nähere Beziehung zu den Eiweißkörpern hin. Ich muß die Frage vorläufig offen lassen, da ich die Stoffe noch nicht in solcher Reinheit darstellen konnte, daß eine Analyse Anhaltspunkte liefern würde.

Der in Wasser lösliche Anteil des Alkoholextraktes scheidet nach dem Eindampfen und längerem Stehen im Exsikkator Krystallisationen aus. Diese wurden abgesaugt und aus Alkohol umkrystallisiert. Bei *Tilletia levis* scheiden sich aus der heißen Lösung beim Erkalten Krystallnadeln aus, welche kein Krystallwasser enthalten und bei 166° schmelzen; die wässrige Lösung schmeckt süßlich und ist optisch inaktiv. Der Körper ist zweifellos Mannit. In den Mutterlaugen bilden sich nach starkem Konzentrieren und einigem Stehen körnige Krystalle von Mykose, allerdings nur in geringer Menge.

Bei *Tilletia tritici* konnte nur Mykose (etwa 0·3%) nachgewiesen werden. Die Substanz ist durch ihr auffallend langsames Krystallisieren aus Wasser, die harten körnigen Krystalle, die chemische Zusammensetzung, Schmelzpunkt und optisches Drehungsvermögen hinlänglich charakterisiert.

0·4525 g Substanz verloren beim Trocknen 0·0418 g H<sub>2</sub>O, also 9·24%, während die Formel C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> + 2 H<sub>2</sub>O 9·52% verlangt. Die obige Menge wurde in 10 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst; diese Lösung zeigte im 1 dm-Rohr eine Drehung von +23·1° Ventzke. Daraus berechnet sich ein spezifisches Drehungsvermögen von +195°. Das Drehungsvermögen der Mykose wird zu +197 bis 199° angegeben. Die Substanz schmilzt bei 100°, wird bei 130° wasserfrei und erstarrt hierauf amorph. Verbrennung: 0·2224 g Substanz gaben 0·1433 g H<sub>2</sub>O und 0·3109 g CO<sub>2</sub> entsprechend 7·18% H und 38·13% C.

Die Mutterlaugen der Krystallisationen werden verdünnt, mit basischem Bleiacetat gereinigt und der Überschuß des Bleies mit Schwefelwasserstoff beseitigt. In einem Teile der

Flüssigkeit wurde die Anwesenheit der Glukose in bekannter Weise durch Darstellung des Glukosazons und die Reduktion der Fehling'schen Lösung nachgewiesen. Die Quantität des Traubenzuckers ist sehr gering.

Die Hauptportionen der Flüssigkeiten wurden schwach schwefelsauer gemacht und mit Kaliumquecksilberjodid versetzt. Es fallen gelbe krystallinische Niederschläge aus, deren Menge jedoch sehr gering ist. Da man erfahrungsgemäß aus solchen Niederschlägen höchstens ein Zehntel ihres Gewichtes an freien Basen erhalten kann, sah ich mich genötigt, die aus beiden Pilzarten gewonnenen Niederschläge, deren Gesamtgewicht etwa  $4\frac{1}{2} g$  betrug, gemeinsam weiter zu verarbeiten. Sie wurden zur Beseitigung des Jodes mit Wasser und feuchtem Silberoxyd verrieben, das Filtrat zur Entfernung des Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff behandelt und am Wasserbad eingeeengt. Nach längerem Stehen im Exsikkator schied sich eine geringe Menge von Krystallen ab, die Hauptmenge blieb jedoch amorph. Deshalb wurde die Substanz mit wenig verdünnter Salzsäure aufgenommen und neuerdings im Exsikkator über Kalk stehen gelassen; dabei schied sich eine sehr kleine Menge nadelförmiger Krystalle ab, während die Hauptportion amorph blieb. Da mir im ganzen nur ein paar Zehntelgramm zur Verfügung standen, mußte ich mich mit einigen qualitativen Reaktionen begnügen. Die Substanz zeigt weder die Farbenreaktionen des Ustilagins noch diejenigen des Ergotins, entwickelt, mit sehr konzentrierter Lauge erhitzt, basisch reagierende Gase (hauptsächlich Ammoniak) und gibt mit Platinchlorid ein blaßrötliches Doppelsalz, welches in Wasser leicht, in starkem Alkohol nicht löslich ist. Unter dem Mikroskop erscheint es in Form kleiner, sehr undeutlich entwickelter körniger Krystalle. Durch Lösen in wenig Wasser und Fällen mit Alkohol kann das Salz gereinigt werden. Die geringe, schließlich restierende Menge wurde zu einer Platinbestimmung verwendet.

0.1145 g Doppelsalz ergaben 0.0378 g Platin, entsprechend 33.01 %.

Die Menge der Base kann höchstens 0.01% (auf lufttrockenes Material bezogen) betragen, ist also sehr gering und

unzureichend, um eine giftige Wirkung brandigen Weizens zu begründen, selbst dann nicht, wenn, was nicht bewiesen ist, der Base hochgradige toxische Eigenschaften zukommen.

Trimethylamin, welches nach Zopf in der nahverwandten *Tilletia caries* reichlich vorhanden ist, ließ sich nicht nachweisen, vielleicht nur deshalb nicht, weil das Material nicht im frischen Zustand verarbeitet wurde.

Die wässerigen Auszüge sind gelb gefärbt und zeigen grünliche Fluoreszenz. Sie werden konzentriert und mit Alkohol gefällt. Die Niederschläge sind fast farblose, fädig-klumpige Massen, die beim Trocknen im Exsikkator stark nachdunkeln. Die wässerigen Lösungen derselben opalisieren, reduzieren Fehling'sches Reagens nicht, wohl aber, wenn sie längere Zeit mit starker Salzsäure gekocht wurden. Ätzbaryt fällt gallertig, ebenso Bleizucker und Eisenchlorid. Werden die nicht zu verdünnten Lösungen in der Kälte mit verdünnter Salzsäure versetzt, so scheidet sich eine fast farblose Gallerte aus, welche in Wasser auch in der Siedehitze unlöslich, hingegen in Laugen löslich ist und daraus wieder mit Säure gefällt werden kann. Der kohlehydratartige Körper ist also in der Pflanze wohl auch an Basen (Kali) gebunden. Die mit Salzsäure erhaltene und mit Alkohol gewaschene, sehr voluminöse Fällung trocknet zu kleinen bräunlichen Krümeln ein.

Von anorganischen Bestandteilen finden sich in der wässerigen Lösung reichlich Kalium und Phosphorsäure, wenig Chlor, sehr wenig Calcium und Schwefelsäure.

Die kalt bereiteten Wasserauszüge enthalten Eiweiß, welches beim Kochen der Lösungen sich in Flocken ausscheidet. Die Menge desselben ist gering.

Weiters findet sich ein energisch wirkendes, invertierendes Enzym vor, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht:

1. *Tilletia levis*. In 50  $cm^3$  Pilzsaft (durch 24-stündige Digestion des Sporenpulvers mit der zehnfachen Wassermenge bereitet) wurde 1 g Rohrzucker gelöst,  $\frac{1}{2}$   $cm^3$  Toluol zugesetzt und 48 Stunden stehen gelassen; hierauf wurde mit Wasser auf 100  $cm^3$  aufgefüllt und in 20  $cm^3$  das Reduktionsvermögen gegen Fehling'sche Lösung bestimmt; dasselbe geschah mit einer zweiten, ebenso hergestellten Probe, bei welcher jedoch der Pilzsaft vor dem Versuch durch eine halbe Stunde gekocht worden war. Im ersten Falle (ungekochter Saft) wurden 0·3780 g Kupfer reduziert, im zweiten 0·0247 g Kupfer.

2. *Tilletia tritici*. Versuchsordnung wie oben. Die Probe mit ungekochtem Saft ergab 0·3901 g Cu, diejenige mit gekochtem Saft 0·0327 g Cu.

In beiden Fällen sind weit über 90% des Rohrzuckers invertiert worden.

Weiters findet sich ein fettspaltendes Ferment vor. Die Versuche wurden wie in ähnlichen früheren Fällen<sup>1</sup> durchgeführt. Es kam Rüböl und Olivenöl zur Verwendung. Die Versuchsdauer betrug 3 Wochen. Es zeigte sich, daß die fettspaltende Wirkung eine weit schwächere war wie beim Maisbrand. Doch ist dies vielleicht darin begründet, daß das Sporenmateriale bereits 2 bis 3 Jahre gelegen hatte.

		Rüböl		Olivenöl		
		Säurezahl	Prozente Fett gespalten	Säurezahl	Prozente Fett gespalten	
1	Öl allein, zu Beginn des Versuches.....	4·9	2·7	7·2	3·7	
2	Öl allein, zu Ende des Versuches (nach 3 Wochen)...	5·0	2·8	7·2	3·7	
3	Öl mit nativem Sporenpulver versetzt, zu Ende des Versuches	<i>Tilletia levis</i>	20·5	11·6	24·1	12·5
		<i>Tilletia tritici</i>	17·9	10·1	22·8	11·9
4	Öl mit Sporenpulver versetzt, welches durch 4 Stunden bei 110° getrocknet worden war, zu Ende des Versuches	<i>Tilletia levis</i>	5·8	3·3	8·1	4·2
		<i>Tilletia tritici</i>	6·2	3·5	8·4	4·4
5	Verseifungszahl.....	177·3	—	192·0	—	

Dem in Kolonne 4 angeführten Sporenpulver wurde etwas mehr Wasser zugesetzt als dem nativen Sporenmateriale, so

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 1906, p. 119.



daß der schließliche Feuchtigkeitsgehalt derselbe war. Die Erhöhung der Säurezahlen in Kolonne 4 gegenüber denen in Kolonne 1 und 2 erklärt sich daraus, daß durch die Öle etwas Pilzfett (von hohem Säuregehalt) aus den Sporen extrahiert wurde.

Der mit zehnprozentiger Lauge bereitete alkalische Auszug lieferte ganz ähnliche Stoffe, wie ich sie aus dem Maisbrand<sup>1</sup> erhalten hatte. Mit Rücksicht auf ihre wenig verlockenden Eigenschaften habe ich sie in diesem Falle nicht näher untersucht.

Der in Lauge unlösliche Rückstand wurde nach dem Scholl'schen Verfahren<sup>2</sup> weiter behandelt und schließlich eine schwarzbraune Masse erhalten, aus welcher man durch Behandlung mit rauchender Salzsäure ohne Schwierigkeit Glukosamin darstellen konnte.

0·4412 g aus verdünnter Salzsäure umkrystallisierter Substanz lieferten 0·2910 g AgCl; dies entspricht einem Chlorgehalt von 16·31%. Salzsaures Glukosamin enthält 16·47% Chlor.

Somit sind im Weizenbrand nunmehr folgende Stoffe nachgewiesen:

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| 1. flüssige Fettsäuren,                              | 11. eine Base,                       |
| 2. feste Fettsäuren,                                 | 12. ein wasserlösliches Kohlehydrat, |
| 3. ein wachsartiger Körper,                          | 13. in Alkali lösliche Kohlehydrate, |
| 4. ergosterinartige Körper,                          | 14. Eiweiß,                          |
| 5. Glycerin,   | 15. ein invertierendes Ferment,      |
| 6. Harz,   | 16. ein fettspaltendes Ferment,      |
| 7. ein in Alkohol löslicher Stoff unbekannter Natur, | 17. chitinhaltige Gerüstsubstanz.    |
| 8. Mannit,   |                                      |
| 9. Mykose,   |                                      |
| 10. Glukose,   |                                      |

Vergleicht man die chemische Zusammensetzung der beiden *Tilletia*-Arten mit derjenigen des Maisbrandes, so fällt, wie zu erwarten war, eine weitgehende Übereinstimmung

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 1910, p. 454.

<sup>2</sup> Monatshefte für Chemie, 1908, p. 1023.

zuerst ins Auge. Es sind aber auch so bemerkenswerte Unterschiede vorhanden, daß es möglich wäre, die Sporen der beiden Gattungen auf chemischem Wege voneinander zu unterscheiden, falls dies auf morphologischem Wege nicht möglich wäre.

Dieser Umstand legt den Gedanken nahe, daß in Fällen, wo die anatomisch-mikroskopische Untersuchung nur ungenügende Anhaltspunkte bietet, die chemische Untersuchung der systematischen Botanik Dienste leisten könnte.