

Zur Chemie der höheren Pilze.

III. Mitteilung: Über Pilzdiastasen

von

Dr. Julius Zellner.

(Vorgelegt in der Sitzung am 7. Jänner 1909.)

Das Vorhandensein amylolytischer Fermente in höheren Pilzen ist schon von mehreren Autoren konstatiert worden.¹ Auch ich habe derartige Fermente in *Trametes suaveolens* Fr.² und *Polyporus igniarius* Fr.³ aufgefunden und es schien mir von Wichtigkeit, dem chemischen Studium dieser Enzyme etwas näher zu treten, um bezüglich der Intensität und Art ihrer Wirkung Vergleichungspunkte mit den anderweitig im Pflanzenreich vorkommenden Fermenten ähnlicher Art zu gewinnen.

Kohnstamm,⁴ welcher Amylasen im Hausschwamm (*Merulius lacrimans*), im Hallimasch (*Armillaria mellea*) und im *Polyporus squamosus* nachgewiesen hatte, arbeitete mit Säften, welche aus frischem Material nach einem dem Buchner'schen nachgebildeten Verfahren gewonnen worden waren. Gewiß hat diese Methode vom biochemischen Standpunkt aus die meiste Berechtigung. Trotzdem habe ich mich nach längerer Überlegung dazu entschlossen, für die im folgenden beschriebenen Versuche getrocknetes Pilzmaterial zu verwenden, und zwar einmal deshalb, weil es oftmals nicht möglich ist, das frisch gesammelte Material sofort zu verarbeiten und zweitens, weil es

¹ Literatur: Zellner, Chemie der höheren Pilze, 1907, p. 198.

² Monatshefte für Chemie, 27, 1285 (1907).

³ Monatshefte für Chemie, 28, 757 (1908).

⁴ Beihefte zum botan. Zentralblatt, X, p. 90 (1901).

für vergleichende Untersuchungen und spätere Nachprüfungen bequemer ist, von genau bestimmbaren Mengen des Rohmaterials auszugehen. Der Hauptnachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß beim Trocknen und längeren Liegen des getrockneten Pilzmaterials chemische Prozesse vor sich gehen, welche die Kraft des diastatischen Enzyms beeinträchtigen, doch ist, wie aus den unten angeführten Versuchen hervorgeht, diese Verminderung der diastatischen Kraft nicht sehr bedeutend. Ich habe jedoch mit Rücksicht auf diesen Umstand bei jeder Spezies angegeben, wie lange das Material gelegen hatte, bevor es zur Verwendung gelangte.

Um zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurde ferner bei der Herstellung der Pilzsäfte aus dem getrockneten Material stets in ganz gleicher Weise verfahren. Eine erschöpfende Extraktion des Fermentes läßt sich nur schwierig durchführen und liefert natürlich sehr verdünnte Säfte, die man im Vakuum konzentrieren muß, ein Verfahren, welches mit Rücksicht auf seine lange Zeitdauer und die Zersetzlichkeit der Lösungen sich wenig empfiehlt. Daher zog ich es vor, die verschiedenen Pilzspezies in gleicher Korngröße bei gleicher Temperatur und mit gleichen Wassermengen dieselbe Zeit hindurch zu digerieren und mit den so gewonnenen Pilzsäften zu arbeiten. Auf Versuche, das Ferment zu isolieren, habe ich vorläufig verzichtet.

Bei allen Versuchen verfuhr ich folgendermaßen: das lufttrockene Pilzmaterial wurde zerkleinert, durch ein Sieb von 5 *mm* Maschenweite geschüttelt und das Hindurchgegangene auf einem Sieb von 1 *mm* Maschenweite von den feineren Anteilen befreit. Es wurde so das Material in Stückchen von 1 bis 5 *mm* Durchmesser erhalten. Dadurch sollte der Fehler, welcher in der ungleichen Zerkleinerungsfähigkeit der einzelnen Pilzarten begründet liegt, eliminiert werden. Hierauf wurde der Feuchtigkeitsgehalt bestimmt, daraus die 10 g Trockensubstanz entsprechende Menge des Pilzmaterials berechnet und das letztere mit soviel Wasser übergossen, daß das Gewichtsverhältnis von Trockensubstanz zu Wasser 1 : 10 betrug. Nun blieb die Mischung 12 Stunden im verschlossenen Kolben bei gewöhnlicher Temperatur (18 bis 20°) stehen, dann wurde

koliert, gelinde abgepreßt und der trübe Saft, dessen Menge etwa 70 cm^3 betrug, filtriert.

Für alle Versuche gelangte dieselbe Kartoffelstärke zur Verwendung. Sie war mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft worden, enthielt 0.47% Asche und 15.62% Feuchtigkeit. Für jeden Versuch benützte ich 2.3835 g lufttrockene Stärke ($= 2\text{ g}$ wasser- und aschenfreie Substanz), welche in einem Kolben mit 200 g Wasser verkleistert wurde. Dabei ist darauf zu achten, daß sich keine Klumpen bilden, weil diese auch bei langer Einwirkung nicht völlig verflüssigt werden. Nach dem Abkühlen auf 40° wurden 50 cm^3 des oben erwähnten, auf 40° vorgewärmten Pilzsaftes hinzugefügt und nach Zusatz einiger Tropfen Xylol und kräftigem Umschütteln die Mischung im Wasserbad bei 40° digeriert, wobei der Kolben mit einem Wattepfropf verschlossen gehalten wurde. In allen Fällen beginnt der Prozeß mit der Verflüssigung und Klärung des Kleisters; von Zeit zu Zeit wurden Proben genommen, um mit Hilfe der Jodreaktion den Fortgang der Hydrolyse zu kontrollieren. In der folgenden Tabelle ist die Zeit angegeben, nach welcher die ursprünglich blaue Jodreaktion violett, rot oder rotbraun, gelb oder bräunlichgelb und schließlich farblos wird. Über mehr als vier Tage wurden die Versuche in keinem Falle ausgedehnt, da alsdann Zersetzung der Flüssigkeiten eintreten kann.

Es sind im ganzen 19 Spezies von holzbewohnenden parasitischen und saprophytischen Pilzen untersucht worden (siehe Tabelle I).

Nachdem sämtliche, verschiedenen systematischen Gruppen angehörige Arten eine diastatische Wirkung auf Stärke auszuüben vermögen, so ist wohl die Annahme berechtigt, daß allgemein in den holzbewohnenden Pilzen amylytische Fermente vorhanden sind. Allerdings ist die Fermentativkraft der einzelnen Spezies sehr verschieden. Eine Regelmäßigkeit läßt sich vorläufig weder in bezug auf das Substrat noch auf die systematische Verwandtschaft feststellen. Die drei Spezies (Nr. 3, 5, 19), welche in sehr trockenem Zustand gesammelt worden waren, zeigen eine sehr geringe diastatische Wirkung. Offenbar treten bei solchen einjährigen Fruchtkörpern beim Vertrocknen und dem damit verbundenen Absterben

Tabelle I.

Nr.	Name der Pilzart	Fundort und Substrat	Dauer der Aufbewahrung des getrockneten Pilzmaterials vor der Verwendung	Feuchtigkeitsgehalt des luft-trockenen Materials in Prozenten	Die Jodreaktion wird				Anmerkung
					violett	rot oder bräunlichrot	gelb oder bräunlichgelb	farblos	
1	<i>Armillaria mellea</i> Vahl.	Hallstatt, auf faulenden Fichtenstrünken	2 Monate	13 · 23	30 ^m	1 ^h 20 ^m	5 ^h 5 ^m	7 ^h 05 ^m	
2	<i>Hypoholoma fasciculare</i> Huds.	Mitterndorf im Salzkammergut, auf faulenden Fichtenstrünken	2 Monate	12 · 16	2 ^h	4 ^h 15 ^m	7 ^h 45 ^m	11 ^h 45 ^m	
3	<i>Lentinus cochlearatus</i> Pers.	Mürzzuschlag, auf faulendem Fichtenholz	3 Monate	12 · 13	8 ^h 40 ^m	13 ^h 30 ^m	—	—	Am Stamme trocken gewordene alte Exemplare. Gesamtdauer 72 ^h . Die Jodreaktion ändert sich nicht weiter.
4	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	Mitterndorf, auf faulendem Fichtenholz	2 Monate	13 · 61	2 ^h 40 ^m	7 ^h 50 ^m	15 ^h 50 ^m	23 ^h	
5	<i>Rhymovis abrotomenlosa</i> Batsch.	Mitterndorf, auf faulenden Fichtenstrünken	2 Monate	13 · 12	15 ^h	22 ^h 45 ^m	58 ^h	—	Gesamtdauer 73 ^h . Kein völliges Verschwinden der Jodreaktion. Die Flüssigkeit zersetzt sich.

6	<i>Pleurotus conchatus</i> Bull.	Beskrden, auf einer absterbenden Buche	2 Wochen	11·38	1 ^h 20 ^m	4 ^h 20 ^m	10 ^h 20 ^m	21 ^h 20 ^m	
7	<i>Polyporus pinicola</i> Fr.	Beskrden, auf Fichtenstrünken	6 Monate	12·36	22 ^h	45 ^h	71 ^h	95 ^h	
8	<i>Polyporus fomentarius</i> L.	Beskrden, auf Buchenbäumen	5 Monate	14·77	30 ^m	50 ^m	1 ^h 45 ^m	3 ^h 30 ^m	
9	<i>Polyporus sulfureus</i> Fr.	Ernsdorf in Schlesien, auf Eichen	4 Monate	11·79	1 ^h 50 ^m	3 ^h 20 ^m	5 ^h 20 ^m	6 ^h 20 ^m	
10	<i>Polyporus applanatus</i> Wallr.	Mitterndorf, auf einem Buchenstrunk	2 Monate	15·05	8 ^h 30 ^m	16 ^h	23 ^h	48 ^h	
11	<i>Polyporus hirsutus</i> Fr.	Mitterndorf, auf Baumstrünken	2 Monate	15·74	1 ^h 5 ^m	2 ^h 35 ^m	7 ^h 35 ^m	13 ^h 35 ^m	
12	<i>Polyporus igniarius</i> Fr.	Bieltz, auf Weidenbäumen	1 Monat	13·99	40 ^m	2 ^h 30 ^m	8 ^h	10 ^h 30 ^m	
13	<i>Polyporus frondosus</i> Schrank.	Bieltz, auf einem Eichenstumpf	1 Monat	12·77	6 ^h	12 ^h	14 ^h	22 ^h	
14	<i>Trametes suaveolens</i> Fr.	Bieltz, auf Weidenbäumen	2 Wochen	15·46	1 ^h	4 ^h 20 ^m	7 ^h 20 ^m	11 ^h 20 ^m	
15	<i>Daedalea quercina</i> Pers.	Bieltz, auf Eichenstrünken	5 Monate	14·33	50 ^m	2 ^h 50 ^m	7 ^h 50 ^m	10 ^h	
16	<i>Daedalea variegata</i> Fr.	Bieltz, auf Baumstrünken	2 Wochen	18·42	15 ^h	25 ^h	49 ^h	70 ^h	Am Stamm getrocknete Exemplare.

Nr.	Name der Pilzart	Fundort und Substrat	Dauer der Aufbewahrung des getrockneten Pilzmaterials vor der Verwendung	Feuchtigkeitsgehalt des luft-trockenen Materials in Prozenten	Die Jodreaktion wird				Anmerkung
					violett	rot oder bräunlichrot	gelb oder bräunlichgelb	farblos	
17	<i>Lenzites saepeplaria</i> Swartz.	Mitterndorf, auf faulendem Fichtenholz	2 Monate	14·38	3h 5m	6h 25m	13h 25m	22h 13m	
18	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaef.	Mitterndorf, auf faulem Fichtenholz	3 Monate	11·96	55m	5h 35m	11h 5m	19h 5m	
19	<i>Auricularia sambucina</i> Mart. ¹	Mürzzuschlag, auf Hollunderbäumen	6 Wochen	13·27	15h 15m	28h 45m	45h	—	Gesamtdauer 95h. Kein völliges Verschwinden der Jodreaktion. Die Flüssigkeit zersetzt sich.

¹ Der Pilz quillt derartig schleimig auf, daß zur Extraktion desselben die doppelte Wassermenge genommen werden mußte. Demgemäß mußten für den Versuch 100 cm³ des Pilzsaftes verwendet werden, während die Stärke in 150 cm³ Wasser gelöst wurde, so daß die schließliche Konzentration dieselbe war wie bei den übrigen Versuchen.

¹ Der Pilz quillt derartig schleimig auf, daß zur Extraktion desselben die doppelte Wassermenge genommen werden mußte. Demgemäß mußten für den Versuch 100 cm³ des Pilzsaftes verwendet werden, während die Stärke in 150 cm³ Wasser gelöst wurde, so daß die schließliche Konzentration dieselbe war wie bei den übrigen Versuchen.

Tabelle II.

Nr.	Art des Pilzes	Fundort und Substrat	Dauer der Aufbewahrung vor der Verwendung	Feuchtigkeitsgehalt des Pilzmaterials in Prozenten	Die Jodreaktion wird				Anmerkung
					violett	rot oder rotbraun	gelb oder bräunlichgelb	farblos	
1	<i>Polyporus pinicola</i> Fr., frisches Material	Barania (Beskiden), auf Fichtenstrüngen	0	51·64	22 ^h	32 ^h	47 ^h	82 ^h	
2	Derselbe Pilz, getrocknet	ebenso	6 Monate	12·36	22 ^h	45 ^h	71 ^h	95 ^h	
3	<i>Trametes suaveolens</i> Fr., getrocknet	Bielitz, auf Weidenbäumen	2 Wochen	15·46	1 ^h	4 ^h 20 ^m	7 ^h 20 ^m	11 ^h 20 ^m	
4	Derselbe Pilz, getrocknet	ebenso	20 Monate	—	3 ^h	11 ^h 40 ^m	26 ^h 40 ^m	37 ^h	

chemische Prozesse ein, welche das Enzym schädigen. Hingegen beeinflusst das Trocknen des frischen lebenden Materials die diastatische Wirkung nicht wesentlich. Dieselbe läßt sich — wenn auch in allmählich abnehmender Stärke — lange Zeit in dem lufttrockenen Material nachweisen. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor, welche in genau derselben Weise wie die oben erwähnten durchgeführt wurden (Tabelle II).

Der Einfluß von Säuren und Basen auf den Spaltungsvorgang wurde durch zwei Versuchsreihen mittels des Saftes von *Daedalea quercina* untersucht. Die Proben wurden genau wie oben angegeben (Tabelle I, Nr. 15) hergestellt und nur für je 100 cm^3 Flüssigkeit 5 cm^3 einer normalen oder halbnormalen Lösung der betreffenden Säure oder des Alkalis hinzugefügt. Der Pilzsaft selbst reagiert von Natur aus sauer, und zwar verbrauchten 50 cm^3 desselben 0.7 cm^3 halbnormaler Lauge zur Neutralisation (Indikator: Phenolphthalein). Die Anwendung höherer Temperatur wurde vermieden, um die Hydrolyse durch die Säure auszuschließen, die Versuchstemperatur betrug 20°. Daneben wurde ein Parallelversuch ohne Zusatz durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden normale und halbnormale Lösungen von Salzsäure, Schwefelsäure, Ätznatron und Ammoniak als Zusätze verwendet. In allen acht Fällen trat nach einiger Zeit wenigstens teilweise Verflüssigung ein, doch blieb die blaue Jodreaktion bis zum Ende des Versuchs (nach 56 Stunden) bestehen, nur bei der halbnormalen Salzsäure zeigte sich nach 8 Stunden der Eintritt der violetten Jodreaktion, welche aber weiterhin unverändert blieb. Trotz der geringen Konzentration der Zusätze (0.08 bis 0.23%) zeigte sich also eine meist vollständige Lähmung der Fermentwirkung.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Einwirkung einer Anzahl organischer Säuren besonders der in den Pflanzen allgemeiner verbreiteten Säuren untersucht. Die Versuche wurden so wie in der ersten Versuchsreihe bei gewöhnlicher Temperatur durchgeführt.

Tabelle III.

Z u s a t z	Die Jodreaktion wird			
	violett	rot oder rotbraun	gelb- rötlich oder bräunlich	farblos
	nach folgender Zeit			
Halbnormale Zitronensäure	2 ^h	3 ^h 30 ^m	8 ^h 30 ^m	24 ^h
Normale »	2 ^h	3 ^h 30 ^m	9 ^h	25 ^h
Halbnormale Weinsäure	1 ^h 30 ^m	3 ^h	8 ^h 30 ^m	24 ^h
Normale »	2 ^h	3 ^h 30 ^m	9 ^h	24 ^h
Halbnormale Fumarsäure	1 ^h 30 ^m	3 ^h 30 ^m	8 ^h 30 ^m	24 ^h
Normale »	2 ^h	3 ^h 30 ^m	9 ^h	25 ^h
Halbnormale Apfelsäure	1 ^h	2 ^h 30 ^m	8 ^h	23 ^h
Normale »	1 ^h	2 ^h 30 ^m	8 ^h	24 ^h
Halbnormale Essigsäure	1 ^h	3 ^h	7 ^h	22 ^h
Normale »	1 ^h 30 ^m	3 ^h	8 ^h	23 ^h
Wasser	2 ^h	10 ^h	23 ^h	46 ^h

Es zeigt sich, daß die Anwesenheit der organischen Säuren eine beträchtliche Beschleunigung des diastatischen Vorganges verursacht. Die kleineren Konzentrationen scheinen etwas günstiger zu wirken, ein spezifischer Einfluß bestimmter Säuren ist nicht mit Sicherheit zu konstatieren.

Was den Einfluß der Temperatur anbelangt, so wurden diesbezüglich Versuche mit dem Saft des *Polyporus fomentarius*, des fermentreichsten aller untersuchten Pilze durchgeführt. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie oben (Tabelle I, Nr. 8). Die Resultate waren folgende:

Tabelle IV.

Temperatur	Die Jodreaktion wird			
	violett	rotbraun	gelb- bräunlich	farblos
	nach folgender Zeit			
20°	1 h 10m	1 h 35m	5 h 10m	8 h 10m
30°	40m	1 h 15m	2 h 40m	4 h 40m
40°	30m	1 h	1 h 45m	3 h 30m
50°	25m	1 h	1 h 30m	4 h 15m
60°	30m	1 h	1 h 35m	5 h
70°	die blaue Jodreaktion ändert sich nicht			
80°	ebenso			

Die Wirkung der Pilzdiastase steigt also zwischen 20 und 30° rasch, zwischen 30 und 40° langsamer an und bleibt dann ziemlich stationär zwischen 40 und 60°. Das Optimum der Temperatur dürfte um 50° liegen. Gegen 60° zeigt sich bereits eine schwache, über 60° eine rapide Abnahme der fermentativen Kraft; bei 70° ist das Fermentativvermögen bereits erloschen. Es scheint also, daß das Optimum und das Maximum der Temperatur erheblich tiefer liegen wie bei der Malzdiastase.

In einem Falle (bei *Lycoperdon pyriforme*) wurde auch noch untersucht, ob das Ferment nur im Gewebskörper oder auch in den Sporen enthalten sei. Der grobzerkleinerte Pilz wurde zu diesem Behufe sorgfältig auf einem sehr feinen Siebe geschüttelt, welches bloß den Sporenstaub hindurchließ. Das zurückbleibende Material wurde zerkleinert und wie bei den früheren Versuchen verarbeitet. Wegen der sehr feinen Verteilung des Sporenpulvers und der derben Beschaffenheit der Sporenmembranen verläuft wohl die Extraktion mit Wasser unter Bedingungen, welche von den sonst eingehaltenen abweichen; wenn aber auch mit Rücksicht darauf ein unmittelbarer Vergleich nicht zulässig ist, so ergibt sich doch für alle Fälle, daß auch die Sporen das diastatische Ferment enthalten. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Tabelle I.

Tabelle V.

	Feuchtigkeitsgehalt des Materials in Prozenten	Die Jodreaktion wird			
		violett	rotbraun	gelbbräunlich	farblos
		nach folgender Zeit			
<i>Lycoperdon pyriforme</i> , Gewebesubstanz ..	11·96	55 ^m	5 ^h 35 ^m	11 ^h 5 ^m	19 ^h 5 ^m
Derselbe Pilz, Sporenstaub.....	10·55	1 ^h 30 ^m	9 ^h 50 ^m	16 ^h	23 ^h 50 ^m

Bei einigen der am kräftigsten wirkenden Pilzarten habe ich die diastatische Kraft nach dem Verfahren von Kjeldahl-Lintner jun. bestimmt. Die dazu verwendete Lintner'sche Stärke enthielt 17·18% Wasser und 0·084% Asche. Demgemäß wurden für jeden Versuch 2·417 g dieser Stärke verwendet. Nach dem Auflösen wurde genau neutralisiert, da auch die sorgfältigst gewaschene Lintner'sche Stärke merkliche Mengen von Salzsäure enthält. Die 10 g Trockensubstanz entsprechende Menge des Pilzmaterials wurde in jedem Falle mit so viel Wasser digeriert, daß das Verhältnis von Trockensubstanz zu Wasser 1: 20 beträgt. Die diastatische Kraft wurde gefunden:

bei *Daedalea quercina* zu0·90

bei *Polyporus fomentarius* zu2·00

bei *Armillaria mellea* zu.....1·80.

Das Fermentativvermögen ist also mehrere hundertmal kleiner wie das von Grünmalz.

Was die Produkte des diastatischen Abbaues betrifft, so bilden sich, wie aus der Verflüssigung des Stärkekleisters und der Veränderung der Jodreaktion hervorgeht, jedenfalls Körper, welche mit dem Amylo-, Erythro- und Achroodextrin identisch oder ihm äußerst ähnlich sind. Als Endprodukt des enzymatischen Abbaues tritt neben Dextrin hauptsächlich Glukose auf; Maltose entsteht wohl nur in geringerer Menge oder vorübergehend und wird vielleicht durch eine im Pilzsaft vorhandene Maltase weiter abgebaut.

30·21 g Lintner'scher Stärke (= 25 g Trockensubstanz) wurden in heißem Wasser gelöst, die Lösung auf 40° abgekühlt, mit Lauge genau neutralisiert und so viel Saft von *Polyporus fomentarius* zugesetzt, daß ungefähr dieselben Verhältnisse wie bei früheren Versuchen (Tabelle I, Nr. 8) erreicht wurden. Nach vierstündiger Digestion im Wasserbad bei 40° wurde filtriert und eingedampft. Der erhaltene Syrup schmeckte ziemlich süß, zugleich aber von beigemischten Pilzstoffen etwas bitter. Durch Auskochen mit 90prozentigem Alkohol läßt sich die Hauptmenge des Dextrins beseitigen; jedoch gelang es mir nicht, die zuckerhaltige Lösung zur Krystallisation zu bringen; nach mehrfachen vergeblichen Versuchen (neuerlichem Auskochen mit 90prozentigem Weingeist, Lösen in Methylalkohol, Behandlung mit Tierkohle, Einsäen von Krystallen u. dgl.), die Krystallisation herbeizuführen, stellte ich aus einem Teile des zuckerhaltigen Syrups in bekannter Weise das Osazon dar, welches in ziemlicher Menge erhalten wurde und nach dreimaligem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol scharf bei 205° schmolz. Die Stickstoffbestimmung bestätigte, daß das Glukosazon vorlag.

0·4217 g getrockneter Substanz lieferten 58·5 cm³ Stickstoff bei 16° C. und 742 mm Barometerstand.

In 100 Teilen:

Gefunden	Berechnet für	
	Glukosazon (C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₄)	Maltosazon (C ₂₄ H ₃₂ N ₄ O ₉)
15·78	15·64	10·77

Da absichtlich keine fraktionierte Krystallisation vorgenommen wurde, so konnte Maltosazon wohl nur in untergeordneter Menge in dem Reaktionsprodukt mit Phenylhydrazin vorhanden gewesen sein.

Zu dem gleichen Ergebnis, nämlich daß Maltose, wenn überhaupt, so doch nur in geringer Menge sich in den Produkten des diastatischen Abbaues vorfindet, gelangte ich noch auf einem anderen Wege. Ich versuchte nämlich durch Kombination bekannter Methoden das quantitative Verhältnis festzustellen, in welchem Glukose, Dextrin und eventuell Maltose vorhanden sind.

Zu diesem Zwecke wurden 5 g sorgfältig getrockneter Stärke verkleistert, die Lösung abgekühlt, mit 100 cm³ eines wie oben (Tabelle I, Nr. 12) hergestellten Saftes von *Polyporus igniarius* versetzt und 20 Stunden bei 40° im Wasserbad digeriert. Inzwischen wurde festgestellt, wie viel Trockenrückstand 50 cm³ des Pilzsaftes geben und wie viel Kupfer 25 cm³ dieses Saftes direkt sowie nach dreistündigem Kochen des Saftes mit verdünnter Salzsäure aus Fehling'scher Lösung (nach Allihn) reduzieren. Sodann wurde die verzuckerte Stärkelösung auf 500 cm³ aufgefüllt, gewogen und in 25 cm³ derselben direkt, in 25 cm³ nach dem Kochen mit verdünnter Salzsäure das Reduktionsvermögen, weiters in 50 cm³ der Gesamtrückstand bestimmt. Nun wurde die übrigbleibende Flüssigkeit wieder gewogen, stark konzentriert und in einem Gärkölbchen durch 6 Tage der Einwirkung frischer, gewaschener Hefe ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurde die Hefe abfiltriert, das Filtrat auf 250 cm³ gebracht und in je 25 cm³ dasselben das Reduktionsvermögen direkt und nach dem Kochen mit Salzsäure, endlich in 50 cm³ der Trockenrückstand bestimmt. Zu bemerken ist, daß durch die Gärung die Reduktionswirkung des Pilzsaftes selbst nicht merklich verändert wird.

Mittels einer weitläufigen stöchiometrischen Rechnung, auf welche hier nicht weiter eingegangen werden soll, lassen sich aus diesen Daten folgende Werte berechnen: die Menge der Abbauprodukte, das Reduktionsvermögen der verzuckerten Lösung vor und nach dem Kochen mit Salzsäure, endlich das Reduktionsvermögen der vergorenen Lösung ebenfalls vor und nach der Salzsäurebehandlung (alle Werte nach Abzug der durch den Pilzsaft verursachten Reduktionen). Im Mittel wurde bei zwei Parallelversuchen gefunden:

- a) Menge der Abbauprodukte aus 5 g Stärke 5·270 g
- b) Direktes Reduktionsvermögen von 25 cm³ der verzuckerten Lösung (5 g Stärke in 500 cm³) 0·3523 g Cu
- c) Reduktionsvermögen von 25 cm³ derselben Lösung nach dem Kochen mit Salzsäure 0·4691 g Cu
- d) Reduktion von 25 cm³ der vergorenen Lösung (zumeist von Pilzstoffen herrührend) 0·0060 g Cu
- e) Reduktion von 25 cm³ der vergorenen Lösung nach dem Kochen mit Salzsäure 0·0838 g Cu.

Aus diesen Werten läßt sich zunächst die Dextrinmenge bestimmen, welche mittels der Allihn'schen Tabelle aus dem Werte $e-d$ berechnet wird. Zur Kontrolle kann dieselbe auch aus den Trockenrückstandsbestimmungen ermittelt werden; $c-e$ ergibt die von den vorhandenen Zuckern nach der Inversion mit Salzsäure reduzierte Kupfermenge.

Unter der Annahme, daß neben Dextrose auch Maltose vorhanden ist und unter der Voraussetzung, daß ein Grammolekül (342 g) Maltose etwa 393 g Kupfer, die daraus bei der Inversion mit Salzsäure entstehenden 2 Grammoleküle (360 g) Dextrose aber ungefähr 686 g Kupfer reduzieren, gilt die Gleichung: $(686-393) : 342 = (c-e-b) : x$, wobei x die in 25 cm³ der Lösung vorhandene Maltose bedeutet. Subtrahiert man die x Gramm Maltose

entsprechende (aus der Wein'schen Tabelle ermittelte) Kupfermenge von \bar{b} , so erhält man endlich die Quantität Kupfer, welche der ursprünglich vorhandenen Dextrose entspricht. Nach dieser Rechnung ergibt sich:

Menge der Abbauprodukte (von 5 g Stärke)	5·270 g
Dextrin	0·7146 g
Maltose	0·9100 g
Dextrose	3·1200 g
Asche und sonstige Fremdstoffe der Stärke (zirka 1 $\frac{0}{0}$) ...	0·0500 g
Daher nicht bestimmt	0·4754 g

Vom analytischen Standpunkt aus sind die erhaltenen Zahlen durchaus nicht befriedigend. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß sich Zwischenprodukte bilden, welche durch die Salzsäurebehandlung nicht quantitativ verzuckert, durch die Hefe hingegen ganz oder größtenteils vergoren werden. Sicher ist die diastatische Spaltung unter den gegebenen Verhältnissen nicht vollständig verlaufen, dies ergibt sich schon aus den zu niedrigen Werten für das Gewicht der Abbauprodukte. Abgesehen von diesen Umständen und ferner abgesehen von den gewiß erheblichen Fehlern, mit welchen sowohl die einzelnen Bestimmungen wie vielleicht die ganze Methode behaftet sind, ergibt sich doch mit Sicherheit folgendes: 1. Die Menge der nach der Verzuckerung vorhandenen Dextrine ist relativ gering, kleiner wie bei dem analogen Vorgang bei Malzdiastase. 2. Das Reduktionsvermögen der Abbauprodukte ist weit größer als der Maltose entspricht und weist darauf hin, daß der entstandene Zucker zum größten Teile Traubenzucker ist. Die Frage, ob diese Erscheinung in der Eigenart der Pilzdiastase oder in dem Vorhandensein einer Maltase des Pilzsaftes ihre Erklärung findet, muß so lange eine offene bleiben, bis es möglich ist, das amylytische Enzym in halbwegs reinem Zustand zu erhalten.

Schließlich wurde noch untersucht, ob der Pilzsaft auch auf andere Polysaccharide eine hydrolytische Wirkung ausübt. Die Versuche wurden ähnlich wie die anfangs beschriebenen durchgeführt. Die 2 g Trockensubstanz entsprechende Menge Substanz wurde in etwa 150 g H₂O gelöst und mit 50 cm⁵ Pilzsaft (von *Polyporus sulfureus*, Tabelle I, Nr. 9) versetzt, und zwar wurde eine Probe mit frisch bereitetem Pilzsaft, die andere

mit einem Saft versetzt, der eine halbe Stunde gekocht und dann mit Wasser auf sein ursprüngliches Volumen ergänzt worden war. Die Versuche währten 3 Tage bei gewöhnlicher Temperatur. Jeder Probe wurden einige Tropfen Xylol zugesetzt. Schließlich wurde auf 250 cm^3 aufgefüllt und in 25 cm^3 der Lösung die Reduktionswirkung auf Fehling'sche Lösung ermittelt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle enthalten.

Tabelle VI.

Art des Kohlehydrates	Versuch mit ungekochtem Pilzsaft. 60 cm^3 Fehling'sche Lösung, 25 cm^3 Kohlehydratlösung. Reduziertes Kupfer	Versuch mit gekochtem Pilzsaft. 60 cm^3 Fehling'sche Lösung, 25 cm^3 Kohlehydratlösung. Reduziertes Kupfer
Arabisches Gummi (reinste Handelssorte)	$0\cdot0230\text{ g}$	$0\cdot0207\text{ g}$
Inulin	$0\cdot0367\text{ g}$	$0\cdot0379\text{ g}$

Es hat also keine Einwirkung stattgefunden.

Die Ergebnisse meiner Untersuchung sind nunmehr kurz zusammengefaßt folgende:

1. Amylolytische Fermente sind in holzbewohnenden Pilzen allgemein verbreitet.

2. Diese Enzyme bleiben in den getrockneten Pilzen längere Zeit wirkungsfähig.

3. Diese Fermente werden durch anorganische Säuren und Basen schon bei geringer Konzentration der letzteren teilweise oder ganz gelähmt; hingegen zeigen verdünnte organische Säuren eine beschleunigende Wirkung auf den diastatischen Prozeß.

4. Der diastatische Abbau verläuft am raschesten bei Temperaturen zwischen 40° und 60° ; das Temperaturoptimum dürfte bei 50° liegen, bei 70° erlischt das Fermentativvermögen.

5. Die diastatische Kraft der Pilze ist im Vergleich zu der des Gerstenmalzes sehr gering.

6. Die Produkte der enzymatischen Hydrolyse sind zunächst Körper der Dextringruppe (wie bei der Spaltung mit

Malzdiastase), schließlich neben Dextrin hauptsächlich Glukose. Maltose ist nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen, sie wird vielleicht durch ein invertierendes Enzym des Pilzsaftes zu Glukose abgebaut.

7. Andere Kohlehydrate (Inulin, Arabin) werden durch das Ferment nicht angegriffen.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise mit Hilfe einer von der kaiserl. Akademie (aus dem Legate Scholz) dem Verfasser gewährten Subvention ausgeführt.
