## Beiträge zur Kenntnis der Hemicellulosen.

II.

## Von E. Schulze und N. Castoro.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1903.)

Bekanntlich hat man in sehr vielen Pflanzensamen Hemicellulosen gefunden und für eine große Anzahl der letzteren mit Sicherheit festgestellt, was für Glukosen sie bei der Hydrolyse liefern. Dagegen besitzen wir nur wenig Kenntnisse über die in vegetativen Organen enthaltenen Stoffe solcher Art. Dies veranlaßte uns zur Ausführung der im folgenden beschriebenen Untersuchung, deren Gegenstand die von H. C. Schellenberg<sup>1</sup>) in dem untersten Internodium des Stengels von Molinia coerulea entdeckte Hemicellulose war. Über die bei der mikroskopischen und mikrochemischen Untersuchung dieses Objekts von ihm erhaltenen Resultate machte uns der genannte Forscher folgende dankenswerte Mitteilungen: «Zu den wenigen Gräsern, die in ihren vegetativen Organen celluloseähnliche Körper als Reservestoffe aufspeichern, gehört das Besenried (Molinia coerulea Mönch). An der Halmbasis findet sich ein krug- oder flaschenförmig aufgetriebenes Internodium. Im Gegensatz zu den übrigen Halmteilen ist dieses Stück ohne Markhöhle. Ein großzelliges Parenchym füllt den ganzen Markraum aus. Dieses Internodium ist neben den dicken Wurzeln das Speicherorgan für die während des Sommers aufgenommenen Stoffe. Während des Spätsommers sammelt sich in diesem «Speicherinternodium», wie man es nennen kann, eine große Menge von Stärkemehl an. Die Wandungen der Parenchymzellen in dem Speicherinternodium

¹) H. C. Schellenberg, Über die Bestockungsverhältnisse von Molinia coerulea Mönch, Berichte der schweizerischen botanischen Gesellschaft, Heft 7, 1897.

sind zu dieser Zeit dünn und zeigen gegenüber anderen parenchymatischen Geweben keine Besonderheiten. Im Herbst beginnt die Auflagerung eigenartiger Verdickungsschichten auf die primären Membrane der Parenchymzellen, die anfangs Winter ihren Abschluß findet. Gleichzeitig tritt das Stärkemehl nach und nach zurück; im Winter ist es völlig aus dem Speicherinternodium verschwunden.»

«Wenn im Frühling die Knospen an der Basis des Speicherinternodiums austreiben, so werden die Verdickungsschichten der Parenchymzellwände wieder aufgelöst. Die Auflösung beginnt am Knospengrunde und schreitet im Mark von Zelle zu Zelle vorwärts ohne Rücksicht auf den Verlauf der Gefäßbündel: Während des Lösungsprozesses tritt im Parenchym wieder reichlich Stärkemehl auf. Letzteres kann sich, wie fortgesetzte Beobachtungen zeigten, nicht allein auf Kosten von allfällig im Zellsaft gelöstem Zucker gebildet haben, sondern es muß dazu auch Material aus einer anderen Quelle geliefert worden sein. Dies kann aber nur auf Kosten der Verdickungsschichten geschehen, die gleichzeitig aufgelöst werden. Durch die Auflösung dieser Schichten wird mehr Substanz in Lösung gebracht, als durch den wachsenden Trieb verbraucht wird; der Überschuß dient als Material zur Stärkemehlbildung.»

«Nach diesem Verhalten müssen die Verdickungsschichten des Parenchyms im Speicherinternodium physiologisch als «Reservecellulose» angesehen werden.¹) In mikrochemischer Beziehung unterscheidet sich die Substanz, aus der die Verdickungsschichten bestehen, scharf von der echten Cellulose. Sie zeigt folgendes Verhalten:

- 1. In 50% iger Salzsäure quillt sie auf und löst sich dann rasch in der Kälte:
  - 2. Sie ist auch in kochender, 5% iger Salzsäure löslich;
- 3. Mit wässeriger oder alkoholischer Jodlösung und mit Jodjodkalium gibt sie keine Reaktion;
  - 4. Sie löst sich nicht in Kupferoxydammoniak;

¹) Das Speicherinternodium besitzt gleich vielen reservecellulosehaltigen Samen eine sehr harte Beschaffenheit.

5. Mit Chlorzinkjod in verdünnter Lösung gibt sie keine Reaktion; in einer konzentrierten Lösung quillt sie schwach auf und nimmt eine schwach violette Färbung an.» 1)

«Nach diesen Reaktionen muß die Substanz, aus der die Verdickungsschichten bestehen, zu den Hemicellulosen gestellt werden. Schon ihr mikroskopisches Bild weicht von demjenigen der echten Cellulose ab. Es ist eine stark lichtbrechende, farblose, dicke Schicht, die der primären Zellmembran aufgelagert ist und von dieser durch ein anderes Lichtbrechungsvermögen sich scharf abhebt. Zahlreiche Poren verbinden die einzelnen Zellen miteinander.»

«Die Auflösung der Hemicellulose vollzieht sich ähnlich der Stärkemehlauflösung. Zahlreiche feine Porenkanäle bilden sich vom Zellinnern aus, die gegen die Mittellamelle zu wachsen, bis schließlich die ganze Verdickungsschicht gelöst ist. Nur die primären Membranen der Parenchymzellen bleiben zurück, während die Verdickungsschichten vollständig gelöst werden.»

«Nachdem B. Hansteen²) mittels der Gipsstäbchenmethode gezeigt hatte, daß es gelingt, künstlich Endosperme und Kotyledonen zu entleeren, wenn man für Ableitung der Lösungsprodukte sorgt, so fragte ich mich, ob das Gleiche bei hemicellulosehaltigen Organen, speziell bei Molinia coerulea, auch auszuführen sei. Bei geeigneter Versuchsanstellung erhielt ich in der Tat gute Resultate. Die Verdickungsschichten wurden gelöst und das Stärkemehl aus dem Speicherinternodium entfernt, nachdem der wachsende Sproß abgeschnitten und das Speicherinternodium durch ein Gipsstäbchen mit einem Wasserbassin in Verbindung gebracht worden war. Das Speicherinternodium verhält sich also in dieser Beziehung wie das Endosperm eines Getreidesamens.»

Diese Mitteilungen geben ein klares Bild von dem mikro-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>) Alle Cellulosereaktionen, bei denen Säuren von mäßiger Konzentration angewendet werden, versagen, weil durch die Säure die Substanz sofort aufgelöst wird.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>) B. Hansteen, Flora, Ergänzungsband 1894.

chemischen Verhalten der in dem Speicherinternodium von Molinia coerulea sich vorfindenden Hemicellulose und von der Rolle, die dieser Zellwandbestandteil im Stoffwechsel iener Pflanze spielt. Es war nun von Interesse, diese Beobachtungen durch eine makrochemische Untersuchung zu ergänzen. Herr Dr. Schellenburg dazu die Anregung gab, so hatte er auch die Gefälligkeit, sich an der Beschaffung des erforderlichen Untersuchungsmaterials zu beteiligen: letzteres wurde auf zwei unter seiner Führung in die Umgegend von Zürich gemachten Exkursionen im Dezember gesammelt. Es bestand aus den Speicherinternodien und den Wurzeln der Molinia. Nachdem durch Waschen mit Wasser die anhängende Erde so vollständig wie möglich entfernt worden war, wurden die Internodien von den Wurzeln getrennt; beide Teile wurden nun bei 60-70° getrocknet und sodann mit Hilfe der Dreefsschen Reibe in feines Pulver verwandelt. Mit den Wurzeln haben wir nicht viele Versuche angestellt; als unsere Hauptaufgabe betrachteten wir die chemische Untersuchung des Speicherinternodiums. Dazu diente Material aus zwei verschiedenen Jahren: das im ersten Jahr gesammelte wurde nur für einige orientierende Versuche verwendet; die Frage, was für Glukosen aus der Hemicellulose des Speicherinternodiums bei der Hydrolyse entstehen, ist durch Versuche entschieden worden, die mit dem im Dezember 1902 gesammelten Material angestellt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche teilen wir im folgenden in ihren Einzelheiten mit:

Das beim Zerreiben der Internodien erhaltene Pulver, dessen Gewicht ungefähr 100 g (gleich 96 g Trockensubstanz) betrug, wurde zunächst mit Hilfe von Äther entfettet; der ätherische Auszug hinterließ beim Eindunsten nur 0,588 g Rückstand. Die entfettete Masse wurde nun zur Entfernung von Proteinstoffen mit 0,05% iger Natronlauge in der Kälte behandelt. Der alkalische Auszug gab mit Essigsäure einen Niederschlag; im Filtrat von diesem Niederschlage brachte Weingeist eine schwache Fällung hervor. Da die Substanz, aus der diese Fällung bestand, nach dem Erhitzen mit verdünnter Salzsäure die Fehlingsche Lösung reduzierte, so ist es wahr-

scheinlich, daß durch die 0,05% ige Natronlauge auch eine kleine Menge von Hemicellulose aufgelöst worden war.

Nachdem der beim Extrahieren des Pulvers mit der kalten verdünnten Natronlauge verbliebene Rückstand durch Waschen mit Wasser vom Alkali befreit worden war, behandelten wir ihn, nachdem er zuvor mit Wasser bis fast zum Sieden erhitzt worden war, zwei Stunden lang bei 60° mit Diastaselösung. Dies mußte für wünschenwert erklärt werden, obgleich bei der mikroskopischen Untersuchung in den eingesammelten Internodien kein Stärkemehl gefunden worden war, denn für die Versuche über die Frage, was für Glukosen aus der Hemicellulose des Speicherinternodiums entstehen können, mußten wir ein Material haben, welches zweifellos von Stärkemehl völlig frei war.

Der nach Einwirkung der Diastaselösung noch verbliebene stärkemehlfreie Rückstand wurde mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, dann über Schwefelsäure getrocknet. Sein Gewicht betrug nun 70 g (mit 66,6 g Trockensubstanz). In diesem Rückstand bestimmten wir den Gehalt an Stickstoff (nach Kjeldahls Methode) und an Asche. Dabei erhielten wir folgende Resultate:

1. 0,4755 g wasserfreie Substanz gaben 0,0030 g = 0,63  $^{\circ}$ / $^{\circ}$ N.

3. 0.4755 » » » 0,0027 » = 0,57 °/ o Asche.

Wenn man die Annahme macht, daß der Stickstoff ausschließlich in Form von Proteinstoffen sich vorfand und daß die letzteren 16% Stickstoff enthielten, so berechnet sich für den analysierten Rückstand folgende Zusammensetzung:

Proteinstoffe 3,94% of N-freie organische Substanzen 95,49% of N-freie organische Sub

Um Aufschluß über den Gehalt dieses Rückstands an Hemicellulose zu erhalten, kochten wir 1 g davon = 0.951 g Trockensubstanz mit 100 ccm 10/0iger Schwefelsäure am Rückflußkühler, brachten das Ungelöste auf ein gewogenes

Filter und wuschen es mit Wasser vollständig aus. Das Filter mit seinem Inhalt wurde gewogen, nachdem es bei 100—105 genügend lange getrocknet worden war. Wir erhielten folgende Zahlen:

- 1. 0,9510 g wasserfreie Substanz gaben bei einstündigem Kochen 0,5893 g Rückstand;
- $2.\,$ 0,9510 g wasserfreie Substanz gaben bei zweistündigem Kochen 0,5629 g Rückstand.

In Lösung waren also gegangen:

In Versuch 1 0,3617 g =  $38,0^{\circ}/_{\circ}$  der angewendeten Substanz;

Wie man sieht, hat die Verlängerung der Kochdauer auf 2 Stunden keinen großen Einfluß auf das Resultat gehabt. Nimmt man an, daß durch die 1% ige Säure nichts als Hemicellulose gelöst und daß letztere bei zweistündigem Kochen mit der Säure ziemlich vollständig in Lösung gegangen ist, so gelangt man zu dem Schluß, daß der analysierte Rückstand ungefähr 41% i Hemicellulose enthalten hat.

Da die Vorversuche die Anwesenheit eines Pentosans ergeben hatten, so war nun noch festzustellen, in welcher Quantität sich dasselbe vorfand. Zu diesem Zweck wurde folgender Versuch angestellt: Wir erhitzten 2,58 g des hemicellulosenhaltigen Rückstands = 2,45 g Trockensubstanz zwei Stunden lang mit 100 ccm 1% ger Schwefelsäure am Rückflußkühler, befreiten die vom Ungelösten abfiltrierte mit dem

¹) Allem Anschein nach waren die in einem andern Jahre gesammelten Internodien der Molinia bedeutend reicher an Hemicellulose. Der aus diesem, nur für einige Vorversuche verwendeten Material dargestellte «hemicellulosehaltige Rückstand», welcher aus 3,31% Proteinstoffen, 95,90% stickstofffreier organischer Substanz und 0,79% Asche bestand, hinterließ nur 28,8% Unlösliches, als er zuerst mit kochender, 1½% iger Schwefelsäure, dann mit kochender 1½% atronlauge behandelt wurde; 71,2% dieses Rückstands waren also in Lösung gegangen. Wenn auch in diesem Falle der Rückstand nicht bloß mit verdünnter Säure, sondern auch mit verdünnter Lauge behandelt wurde, so ist doch das Resultat kaum erklärlich, wenn man nicht annimmt, daß dieser Rückstand reicher an Hemicellulose war, als derjenige, den wir für die oben im Text beschriebenen Versuche verwendeten.

Waschwasser vereinigte Lösung durch Zusatz von Baryt von der Schwefelsäure und brachten sie sodann auf ein Volumen von 100 ccm. Je 50 ccm dieser Flüssigkeit wurden sodann zur Furfurolbestimmung nach bekanntem Verfahren verwendet. Im folgenden geben wir die in diesen Bestimmungen erhaltenen Phloroglucidmengen und die denselben entsprechenden Xylanquantitäten<sup>1</sup>) an:

Aus diesen Zahlen berechnet sich der Gehalt des hemicellulosehaltigen Rückstands an einem in kochender einprozentiger Schwefelsäure löslichen Pentosan (Xylan) auf  $16,4^{\circ}/_{\circ}$ .

Wir gehen zur Beschreibung der Versuche über, durch welche die Qualität der bei der Hydrolyse der Hemicellulose entstehenden Glukosen festgestellt wurde. Wir erhitzten 50 g des hemicellulosehaltigen Rückstands mit 1 Liter einprozentiger Schwefelsäure 2 Stunden lang am Rückflußkühler, fügten der nach dem Erkalten vom Ungelösten abfiltrierten, mit dem Waschwasser vereinigten Flüssigkeit noch 6 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und ließen sie nun noch 3 Stunden lang kochen. Dann entfernten wir die Schwefelsäure durch Zusatz von Barvt und dunsteten die vom Barvumsulfat abfiltrierte Lösung zum Sirup ein. Diesen Sirup zerlegten wir durch Behandeln mit kochendem Weingeist in einen in diesem Lösungsmittel leicht löslichen und einen darin schwer löslichen Teil. Wie der letztere behandelt wurde, wird weiter unten angegeben werden: die weingeistige Lösung des ersteren Teils wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in heißem Weingeist aufgenommen (wobei wieder ein kleiner Rückstand blieb), diese Operation wurde später noch einmal wiederholt. Die in dieser Weise erhaltene weingeistige Lösung lieferte bei sehr langsamem Verdunsten

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>) Wir stellen das Pentosan als Xylan in Rechnung, weil bei der Hydrolyse der Hemicellulose Xylose erhalten wurde, wie aus den später folgenden Mitteilungen zu ersehen ist. Die Berechnung wurde nach der von B. Tollens in dieser Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 239 mitgeteilten Tabelle Kräbers ausgeführt.

über konzentrierter Schwefelsäure Krystalle, daneben aber einen Sirup. Die nach dem Abgießen dieses Sirups durch Behandlung mit einer geringen Menge von warmem Weingeist, sowie durch Aufstreichen auf eine Tonplatte von der Mutterlauge befreiten Krystalle waren ungefärbt; sie lieferten beim Erhitzen mit Phloroglucin und Salzsäure eine rein kirschrote Flüssigkeit, woraus zu schließen war, daß eine Pentose vorlag - eine Schlußfolgerung, die auch mit der von uns nachgewiesenen starken Furfurolbildung bei der Destillation des Glukosegemenges mit Salzsäure in Einklang steht. Um festzustellen, ob Arabinose oder Xylose vorlag, wurde eine wässerige Lösung des Zuckers im Soleil-Ventzkeschen Polarisationsapparat untersucht. Dabei ergab sich folgendes: Eine Lösung, die in 10 ccm 0.500 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 200 mm-Rohr im Mittel mehrerer Beobachtungen bei 19° C. 6,6° nach rechts, demnach ist  $\lceil \alpha \rceil_{p}^{19} = +22.8^{\circ}$ .

Der Zucker wurde nun noch einmal aus verdünntem Weingeist umkrystallisiert, was sehr leicht von statten ging, dann wieder im Polarisationsapparat untersucht. Das Resultat war nun folgendes: Eine wässerige Lösung, die in 10 ccm 0,361 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei  $20^{\circ}$  C. nach 24 Stunden 4,2° nach rechts; demnach war  $[\alpha]_{D}^{20} = +20,1$ °.

Diese Zahl stimmt mit dem spezifischen Drehungsvermögen der Xylose überein. Allerdings ist für völlig reine Xylosepräparate das Drehungsvermögen noch etwas niedriger, nämlich = + 18 bis + 19 °, gefunden worden; für nicht sehr oft umkrystallisierte Präparate fand man aber wiederholt [ $\alpha$ ]  $^{\rm D}$  = + 20 °.

Eine Bestätigung der Annahme, daß Xylose vorlag, lieferte noch die Untersuchung des nach bekanntem Verfahren dargestellten Osazons unseres Zuckers; dieses Osazon schmolz im Kapillarröhrchen bei 156—157%, gleichzeitig mit dem Osazon, welches aus einem Xylosepräparat unserer Sammlung dargestellt worden war.

Der oben erwähnte Umstand, daß die weingeistige Glukoselösung nur schwierig zum Krystallisieren zu bringen war, mußte schon zu der Vermutung führen, daß jene Lösung neben Xylose noch einen andern Zucker enthielt, welcher sich weit schwerer als die Xylose in Krystallform überführen ließ. Die Richtigkeit dieser Vermutung war leicht zu beweisen. Als der von den Xylosekrystallen abgegossene Sirup mit Wasser verdünnt, mit Tierkohle entfärbt und im Polarisationsapparat untersucht wurde, erwies er sich als linksdrehend; eine wässerige Lösung, die in 10 ccm ungefähr 0,65 g wasserfreie Substanz enthielt, drehte im 200 mm-Rohr bei 19 °C. 15,5 °S.-V. nach links; daraus berechnet sich  $[a]^D = ca. -40$ °. Da die im Sirup enthaltene Glukose mit Resorcin und Salzsäure sehr stark die Seliwanoffsche Reaktion gab, so ist es sehr wahrscheinlich, daß der Sirup Fructose (Lävulose) enthielt. Natürlich war diese Zuckerart im Sirup noch mit Xylose gemengt, wodurch ihr Drehungsvermögen herabgedrückt wurde.

Aus den im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß der in heißem Weingeist leicht lösliche Teil des bei der Hydrolyse der Hemicellulose erhaltenen Zuckersirups neben Xylose sehr wahrscheinlich auch Fructose enthielt. Den in dem genannten Lösungsmittel schwer löslichen Teil dieses Sirups zerlegten wir wieder in zwei Teile, indem wir ihn wiederholt mit heißem Weingeist, unter Zusatz von etwas Wasser behandelten und die dabei enstandene Lösung vom Ungelösten abgossen. Aus einem Teil des beim Verdunsten dieser Lösung resultierenden Sirups stellten wir nach bekanntem Verfahren ein Osazon dar. Dieses Osazon schmolz nach dem Umkrystallisieren bei 2050 und war demnach wahrscheinlich Glukosazon. Den Rest des Sirups verarbeiteten wir nach den von Tollens und seinen Schülern gegebenen Vorschriften auf Zuckersäure. Wir erhielten ein im Aussehen mit dem sauren, zuckersauren Kalium übereinstimmendes Salz in reichlicher Menge. Das daraus dargestellte Silbersalz glich im Aussehen vollständig dem zuckersauren Silber. Die Analyse des über Schwefelsäure bis zur Konstanz des Gewichts getrockneten Salzes gab folgende Resultate:

Im Mittel wurden also in diesem Salz 51,14% of Ag gefunden, während die Theorie für zuckersaures Silber 50,9% Ag verlangt.

Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß der bei der Hydrolyse der Hemicellulose erhaltene Zuckersirup neben Xylose und Fructose auch Traubenzucker (d-Glukose) enthielt. Die Hemicellulose schloß demnach ein Xylan und ein Dextran, daneben höchst wahrscheinlich ein Lävulan, ein. Die Prüfung des Zuckersirups auf Galaktose und auf Mannose gab negative Resultate; demnach war in der Hemicellulose weder Galaktan noch Mannan enthalten.

Was für Produkte bei der Auflösung der Hemicellulose des Speicherinternodiums im Stoffwechsel der Molinia zunächst entstehen, ist nicht bekannt; doch bildet sich nach den Beobachtungen H. C. Schellenbergs auf Kosten dieser Produkte Stärkemehl. Daß die Pflanze ein Dextran und ein Lävulan zur Stärkemehlbildung verwenden kann, ist leicht verständlich; die Umwandlung eines Pentosans in Stärkemehl wird einen etwas größern Arbeitsaufwand beanspruchen; doch darf man vielleicht annehmen, daß auch diese Umwandlung sich in der Pflanze ohne Schwierigkeit vollzieht.

Schließlich ist noch einiges über die Versuche mitzuteilen, die wir mit den Wurzeln der Molinia angestellt haben. Diese Wurzeln wurden getrocknet, fein zerrieben, mit Hilfe von Äther vom Fett befreit, sodann mit Diastaselösung behandelt, schließlich mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Der dabei verbliebene Rückstand lieferte beim Kochen mit einprozentiger Schwefelsäure eine zuckerreiche Lösung. Der bei Verarbeitung dieser Lösung resultierende Zuckersirup wurde für eine Furfurolbestimmung verwendet; 1,391 g des Sirups lieferten dabei 0,3866 g Phloroglucid. Demnach war auch hier eine Pentose in beträchtlicher Quantität vorhanden. Der Sirup wurde durch Behandlung mit Weingeist in einen in diesem Lösungsmittel leicht löslichen und einen darin schwer löslichen Teil zerlegt. Die Lösung des ersteren Teils gab mit Benzylphenylhydrazin in geringer Menge ein krystallinisches Produkt, welches bei 172—174° schmolz und demnach wahrscheinlich das Benzylphenylhydrazon der Arabinose war.

Wir benützen die Gelegenheit noch zur Berichtigung von zwei Angaben, die sich in unserer ersten Abhandlung (diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 40-53) finden. Auf Seite 44 wird gesagt, daß ein größeres Quantum des Rückstandes zwei Stunden lang am Rückflußkühler erhitzt worden sei; aus Versehen sind hier die Worte «mit einprozentiger Schwefelsäure» ausgelassen worden. Ferner wird auf Seite 52 gesagt, daß man, auch ohne daß darüber Versuche angestellt seien, im Hinblick auf die an Lupinus luteus und Lupinus angustifolius gemachten Beobachtungen annehmen dürfe, daß auch die Hemicellulose der Samen von Lupinus hirsutus beim Keimungsvorgang gelöst und zur Ernährung der jungen Pflänzchen verwendet werde. Zu dieser Angabe ist zu bemerken, daß allerdings eine makrochemische Untersuchung über diese Frage nicht ausgeführt wurde; mikrochemisch aber ist von Herrn Dr. H. C. Schellenberg, nach einer von Demselben uns gemachten, gefälligen Mitteilung, der Nachweis dafür erbracht worden, daß in der Tat die Hemicellulose der Samen von Lupinus hirsutus während des Keimungsvorganges aufgelöst wird.