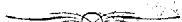




Beiträge zur Kenntniss

der

Schimmelpilze



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

einer hohen medicinischen Fakultät zu Bern

vorgelegt

von

Nadina Sieber

aus St. Petersburg



Von der Fakultät zum Drucke genehmigt, auf Antrag des Herrn
Prof. Dr. Nencki

Bern, 14. Juli 1880

Der Dekan :
Prof. Dr. **P. Müller**



Beiträge zur Kenntniss

der

Schimmelpilze

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

einer hohen medicinischen Fakultät zu Bern

vorgelegt

von

Nadina Sieber

aus St. Petersburg



Von der Fakultät zum Drucke genehmigt, auf Antrag des Herrn
Prof. Dr. Nencki

Bern, 14. Juli 1880

Der Dekan:

Prof. Dr. **P. Müller**

Buchdruckerei Jent & Reinert in Bern

Beiträge zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der Schimmelpilze.

Die zahlreichen Untersuchungen über die Schimmelpilze der letzten Jahre sind vorwiegend morphologischen Inhalts. In biologischer Hinsicht ist hauptsächlich die Thatsache, daß die Schimmelpilze nur an der Luft vegetiren können und bei Luftausschluß verkümmern, daß sie folglich des Sauerstoffs zu ihrem Leben bedürfen, vielfach experimentell bewiesen worden. Während die Hefe und verschiedene Formen der Spaltpilze bei völliger Abwesenheit des Sauerstoffs leben und sich vermehren können und gerade deßhalb fermentative Processe hervorrufen, vermögen die Schimmelpilze nur in sehr beschränktem Grade und gehen nach einiger Zeit bei Sauerstoff-Ausschluß zu Grunde.

Bei Anwesenheit von Sauerstoff entwickeln sich z. B. die Sporen von *Mucor-Mucedo* in einer zuckerhaltigen Nährlösung zu einem üppigen, reich verzweigten, querwandlosen Mycelium in Form von radial um die ausgesäeten Sporangien wachsenden Flocken, deren Durchmesser oft mehrere Centi-

meter erreicht. In diesem Zustand bei Anwesenheit von Sauerstoff tritt vorerst keine Gährung ein, sondern das Mycelium verbrennt — wie alle Mycelien — gleichzeitig mit seiner Entwicklung, die organische Substanz zu Wasser und Kohlensäure (und vielleicht noch anderen weniger hoch oxydirten Produkten). Bei Abwesenheit von Sauerstoff dagegen entwickeln sich die Mucor-Sporen direkt zu Mucor-Hefezellen, die sich durch Sprossung vermehren. Es findet die Bildung von Alkohol aus Zucker statt, die jedoch sehr schwach ist, so daß die Nährflüssigkeit nur wenige Procente Alkohol (etwa 3 Procent) enthält, und nach längerem Verweilen sterben die in der Nährlösung untergetauchten Zellen ab¹. Genau so verhält es sich nach den Untersuchungen von Fitz², Brefeld³ und Pasteur⁴ mit dem Mucor racemosus.

Schon früher fand übrigens von Tieghem⁵, daß Penicillium und Aspergillus niger gegen Gerbsäure sich ähnlich wie die Mucors gegen Zuckerlösungen verhalten. Bei reichlichem Sauerstoffzutritt verbrennen die erstgenannten Pilze die Gerbsäure vollständig und zugleich wird ihre eigene Masse beträchtlich vermehrt, bei Abwesenheit von Sauerstoff wird die Gerbsäure in Gallussäure und Glucose gespalten

¹ Albert Fitz, Berliner Chemische Berichte, 1873, S. 53.

² Fitz, Berliner Chemische Berichte, 1876, S. 1352.

³ Untersuchungen über Alkoholgährung, II. Würzb. Physik.-Medic. Gesellschaft, 1874.

⁴ Etudes sur la bière, p. 133 et 134.

⁵ Comptes-rendus 1867, T. 65, p. 1091—1094.

und die Vermehrung von Pilzmasse ist nur eine geringe. Man kann mit Recht den Gährung bewirkenden Sproß- und Spaltpilzen die Schimmelpilze als diejenigen gegenüber stellen, die des Sauerstoffs nothwendig bedürfen, mittelst welchem sie die organischen Bestandtheile der Nährlösungen verbrennen.

Ob die Oxydation der organischen Substanzen durch die Schimmelpilze eine vollständige ist, das heißt, ob nur die Endprodukte derselben: Kohlensäure, Wasser, salpetrige und Salpetersäure dabei auftreten; oder ob noch unvollständige Oxydationsprodukte und in welchen Mengen dabei gebildet werden, das ist bis jetzt für die wenigsten Nährlösungen untersucht worden. Zweifellos aber müssen dabei auch synthetische Prozesse und Bildung complexer organischer Materie stattfinden, schon deßhalb, weil gerade bei reichlicher Sauerstoffzufuhr die üppigste Vegetation der Schimmelpilze, und somit der Aufbau ihrer eigenen Leibessubstanz geschieht.

Analysen der die Alkoholgährung bewirkenden Hefezellen sind in zahlreicher Menge vorhanden. Auch die chemische Zusammensetzung der Fäulniß - Bacterien haben kürzlich Prof. Nencki und Schaffer¹ untersucht.

Nur über die Zusammensetzung der Schimmelpilze, wenn wir von hie und da zerstreuten und wenig übereinstimmenden Angaben absehen, ist bis jetzt noch keine systematische chemische Untersuchung ausgeführt worden.

¹ Journal für prakt. Chemie, N. F. B. 20, 1879.

Die nahe Verwandtschaft der Schimmelpilze zu den Sproß- und Spaltpilzen einerseits und andererseits ihre so gänzlich verschiedenen biologischen Verhältnisse machen es wünschenswerth, die chemische Zusammensetzung der Schimmelpilze eingehender zu untersuchen. Der Umstand, daß dieß bis jetzt noch nicht geschehen ist, veranlaßte mich, eine Reihe von Vorprüfungen zur Orientirung und Auffindung von Untersuchungsmethoden anzustellen. Hierin liegt auch der Grund, daß mein Vorhaben durchaus noch nicht mit der gewünschten Vollständigkeit erreicht werden konnte. Die bis jetzt erhaltenen Resultate geben nur Anhaltspunkte für die weiteren Untersuchungen, die ich, sobald es meine Zeit gestattet, wieder aufnehmen werde.

Die Hauptbedingung war zunächst Beschaffung eines reinen, von andern Organismen, namentlich von Spaltpilzen, freien Materials.

Aehnlich wie Nägeli und Löw habe ich zur Verhinderung der Spaltpilzenentwicklung der Nährlösung Phosphorsäure zugesetzt. Um zu sehen, welchen Einfluß die Verschiedenheit der organischen Bestandtheile der Nährlösung auf die chemische Zusammensetzung des Schimmels ausübt, wurden zwei verschiedene Nährlösungen — die eine aus Zucker und Gelatine, die andere aus Zucker und Salmiak bestehend — aufgestellt. Ihre Zusammensetzung war in 1000 Theilen folgende:

	I.	II.
Wasser	954,895	928,895
Zucker	20	48

	I.	II.
Gelatine	10	—
Salmiak	—	8
Freie Phosphorsäure ($P_2 O_5$)	10	10
Schwefelsäure ($S O_3$) . . .	0,25	0,25
Chlor (Cl)	0,075	0,075
Kali ($K_2 O$)	4,5	4,5
Natron ($Na^2 O$)	0,06	0,06
Kalk ($Ca O$)	0,2	0,2
Magnesia ($Mg O$)	0,02	0,02

Um eine möglichst große Oberfläche der Luft auszu-
setzen, befanden sich die Nährlösungen in breiten flachen
Schalen lose mit Glasplatten zugedeckt. In diese Nährlösungen
wurden Sporen und Fäden von *Penicillium* und *Aspergillus*
glaucus ausgesät. In 4 bis 5 Tagen bildete der Schimmel
in beiden Nährlösungen isolierte Inseln, welche sich rasch ver-
größerten und schon nach 10 Tagen eine gleichmäßige,
anfangs dünne, später immer dickere (bis zu 3 Millimeter)
Haut auf der Oberfläche bildeten. Diese Mycoderma-Schicht
wurde von Zeit zu Zeit durchgebrochen und in die Flüssig-
keit untergetaucht, worauf sich regelmäßig neue Vegetationen
an der Oberfläche einstellten. Die von Zeit zu Zeit vorgenommene
microscopische Untersuchung ergab, daß in der Nährlösung
aus Salmiak und Zucker vorwiegend *Aspergillus glaucus* sich
entwickelt hat. In der Nährlösung aus Gelatine und Zucker
waren außerdem *Penicillium* und *Mucor-Mucedor* vorhanden.

Die Ernte aus den beiden Nährlösungen war verschieden. Während ich nach $2\frac{1}{2}$ monatlichem Stehen bei Zimmer-temperatur für je einen Liter der aus Salmiak und Zucker bestehenden Nährlösung durchschnittlich 31 g. Pilzmasse mit 5,4 g. trockener Substanz erhielt, war die Ernte für je 1 Liter der Gelatine und Zuckerlösung nach 3 monatlichem Stehen nur 8 g. Pilzmasse mit 1,4 g. trockener Substanz.

Die chemische Analyse, welche natürlich nicht getrennt an den Mycelien und Sporen ausgeführt werden konnte, geschah auf folgende Weise:

Die abgehobene Haut wurde in einem Porcellan-Mörser zerrieben, sodann auf dem Filter zur Entfernung der Nährlösung so lange mit Wasser gewaschen, bis das ablaufende Filtrat nicht mehr sauer reagierte. Man ließ nun die Pilzmasse einige Stunden auf dem Fließpapier liegen, bis das mechanisch anhängende Wasser aufgesogen wurde, sodann wurde die Substanz behufs der Wasserbestimmung in trockene gewogene Porcellantiegel gebracht. Das Trocknen geschah im Luftbade bei 110° — 115° C. bis zum constanten Gewicht.

Die entwässerten Schimmelpilze wurden in einem Achat-Mörser fein gepulvert, sodann eine abgewogene Menge derselben in den Extractionsapparat¹ auf getrocknete gewogene

¹ Zu diesen Extraktionen benutzte ich den gleichen Apparat, wie ihn Nencki und Schaffer zu der Entfettung der Fäulniß-Bakterien angewendet und in ihrer Abhandlung (J. f. Prakt. Chemie, 1879, Bd. 20, S. 405) abgebildet haben. Eine vortheilhafte Abänderung des Apparates

Faltenfilter gebracht. Die trockene Substanz wurde zuerst mit Aether, nachher mit Alkoholdampf so lange behandelt, bis beide von der Pilzsubstanz nichts mehr aufnahmen. Der ätherische Auszug enthält nicht nur Fett, sondern auch Farbstoff und in geringer Menge eine krystallinische Substanz, die aber hauptsächlich von Alkohol aufgenommen wird. Von dieser in der Kälte aus dem Aetherauszuge auskrystallisirten Substanz wurde der ätherische Auszug in ein gewogenes Kölbchen abfiltrirt, der Aether abdestillirt und der Rückstand zunächst auf dem Wasserbade, hierauf in Exsicator über $\text{S H}_2 \text{O}_4$ bis zum constanten Gewichte getrocknet.

Aus den alkoholischen Extracten schied sich beim Erkalten in größeren Mengen die gleiche krystallinische Substanz aus, welche auch vom Aether gelöst wurde. Der Alkohol-extract wurde davon filtrirt und auf dem Wasserbade verdunstet. Bei den aus Gelatine und Zucker erhaltenen Schimmelpilzen bestand der alkoholische Rückstand vorwiegend aus der krystallinischen Substanz, mit nur wenig harzigen klebrigen Materien vermengt. Umgekehrt enthielt der alkoholische Auszug des Schimmels aus Zucker und Salmiak fast nur harzige Substanzen.

Da ich die Natur der in Alkohol löslichen Substanzen zuerst kennen lernen wollte, so wurde der alkoholische Aus-

bestand nur darin, daß der Vorstoß nicht mit dem Trichterrohr mittelst eines durchbohrten Korkes verbunden, sondern direkt auf das Trichterrohr aufgeschliffen war.

zug nicht direkt gewogen, sondern dessen Gewicht aus dem Verlust nach der Extraction mit Aether und Alkohol und nach Abzug des ätherischen Auszuges berechnet.

Der mit Aether und Alkohol extrahirte Rückstand wurde wiederum bei 100° getrocknet, gewogen und für Asche- und Elementaranalysen verwendet. Die erhaltenen Zahlen sind folgende:

A. Schimmelpilze aus Zucker und Gelatine.

Wasserbestimmung.

I. 21,4414 g. frischer Pilze verloren bis zu constantem Gewichte getrocknet 18,0812 g. oder 84,328 % Wasser.

II. 30,7257 g. verloren nach dem Trocknen 26,1473 g. oder 85,09 % Wasser.

Alkohol- und Aetherextract-Bestimmung.

I. 12,7808 g. der trockenen Pilzmasse wogen nach der Extraction mit Alkohol und Aether 9,5117 g., das Gewicht der in Alkohol und Aether löslichen Stoffe war also: 3,2691 g. oder 25,57 %. Davon waren nur in Aether gelöst 2,394 g. oder 18,7 %.

Elementare Zusammensetzung der mit Alkohol und Aether extrahirten Pilze.

Aschebestimmung.

I. 0,4171 g. trockener Sub. im Platintiegel geglüht hinterließen 0,0269 g. oder 6,44 % Asche.

II. 0,2536 g. Sub. gaben 0,0242 g. oder 6,7 % Asche.
Die Asche bestand vorwiegend aus phosphorsaurem Kali, Kalk
und Magnesia. Sie enthielt ferner Spuren von Eisen und keine
Schwefelsäure.

Stickstoffbestimmungen.

I. 0,262 g. der aschehaltigen Sub. = 0,246 aschefreier
Sub., mit Cu O verbrannt, gaben 15,3 ccm. N Gas bei 708 m.
Bar. und 11,6 T. oder 6,46 % N = 6,88 % aschefrei.

II. 0,2148 g. = 0,2135 g. aschefreier Sub. gaben 13,4
C. cm. N. Gas bei 708 Mm. Bar. und 15 ° T., oder 6,74 %
N. = 6,79 aschefrei.

C und H Bestimmungen.

I. 0,2141 g. = 0,2004 g. aschefreier Sub., mit CuO
verbrannt, gaben 0,1293 g. H₂O und 0,3456 g. CO₂ oder
44,0 % C und 6,71 % H, = 47,01 % C und 7,13 % H
aschefrei berechnet.

II. 0,3167 g. = 0,2964 g. aschefreier Sub. gaben
0,1861 g. H₂O und 0,5149 g. C O₂ = 44,33 % C und
6,49 % H, oder 47,36 % C und 6,95 % H aschefrei.

B. Schimmelpilze aus Salmiak und Zucker.

Wasserbestimmungen.

I. 46,9997 g. Sub. verloren nach dem Trocknen bis zum
constanten Gewichte 40,321 g. oder 85,79 % Wasser.

II. 25,1518 g. Sub. verloren 21,5525 g. oder 85,69 %
Wasser.

Alkohol- und Aetherextract-Bestimmungen.

8,1403 g. der trockenen Schimmelmasse verloren mit Aether und Alkohol extrahirt 1,187 g. = 14,57 %. Davon waren nur in Aether gelöst 0,9118 g. oder 11,19 %.

Elementare Zusammensetzung der mit Alkohol und Aether extrahirten Pilze.

Aschebestimmung.

I. 0,4628 g. der extrahirten Schimmelpilze hinterließen im Platintiegel geglüht 0,0041 oder 0,88 % Asche.

II. 0,2568 g. gaben 0,0022 g. oder 8,57 % Asche.

Stickstoffbestimmungen.

I. 0,3785 g. der aschehaltigen Sub. = 0,3753 g. aschefreier Sub. gaben 18,6 ccn. N Gas bei 20° T und 712 Bar. oder 5,32 % N = 5,374 % aschefrei.

II. 0,326 g. = 0,3133 g. aschefreier Sub. gaben 16,2 ccn. N Gas bei 21° T und 711 Bar. oder 5,34 % N = 5,58 % Stickstoff aschefrei. ¹

C H Bestimmungen.

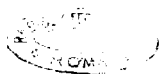
I. 0,3365 g. = 0,3338 g. aschefreier Substanz gaben mit Cu O und vorgelegtem metallischen Kupfer verbrannt

¹ Diese Stickstoffbestimmungen wurden in dem von König modificirten Zulkowsky'schen Apparate (Berichte der Berliner Chemischen Gesellschaft 1880) ausgeführt. Bei der Berechnung des Gasvolumens wurde daher von dem Barometerstande nicht die Spannkraft des Wasserdampfes, sondern die der 20 % Kalilösung in Abzug gebracht.

0,5675 g. CO_2 und 0,2096 g. H^2O oder 45,97 % C und 6,89 % H oder 46,36 % C und 6,97 % H aschefrei berechnet.

II. 0,2546 g. = 0,2524 g. aschefreier Substanz gaben 0,430 g. CO_2 und 0,1584 g. H^2O oder 46,03 % C und 6,90 % H oder aschefrei 46,43 % C und 6,97 % H.

Die mit Alkohol und Aether extrahirte Pilzsubstanz besteht wesentlich aus Eiweiß und Cellulose. Mit verdünnter SH^2O^4 gekocht, löste sie sich zum größten Theil darin auf und das Filtrat, mit NaHO übersättigt und mit Kupferoxydlösung versetzt, scheidet beim Erwärmen reichliche Mengen von Kupferoxydul ab. Die Anwesenheit der Proteinsubstanzen suchte ich in der Weise nachzuweisen, daß 3 bis 4 g. der trockenen, mit Alkohol und Aether extrahirten Substanz mit dem 50fachen Gewicht 1 % KHO auf dem Wasserbad etwa zwölf Stunden lang digerirt wurden. Hierauf wurde von dem Ungelösten filtrirt, das Filtrat mit ClH angesäuert und mit concentrirter Kochsalzlösung versetzt. Es entstand eine sehr schwache Trübung und erst nach mehrstündigem Stehen setzte sich zu Boden ein flockiger Niederschlag ab, der abfiltrirt mit Millon'schem Reagenz versetzt sich roth färbte und nach dem Trocknen auf Platinblech verbrannt, den Geruch nach verbranntem Horn verbreitete. Ich habe diesen Versuch mit gleichem Resultat im größeren Maßstab wiederholt: 500 g. frische, in PH_3O_4 -haltiger Nährlösung gezüchtete Schimmelpilze wurden zunächst durch Waschen mit Wasser von der Säure befreit, und sodann mit 4fachem



Gewichte 1 % Kalilauge auf dem Wasserbade digerirt. Die alkoholische Lösung mit ClH versetzt, gab einen flockigen Niederschlag, der sich aber weder im Wasser noch in verdünnter Säure löste und kein Acidalbumin, sondern ein Umwandlungsprodukt der Schimmel-Cellulose war. Es geht hieraus hervor, daß die für die Ferment-Organismen, wie Hefe und Spaltpilze, so charakteristische und namentlich in den Letzteren in so großer Menge vorkommende Eiweiß-Substanz in den Schimmelpilzen nicht enthalten ist. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um die Natur der in Schimmeln enthaltenen Eiweiß-Substanzen zu charakterisiren.

Ich habe ferner die Alkohol- und Aether-Extracte der Schimmelpilze genau nach dem von Hoppe-Seyler¹ angegebenen Verfahren auf den Gehalt an Lecithin untersucht. Es gelang mir auch, durch Kochen des Aether-Extractes mit Aetz-Barytlösung, sowohl die Bildung der $\text{PH}_3 \text{O}_4$ nachzuweisen, als wie auch ein in Nadeln krystallisirendes Platinsalz darzustellen, das seiner Bildung nach wohl Cholinplatin-doppelsalz sein könnte. Selbstverständlich ist damit nicht mit Sicherheit die Anwesenheit des Lecithins nachgewiesen; allein, auf Grund dieser Reactionen ist das Vorkommen des Lecithins oder ihm ähnlicher Substanzen sehr wahrscheinlich.

Unter der Annahme, daß die mit Aether und Alkohol extrahirten Schimmelpilze außer Asche-Bestandtheilen nur noch aus Eiweiß und Cellulose bestehen und der Stickstoff-

¹ Zeitschrift für physiologische Chemie. III. B. S. 378.

gehalt des Eiweißes gleich 16 pct. gesetzt wird, ergibt sich für 100 Theile trockener Schimmelpilze folgende Zusammensetzung:

Trockene Schimmelpilze aus Gelatine und Zucker.

In Aether lösliche Materie	18,70
» Alkohol „ „	6,87
Asche „ „	4,89
Eiweiß „ „	29,88
Cellulose „ „	39,66
	100,00

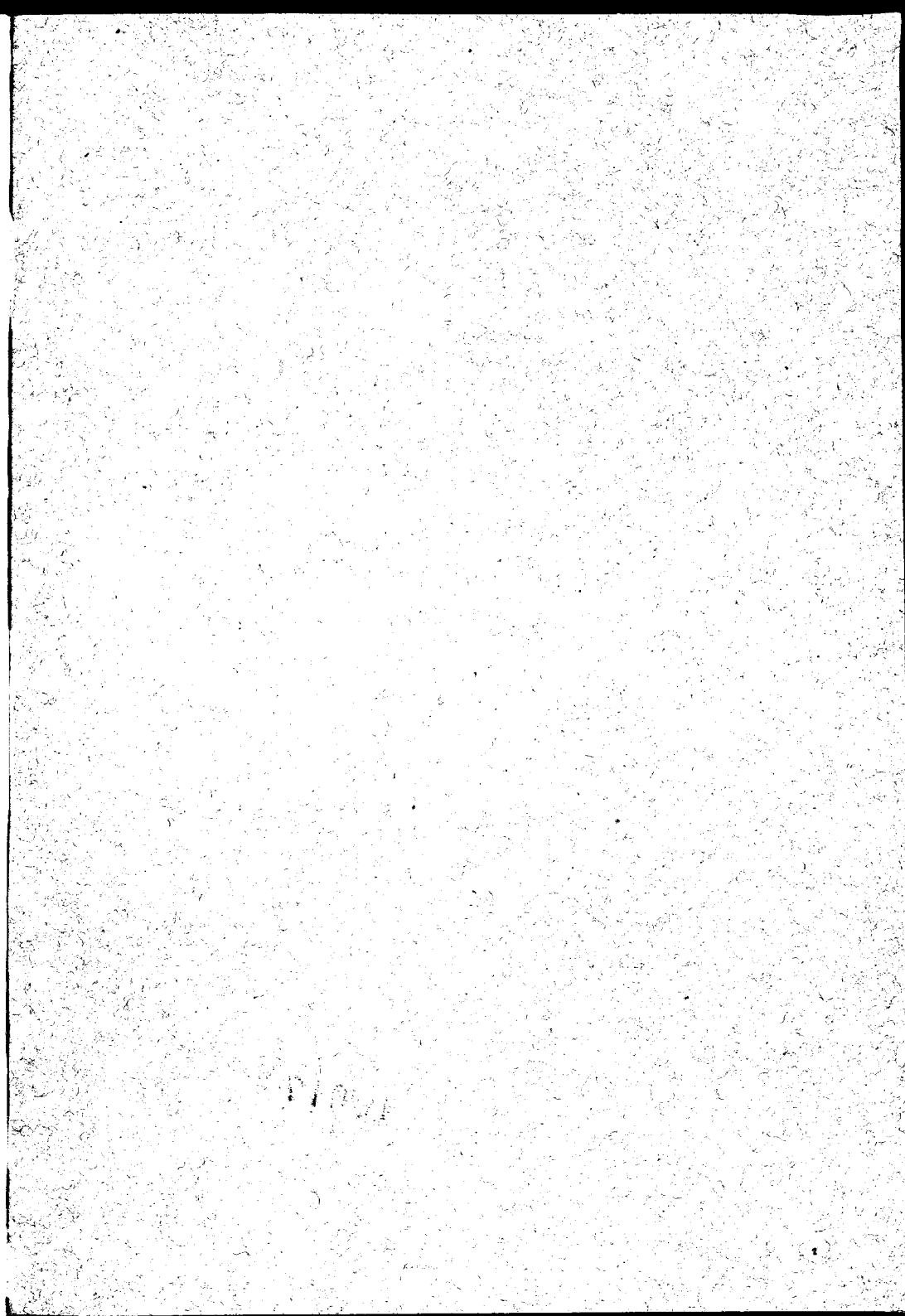
Trockene Schimmelpilze aus Salmiak und Zucker.

In Aether lösliche Materie	11,19
» Alkohol „ „	3,36
Asche „ „	0,73
Eiweiß „ „	28,95
Cellulose „ „	55,77
	100,00

Die auf Gelatine und Zucker gewachsenen Schimmelpilze haben demnach einen bedeutend höheren Gehalt an im Alkohol und Aether löslichen Materien und Asche. Der gefundene Eiweißgehalt ist in beiden Sorten ziemlich der gleiche. Sehr auffallend ist der geringe Aschegehalt in den aus Zucker und Salmiak erhaltenen Pilzen. Die Cellulose macht hier mehr als die Hälfte der trockenen Substanz aus.

Die Aufgabe der nächsten Untersuchung wird darin bestehen, die Natur und Zusammensetzung der Extractivstoffe, namentlich der in Alkohol löslichen krystallinischen Substanz, ferner des Eiweißes und der als Cellulose bezeichneten Substanz festzustellen.

Von Interesse wird es ferner sein, die Aenderung zu ermitteln, welche die Nährlösung durch die Pilzvegetation erlitten hat. Zur Zeit, da ich die Schimmelpilze aus der Nährlösung für die Untersuchung genommen habe, war in ihr kein Zucker mehr vorhanden.



Buchdruckerei Jett & Reinert in Bern

6209
m