

# Quantitative Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel im Laubblatt.

Von  
W. Gast.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Würzburg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 28. Dezember 1916.)

## Inhalt.

	Seite
I. Einleitung . . . . .	1
II. Methodisches . . . . .	5
1. Die Reduktionsmethode . . . . .	6
2. Die Polarisationsmethode . . . . .	10
3. Die Rohrzucker-Inversion . . . . .	11
4. Die Bestimmung der Maltose . . . . .	13
5. Die Bestimmung der Stärke . . . . .	16
6. Die Vorbehandlung der Blätter . . . . .	20
7. Gang der Analyse . . . . .	21
III. Ergebnisse der Analysen . . . . .	27
1. Tropaeolum majus . . . . .	27
2. Cucurbita ficifolia . . . . .	28
3. Vitis vinifera . . . . .	30
4. Musa Ensete . . . . .	36
5. Canna iridiflora . . . . .	38
IV. Allgemeines . . . . .	39

### I. Einleitung.

Die quantitative Erforschung der bei der Assimilation gebildeten Kohlenhydrate geht auf Sachs (32) zurück. Von ihm stammt die sogenannte Blatthälftenmethode, welche die Bestimmung der Zu- bzw. Abnahme der Assimilationsprodukte in der Flächeneinheit und somit die Schätzung der Assimilationsgröße des Blattes erlaubt. Man vergleicht dabei die Trockengewichte gleich großer Flächenstücke von verschiedenen Hälften eines Blattes zu verschiedenen Zeiten. Es müssen jedoch, um ein vollständiges Bild von der Assimilationsgröße zu erhalten, auch die durch Atmung und Ableitung bedingten

Verluste in Betracht gezogen werden. Sachs ging damals allerdings noch von der Vorstellung aus, die Gewichtszu- und -abnahme sei durch die Stärkebildung allein bedingt.

Kurz darauf hatte A. Meyer (23) die Anhäufung von löslichen Zuckerarten sowohl in stärkefreien als auch in stärkeführenden Blättern nachgewiesen. Die Versuche von Böhm (5), Schimper (33) und A. Meyer (22) zeigten ferner, daß die Bildung der Stärke im Chlorophyllkorn von einer gewissen Konzentration löslicher Kohlenhydrate in der Zelle abhängig ist. Es konnte also kein Zweifel mehr herrschen, daß die von Sachs gegebenen Werte nicht auf Stärke allein bezogen werden dürfen, sondern ganz allgemein eine Bestimmung der ersten Assimilationsprodukte, sowohl Zucker als auch Stärke, darstellen.

Neuerdings ist die Blatthälftenmethode von A. Müller (25) zur Untersuchung verschiedener Stärke- und Zuckerblätter angewendet worden. Thoday (36) hat bei einer Nachuntersuchung der Sachsschen Werte die Brauchbarkeit der Methode voll bestätigt.

Eine andere Methode zur Schätzung der bei der Assimilation gebildeten Kohlenhydrate hat Kreuzler (18) angegeben. Sie besteht in der Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Menge, welche innerhalb einer gewissen Zeit von den assimilierenden Blättern verbraucht wird. Gleichzeitig muß die durch die Atmung entstehende  $\text{CO}_2$ -Menge berücksichtigt werden. Aus dem Verbrauch an  $\text{CO}_2$  läßt sich dann, allerdings nur annähernd, die gebildete Kohlenhydratmenge berechnen, — annähernd deshalb, weil die Werte verschieden ausfallen, je nachdem sie auf Mono-, Di- oder Polysaccharide bezogen werden und durch die Methode selbst über das Mengenverhältnis dieser Kohlenhydrate natürlich nichts gesagt wird. Dieser Methode hat sich Giltay (13) bei Untersuchungen über die vegetabilische Stoffbildung in den Tropen bedient.

Die ersten quantitativen Bestimmungen der Zucker in den Blättern durch chemische Analyse liegen schon weit zurück. Besonders sind Blätter von Nutzpflanzen, wie *Beta vulgaris* und *Vitis vinifera*, Gegenstand zahlreicher Untersuchungen

gewesen. So hat z. B. Petit (27) schon 1873 Wein- und Pfirsichblätter auf ihren Zuckergehalt geprüft und neben «Glukose», wie er einfach alle direkt reduzierenden Zucker nennt, auch beträchtliche Mengen einer erst nach der Inversion mit Säuren reduzierenden Zuckerart gefunden, die er durch gleichzeitige polarimetrische Prüfung als Rohrzucker erkannte.

Eingehendere Untersuchungen liegen über die Blätter der Zuckerrübe vor. Hier sind zunächst die Arbeiten von A. Girard (14) hervorzuheben. Auch er hat zwischen Saccharose und direkt reduzierendem Zucker unterschieden. Von besonderem Interesse ist eine Beobachtung Girards über das Verhältnis von Saccharose und reduzierendem Zucker. Er fand nämlich, daß der Rohrzucker tagsüber in höherem Grade als die übrigen Zucker zunimmt.

Lindet (20) hat bei seiner Untersuchung der Zuckerrübenblätter die reduzierenden Zucker unter Zuhilfenahme der Polarisationmethode in Dextrose und Lävulose unterschieden.

Am merkwürdigsten sind vielleicht die von Perrey (26) angeführten Resultate anlässlich einer Untersuchung von Phaseolus. Der Verfasser konnte nämlich in der Zeit vom 29. Juni bis 29. Juli keine Spur von reduzierendem Zucker in den Blättern entdecken, hingegen stets größere Mengen von Saccharose. Perrey kam zu dem Schluß, daß Saccharose der zuerst gebildete Zucker sei, und faßt die als «Glukose» bezeichneten direkt reduzierenden Zucker, die er zu anderer Zeit fand, als Hydrolyisationsprodukte der Saccharose auf.

Die erste eingehende quantitative Differenzierung der Zuckerarten im assimilierenden Laubblatt stammt von Brown und Morris 1893(4). Es ist durch sie das Vorkommen der vier Zuckerarten: Saccharose, Maltose, Dextrose und Lävulose, wenigstens für die Blätter von *Tropaeolum majus*, nachgewiesen worden. Ferner zeigen ihre Analysenresultate das deutliche Überwiegen der Disaccharide über die Monosaccharide bei Blättern, die am Tage der Pflanze entnommen waren oder nach dem Abschneiden mehrere Stunden assimiliert hatten, während bei den am frühen Morgen entnommenen oder nach dem Abschneiden verdunkelten Blättern

sich das Verhältnis von Mono- zu Disacchariden sichtlich zugunsten der ersteren verschob. Außerdem zeigte sich, daß stets Lävulose in mehr oder weniger beträchtlichen Mengen zugegen war, während Dextrose zurücktrat oder ganz fehlte. Wie bereits gezeigt wurde, sind auch schon früher ähnliche Beobachtungen an andern Blättern gemacht worden (Girard, Perrey), allgemeine Beachtung haben aber erst die Analysen von Brown und Morris diesen Tatsachen verschafft. Die Verfasser halten auf Grund ihrer Analysen den Beweis für erbracht, daß der Rohrzucker der zuerst gebildete Zucker sei. Aus Gründen, die später noch eingehend erörtert werden sollen, zwingen die Analysenbefunde nicht ohne weiteres zu dieser Deutung, die daher auch nicht viele Anhänger gefunden hat. Allgemein gilt eine Hexose, speziell Dextrose, als das erste analytisch faßbare Assimilationsprodukt, während der Rohrzucker als Reservestoff aufgefaßt wird.

Spätere Autoren begnügen sich, soweit Laubblätter zur Untersuchung herangezogen werden, in der Regel mit der Unterscheidung zwischen direkt reduzierendem und nach der Inversion reduzierendem Zucker neben der Stärke. Erst in jüngster Zeit ist, während die vorliegende Arbeit im Entstehen begriffen war, eine Untersuchung von Davis, Daish und Sawyer veröffentlicht worden,<sup>1)</sup> die, den Vorarbeiten (9, 10) nach zu urteilen, sich ebenfalls mit einer genauen Differenzierung der Zuckerarten neben der Stärke befaßt.

Bei den von mir durchgeführten Analysen wurde zunächst das Blatt von *Tropaeolum majus* benutzt, da ein Vergleich mit den bereits vorliegenden Untersuchungen über dieses Objekt wünschenswert erschien. Es sind ferner Blätter von *Cucurbita ficifolia*, *Vitis vinifera*, *Musa Ensete* und *Canna iridiflora* untersucht worden.

Von jeder der genannten Pflanzen wurde je eine entsprechende Menge Blätter in den Mittagsstunden, eine andere kurz vor Tagesanbruch geschnitten, also zur Zeit der stärksten Assimilationstätigkeit und nachdem Inversion und Ableitung

---

<sup>1)</sup> Des Krieges wegen war mir diese Arbeit nicht zugänglich (vgl. Botan. Zentralbl., Nr. 29, 1916, S. 58—60).

(neben der Atmung) allein im Gange waren. Es geschah dies in der Hoffnung, durch Vergleich der verschiedenen Mengenverhältnisse der Kohlenhydrate während physiologisch verschiedener Tätigkeiten der Pflanze vielleicht einige Anhaltspunkte über den primär entstehenden Zucker zu gewinnen. Von Versuchen mit Blättern, bei denen vor der Belichtung die Ableitung durch vorhergehendes Abschneiden der Blätter unterbunden war, habe ich abgesehen, einmal wegen der technischen Schwierigkeiten, da eine große Anzahl von Blättern zu jeder Analyse gebraucht wurde, dann aber auch, weil die durch die unterbrochene Ableitung bedingten Verhältnisse doch nicht als normal angesehen werden dürfen: es könnten sich unter solchen Umständen im fortwährenden Auf- und Abbau der Kohlenhydrate Verschiebungen zugunsten der einen oder andern Zuckerart ergeben, die leicht zu falschen Vorstellungen über den normalen Verlauf führen würden.

## II. Methodisches.

Die Ausführung der Analysen ist nicht ganz einfach, und es muß aus diesem Grunde auch auf die diesbezüglichen Vorarbeiten etwas näher eingegangen werden.

Was zunächst die Zucker betrifft, so war das Prinzip ihrer Isolierung bzw. Berechnung kurz folgendes:

a) es wurde das Reduktionsvermögen des vorbehandelten Auszuges gegen Fehlingsche Lösung direkt, sowie sein Drehungsvermögen für die Ebene des polarisierten Lichtes ermittelt;

b) es wurde mit maltasefreier, durch Thymol abgetöteter Hefe bei 52° (eventuell auch mit Citronensäure) invertiert, darauf abermals das Reduktionsvermögen bestimmt. Eine polarimetrische Bestimmung kann als Kontrolle dienen;

c) es wurde mit maltasefreien Hefen ein Teil des Auszuges bei 32° vergoren und wiederum das Reduktionsvermögen ermittelt.

Daraus berechnet sich:

1. die Menge der vorhandenen Maltose aus c direkt,

2. die Menge der Saccharose bzw. des ihr entsprechenden Invertzuckers aus dem Reduktionswerte ( $b-a$ ),

3. die Kupfermenge, welche der Summe von Dextrose und Lävulose entspricht, aus dem Reduktionswerte ( $a-c$ ); die der Summe dieser Zucker zukommende Drehung aus dem Polarisationswerte  $a$  minus den für Saccharose und Maltose berechneten Drehungswinkeln.

Aus den so erhaltenen Zahlen kann mit Hilfe einer einfachen Formel, die bei der näheren Besprechung des Analyse-ganges wiedergegeben werden wird (vgl. auch Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden, Bd. 2, S. 146), die Menge der Dextrose leicht berechnet werden.

4. Die Lävulose aus der in (3) erhaltenen und der für Dextrose berechneten Kupfermenge.<sup>1)</sup>

Es bedarf das nun im einzelnen der Besprechung.

### 1. Die Reduktionsmethode.

Bei der Ermittlung des Reduktionsvermögens kam es mir auf eine Methode an, welche die Benutzung der bei uns üblichen Zuckertabellen, die Meißel und Allihn für Dextrose, Meißel für Invertzucker, Wein für Maltose (König, Bd. 3, 1. Teil, Anhang) und Hönig und Jesser für Lävulose (v. Lippmann, Bd. 1, S. 891) ausgearbeitet haben, gestattet.<sup>2)</sup> Als solche wurde das maßanalytische Verfahren von Rupp und Lehmann (29,19) gewählt; es hat gegenüber dem Soxhlet-schen Titrierverfahren, das überhaupt bei kleinen Extraktmengen nicht in Betracht kommen kann, und der gravimetrischen Bestimmung von Allihn den Vorzug großer Einfachheit. Man verfährt dabei, wenn es sich um eine Zuckerart und nicht um Gemische handelt, wie folgt: man nimmt die Reduktion der Fehlingschen Lösung genau nach der Vorschrift, wie sie der Verfasser der Tabelle für den betreffenden Zucker gegeben hat (König, Bd. 3, 1. Teil, S. 430), vor. Das abgekühlte Reaktions-

<sup>1)</sup> Oder einfacher: aus (Dextrose + Lävulose) berechnet als Dextrose, minus der Dextrose selbst.

<sup>2)</sup> Brown und Morris haben Tabellen benutzt, die nach eigenen Versuchen ausgearbeitet waren.

gemisch wird dann mit einer Lösung von schwefelsaurem Jodkali zusammengebracht, wobei das durch den Zucker nicht reduzierte, überschüssige Kupfer reduziert wird nach der Gleichung



Das in Freiheit gesetzte Jod wird mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung titriert (Indikator Stärke). Die Differenz zwischen der Jodmenge, welche bei der Abwesenheit von Zucker, also bei einer Blindprobe, abgeschieden wird und der Jodmenge, welche bei der Analyse selbst frei wird, ist ein Maß für die durch den Zucker reduzierte Kupfermenge. Mithin ist auch die Differenz des bei der Blindprobe und des bei der Analyse erhaltenen Thiosulfatwertes eine Maßzahl für das reduzierte Kupfer. 1  $\text{Cu}''$  entspricht 1  $\text{J}'$ , das Atomgewicht des Kupfers ist 63,6, also entspricht 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfat 6,36 mg Kupfer, daher die Berechnung:

$6,36 \times [\text{Thiosulfatverbrauch bei der Blindprobe minus Thiosulfatverbrauch bei der Analyse}] =$  durch den Zucker reduzierte Kupfermenge in Milligrammen. Die zugehörige Zuckermenge wird aus der Tabelle ersehen.

Die Blindprobe braucht selbstverständlich nicht vor jeder Analyse neu vorgenommen zu werden. Bemerket sei noch, daß es bei dieser Methode nicht nötig ist, die vorgeschriebenen Volumina Fehlingsche- und Zuckerlösung anzuwenden, sondern vollkommen genügt, das Verhältnis dieser Flüssigkeiten und ihrer Verdünnung mit Wasser einzuhalten (vgl. 29, S. 517).

Eine Schwierigkeit lag nur darin, daß einerseits die Vorschriften für jede Zuckerart anders sind, d. h. in bezug auf die anzuwendende Menge Fehlingscher- und Zuckerlösung, Wasserzusatz und Kochdauer von einander abweichen, andererseits im Pflanzenextrakt ein Gemisch von Zuckern vorliegt, die mit Ausnahme der Maltose nicht quantitativ isoliert werden können. Ich war somit gezwungen, von den üblichen Bestimmungsweisen abzuweichen und die Verhältnisse so zu wählen, daß sie auf Dextrose, Lävulose, Maltose und Invertzucker gleichmäßig angewendet werden konnten, ohne daß die gefundenen Werte mit den normal erhaltenen Werten erheblich differierten und dadurch die Verwendung der Ta-

bellen fraglich machten. Es wurden alle vier Zuckerarten nach folgendem Schema bestimmt:

15 ccm Kupfersulfatlösung	} nach
15 ccm Seignettesalz-Natronlauge	
10 ccm Zuckerlösung.	

Dieses wurde kalt gemischt, im Erlenmeyer-Kolben von 200 ccm Inhalt langsam zum Sieden erhitzt und mit nicht zu starker Flamme und unter Vermeidung jeglichen Siedeverzuges 4 Minuten im Kochen erhalten. Das Reduktionsgemisch wurde dann rasch in fließendem Wasser gekühlt (das  $\text{Cu}_2\text{O}$  darf auf keinen Fall dabei mit der Luft in Berührung kommen). Dann wurde eine Lösung von 2,5 g Jodkali in 35 ccm Wasser und 25 ccm verdünnte Schwefelsäure (1 : 10), beides vorher gemischt, zugegeben und mit  $n/10$ -Thiofulfatlösung in mäßigem Tempo titriert.

Die Blindproben wurden in derselben Weise vorgenommen, nur 10 ccm destilliertes Wasser statt Zuckerlösung verwendet; sie wurden häufig neu angestellt.

Eine Kochdauer von 4 Minuten war für die Maltose erforderlich, da die Reduktion der alkalischen Kupferlösung durch diesen Zucker erst nach 4 Minuten mit Sicherheit erreicht ist; andererseits werden bei den übrigen Zuckerarten nach 2 Minuten Kochzeit nur noch Spuren von  $\text{Cu}_2\text{O}$  abgeschieden (vgl. 34, S. 235; 15, S. 544). Durch die Anwendung von unverdünnter Fehling'scher Lösung wurde wenigstens für Maltose das gebräuchliche Verfahren eingehalten; die Abweichungen, welche sich für die übrigen Saccharide ergaben, habe ich durch Versuche festzustellen versucht. Vorher aber mußte ich mich über die Reinheit der dabei verwandten Zucker orientieren. Für Dextrose ist dies nach dem Soxhletschen Titrierverfahren geschehen, ebenso für Lävulose. Die Saccharose wurde polarimetrisch geprüft. Es wurde der Traubenzucker (wasserfrei, «Kahlbaum») als 99,6%ig, der Fruchtzucker (aus Inulin I) und der Rohrzucker (aus indischem Rohrzucker) als 100,0%ig gefunden. Die Zucker waren vor der Untersuchung über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden.

Nachstehende Tabellen zeigen die Abweichungen, welche sich aus dem oben geschilderten Verfahren ergeben. Die



Zuckerlösungen enthielten genau 100,0 mg Zucker in 10 ccm. Die niederen Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung (Maßpipette) hergestellt. Der angegebene Kupferwert ist jeweils das Mittel aus 2–3 Analysen, deren Abweichungen zwischen 0,3 und 0,6 mg Kupfer schwankten.

I. Dextrose.

Dextrose in 10 ccm mg	Kupfer gefunden mg	Dextrose berechnet mg	Abweichung in %
100,0	191,5	98,1	– 1,9
80,0	157,4	80,3	+ 0,4
60,0	119,5	60,9	+ 1,5
40,0	80,2	40,9	+ 2,3
20,0	39,6	20,7	+ 3,5

II. Lävulose.

Dextrose in 10 ccm mg	Kupfer gefunden mg	Dextrose berechnet mg	Abweichung in %
100,0	177,4	99,2	– 0,8
80,0	143,9	80,4	+ 0,5
60,0	109,2	61,2	+ 2,0
40,0	73,7	41,7	+ 4,3
20,0	37,6	22,4	+ 12,0

III. Invertzucker.<sup>1)</sup>

Invertzucker in 10 ccm mg	Kupfer gefunden mg	Invertzucker berechnet mg	Abweichung in %
100,0	183,5	97,1	– 2,9
80,0	150,4	79,1	– 1,1
60,0	115,1	60,2	+ 0,3
40,0	77,7	—	—
20,0	40,6	—	—

<sup>1)</sup> Invertzuckerlösung wurde durch Auflösen genau äquivalenter Mengen Dextrose und Lävulose gewonnen.

Der Grad der Abweichungen ist, wie man sieht, von der Konzentration abhängig. Die kleinste Abweichung zeigen Dextrose und Lävulose übereinstimmend, wenn 80,0 mg in 10 ccm enthalten waren, also bei einer 0,8%igen Lösung. Eine höhere Konzentration bedingt bei beiden Zuckern einen Fehlbetrag, der bei Dextrose größer ist als bei Lävulose, eine niederere Konzentration hingegen gibt einen Mehrbetrag; er ist bei Dextrose kleiner als bei Lävulose. Aus Tabelle III sehen wir, daß bei Invertzucker der Fehlbetrag bedeutend größer ist und daß sich hier die angewandte und die aus der Analyse berechnete Menge erst bei einer Konzentration von 0,6% sehr nahe kommen. Die entsprechenden niederen Konzentrationen konnten nicht verglichen werden, weil die Meißelsche Tabelle nicht so weit hinabreicht, ein Mangel, der sich auch sonst fühlbar macht.

Es sei an dieser Stelle noch daran erinnert, wie wenig wir eigentlich über das Verhalten von Zuckergemengen bei der Reduktion d. h. über die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Zucker wissen und daß es sich schon deshalb bei der Untersuchung von Pflanzensäften nicht um die Ermittlung absolut genauer Zahlenwerte handeln kann. Doch sind die Abweichungen kaum jemals so groß, daß nicht das Mengenverhältnis in Zuckergemischen mit großer Annäherung bestimmt werden könnte.

Jene Abweichungen, welche durch den Gebrauch der oben beschriebenen Methode entstehen, wurden übrigens dadurch auf das Mindestmaß beschränkt, daß, soweit dies möglich war, mit Konzentrationen von 0,7—0,8% gearbeitet wurde. So konnte die Methode, wo es sich um Zuckergemenge handelte, ohne Bedenken angewendet werden.

## 2. Die Polarisationsmethode.

Die Messungen wurden mit einem Halbschattenapparat (von Pfister und Streit, Bern) angestellt.<sup>1)</sup> Sämtliche Flüssigkeiten wurden im 200 mm-Rohr bei einer Temperatur von 20° C.

<sup>1)</sup> Herrn Prof. Faust bin ich für die freundliche Überlassung des Apparates zu großem Dank verpflichtet.

im Dunkelraum mit Natriumlicht untersucht. Der Apparat gestattete eine Ablesung auf  $\frac{1}{100}^{\circ}$ . Zwei Ablesungen differierten kaum um  $0,05^{\circ}$ , doch war zu diesen Beobachtungen einige Übung erforderlich.

### 3. Die Rohrzuckerinversion.

Zur Inversion des Rohrzuckers habe ich Hefeninvertase benutzt, und zwar kam die Hefe direkt zur Verwendung. Es wurde *Saccharomyces Marxianus*, der maltasefrei ist (vgl. 11, S. 110; 12), in weithalsigen Kölbchen auf Bierwürze-Agar, dem Invertzucker zugefügt war, rein kultiviert. Um die nötige Hefenmenge leicht entnehmen zu können, wurde ein breiter, rechtwinklig umgebogener Platinspatel verwandt; damit läßt sich eine größere Menge der Hefe bequem vom Boden des Kölbchens abheben. In der Regel genügen zur Inversion von 50 ccm einer ca. 1%igen Rohrzuckerlösung 4—5 solcher Portionen vollständig. Um Gärung zu verhüten, ging die Inversion nach Zusatz von alkoholischer Thymollösung im Thermostaten von  $52^{\circ}$  C. vor sich; die Lösung war mit Schwefelsäure schwach angesäuert. Nach 24 Stunden wurde das Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung geprüft.

*Saccharomyces Marxianus* habe ich verwandt, um jede Einwirkung von Maltase auf das Extrakt mit Sicherheit auszuschließen. Da seine Verwendbarkeit für diesen Zweck nicht ohne weiteres feststand, mußten erst Vorversuche angestellt werden. Es hat sich gezeigt, daß, wenn in genügender Menge eingetragen, diese Hefe sich gut zur Inversion bei höherer Temperatur eignet. Dafür nachstehendes Beispiel:

1,6000 g Saccharose, über  $P_2O_5$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wurden zu 200 ccm in destilliertem Wasser gelöst, 50 ccm davon in kleinem Erlenmeyer mit 2 Tropfen (Pipette) konzentrierter Schwefelsäure und ca.  $\frac{1}{2}$  ccm alkoholischer Thymollösung (1 : 100) versetzt. In diese Lösung wurden in der oben beschriebenen Weise vier Portionen aus einer Reinkultur von *Saccharomyces Marxianus* übertragen und durch Umschwenken die völlige Verteilung der Hefe im Substrat bewirkt. Das Kölbchen wurde dann für 24 Stunden in den

Thermostaten von 52° gebracht. Nach Verlauf einiger Stunden wurde umgeschwenkt, um die Hefe, die sich zu Boden setzt, wieder in der Flüssigkeit zu verteilen. Nach 24 Stunden wurde das Kölbchen aus dem Thermostaten genommen, abgekühlt, die Flüssigkeit mit wenig Kieselgur durchgeschüttelt, auf 50 ccm gebracht und durch ein Faltenfilter, wenn nötig mehrmals, filtriert.

7,5 ccm der Lösung auf 10 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt, ergaben bei der Reduktion:

120,3 mg Cu entsprechend 63,0 mg Invertzucker,<sup>1)</sup> entsprechend 59,9 mg Saccharose.

Für 200 ccm der ursprünglichen Lösung berechnen sich also 1,5973 g Saccharose = 99,80 ‰.

Bei den in Pflanzenauszügen mit der Hefe vorgenommenen Inversionen ergaben sich beinahe immer gut übereinstimmende Resultate. In zweifelhaften Fällen wurde, um die Vollständigkeit der Inversion zu prüfen, die von der Hefe abfiltrierte Lösung nochmals mit 5%iger krystallisierter Citronensäure 5 Minuten in kochendem Wasserbade erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit fester Soda neutralisiert, auf das ursprüngliche Volumen gebracht und die Reduktion ermittelt. Die Maltose wird, wie aus den Versuchen von Davis und Daish (10, S. 450—452) zu entnehmen ist, in Gegenwart von Natriumacetat, das der Auszug infolge seiner Vorbehandlung enthält, selbst bei einer Konzentration von 10% Citronensäure und einer Kochdauer von 10 Minuten kaum angegriffen; sie bleibt also auch bei dieser Nachprüfung sicher unverändert.

Daß die Maltose während der 24stündigen Inversion des Rohrzuckers in schwach saurer Lösung praktisch nicht verändert wird, wurde auf folgende Weise festgestellt:

Für 10 ccm einer Maltoselösung war ein Thiofulfatverbrauch von 13,4 ccm nach der Reduktion gefunden worden; 50 ccm derselben Lösung wurden dann mit 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt und mit etwas Thymollösung für 24 Stunden in den Thermostaten von 53° C. gebracht. Nach

<sup>1)</sup> Bei allen folgenden Berechnungen wurden Mengen über 0,05 mg auf 0,1 mg aufgerundet, Mengen unter 0,05 mg weggelassen.

dem Abkühlen und Auffüllen auf 50 ccm ergaben 10 ccm dieser Lösung wieder einen Thiosulfatverbrauch von 13,4 ccm.

#### 4. Die Bestimmung der Maltose.

Zur Ermittlung der Maltose haben Brown und Morris mit Salzsäure 3 Stunden auf kochendem Wasserbade digeriert. Dabei aber läßt sich ein Verlust an Dextrose und mehr noch an der sehr leicht durch Mineralsäuren zerstörbaren Lävulose, die ja bei der gleichzeitig erfolgenden Rohrzuckerinversion entsteht, nicht umgehen. In neuerer Zeit ist daher die Isolierung der Maltose durch Vergären der andern Zuckerarten mit maltasefreien Hefen als der einzig einwandfreie Weg zur quantitativen Bestimmung dieses Zuckers in Gebrauch. Ich habe die maltasefreien Hefen *Torula pulcherrima* und *Saccharomyces Marxianus* benutzt.<sup>1)</sup>

*Torula pulch.* vergärt, da ihr auch die Invertase fehlt, nur Dextrose und Lävulose. Sie schien nach den bisher vorliegenden Untersuchungen (vgl. 16) auch in Gemischen mit Saccharose ein sehr rasches und vollkommenes Vergären zu versprechen. Tatsächlich habe ich auch in reinen Zuckergemischen mit dieser Hefe sehr gute Resultate erzielt: die Vergärung war bei einer Temperatur von 32° C. nach 5—6 Tagen, wie die Untersuchung des Gärrückstandes zeigte, stets vollständig. Beispiel:

10 ccm einer Maltoselösung ergaben 72,0 mg Cu entsprechend 61,8 mg Maltose.

Zweimal 25 ccm dieser Lösung wurden dann mit je 25 ccm einer circa 1,6%igen Auflösung eines Gemisches von Saccharose + Dextrose + Lävulose in Raulinscher Lösung in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen gemischt. Die Kölbchen waren mit Wattepfropfen verschlossen, durch die je ein dünnes Glasrohr in die Flüssigkeit hinabreichte. Das Lumen des Röhrchens war mit einem Wattepfropfen verstopft. Die Sterilisation erfolgte an 2 aufeinander folgenden Tagen (jedesmal 20—30 Minuten langes Erhitzen im Sterilisator). In die Kölbchen

<sup>1)</sup> Die Hefen wurden vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, bezogen.

wurden je 1—2 Ösen Hefe aus einer Reinkultur von *Torula pulch.* auf Bierwürze-Invertzucker-Agar eingetragen. Sie wurden dann im Thermostaten von 32° sich selbst überlassen. Nach längstens 24 Stunden waren starke Vermehrung der Hefe und Gärungserscheinungen (Blasen, Alkoholgeruch) zu beobachten. Täglich wurde durch Einblasen von Luft in die Röhrrchen Kohlensäure und Alkohol wenigstens teilweise entfernt. Am 6. Tage wurde der Rückstand untersucht.

Je 10 ccm der auf 50 ccm gebrachten, mit etwas Aluminiumhydroxyd geschüttelten und dann filtrierten Lösungen ergaben:

a) 36,8 mg Cu entsprechend 31,1 mg Maltose.

Auf 10 ccm der ursprünglichen Lösung berechnet sich also

$$2 \times 31,1 \text{ mg} = 62,2 \text{ mg Maltose} = 100,6\%$$

b) 36,2 mg Cu entsprechend 30,7 mg Maltose.

Auf 10 ccm der ursprünglichen Lösung berechnen sich

$$2 \times 30,7 \text{ mg} = 61,4 \text{ mg Maltose} = 99,4\%$$

Wesentlich anders lag die Sache bei Pflanzenauszügen: es versagte nämlich *Tor. pulch.* in gut vorbehandelten neutralen Extrakten manchmal gänzlich, manchmal trat erst nach einigen Tagen oder nach zweimaliger Impfung Vermehrung der Hefe und Gärung ein; auch im Falle sofortiger Gärung, wie z. B. in den Extrakten von *Vitis vinifera*, blieb doch *Tor. pulch.* selbst nach 17—20 Tagen noch mehr oder weniger hinter *Saccharomyces Marx.* zurück. Bei der Vergärung der Zucker in den Auszügen wurden je 5 ccm Hefenwasser zu je 50 ccm zugesetzt. Versuche mit reiner Zuckerlösung zeigten, daß dieser Zusatz zur Herbeiführung einer kräftigen Gärung genügt.

Bemerkenswert ist, daß das Verhalten von *Tor. pulch.* in den Auszügen der Blätter von verschiedenen Pflanzen ganz verschieden war. Augenscheinlich ist eine gewisse Anpassung der sehr empfindlichen Hefe an das jeweilige Substrat erforderlich, was auch daraus hervorgeht, daß z. B. ein mit *Tor. pulch.* geimpftes Extrakt erst nach mehreren Tagen Vermehrung der Hefe und Gärungserscheinungen zeigte, die einmal in Vermehrung begriffene Hefe aber sofort starke Gärung hervorrief,

als sie in ein anderes, mit demselben Extrakt beschicktes Kölbchen übergeimpft wurde; doch war auch dann die Vergärung nicht vollständig, wie die Untersuchung des Rückstandes zeigte.

*Saccharomyces* Marx. vergärt außer Dextrose und Lävulose auch Saccharose. Es wurden zunächst Versuche mit Zuckerlösungen angestellt. Als Beispiel sei eine Trennung von Dextrose und Maltose angeführt.

10 ccm einer Maltoselösung gaben 61,0 mg Cu entsprechend 52,2 mg Maltose.

In je 50 ccm derselben Lösung wurden 0,750 g Dextrose aufgelöst und 5 ccm Hefenwasser zugesetzt. Die Sterilisation erfolgte je eine Stunde lang an 2 aufeinander folgenden Tagen; die Hefe wurde aus einer frischen Reinkultur auf invertzuckerhaltigem Bierwürze-Agar übertragen; die Kölbchen wurden für 8 Tage in den Thermostaten von 32° gebracht. Am 9. Tage wurde das Volumen des Gärrückstandes gemessen, die Lösung mit etwas Aluminiumhydroxyd geschüttelt und filtriert.

a) 53 ccm; davon ergaben 10,6 ccm (entsprechend 10 ccm der ursprünglichen Lösung):

63,1 mg Cu entsprechend 54,0 mg Maltose = 103,5%.

b) 53 ccm; davon gaben 10,6 ccm (entsprechend 10 ccm der ursprünglichen Lösung):

63,7 mg Cu entsprechend 54,5 mg Maltose = 104,4%.

Wie man sieht, ist nach dieser Zeit die Vergärung bis auf wenige Milligramme vollständig. In Pflanzenauszügen ist allerdings auch für *Saccharomyces* Marx. eine längere Zeit zur vollständigen Aufarbeitung der Zucker erforderlich. Nach meinen Erfahrungen ist in solchen Extrakten die Gärung erst nach 17—19 Tagen mit Sicherheit beendet. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die Hefe in mit Bleiessig gereinigten Auszügen sich rascher vermehrt als in Auszügen, die mit Bleizucker gereinigt sind; wenigstens trifft dies für die Dikotylen zu. Bei der Analyse der Blattpulver wurden jedesmal

50 ccm des Extraktes mit *Torula pulch.*,

50 ccm „ „ „ „ *Sacch. Marx.* und

50 ccm „ „ „ „ *Tor. pulch.* + *Sacch. Marx.*

geimpft. Als Nährflüssigkeit wurden stets 5 ccm steriles Hefenwasser zu je 50 ccm des Auszuges gegeben.

Die mit *Tor. pulch.* allein beschickten Gärflüssigkeiten waren in der Regel unbrauchbar, während die mit *Sacch. Marx.* geimpften Resultate lieferten, die selten um mehr als 2 mg Maltose schwankten. Für die Vergleichung der Zuckerverhältnisse im Blatt zu verschiedenen Zeiten ist dies hinreichend genau und beweist gleichzeitig, daß eine merkliche Assimilation nicht vergärbare Zuckerarten oder eine namhafte Beeinflussung des Resultates durch Zersetzungsprodukte der Hefe in dieser Zeit nicht stattfindet, die Flüssigkeiten also ruhig 19 Tage im Thermostaten bleiben können.

### 5. Die Bestimmung der Stärke.

Die gebräuchlichsten Verfahren zur Ermittlung der Stärke in pflanzlichen Substanzen sind das Hochdruckverfahren von Reinke (vgl. 17, S. 439) und das Diastase-Salzsäureverfahren von Märcker (vgl. 17, S. 438). Die direkte Hydrolyse der Stärke durch Mineralsäuren ist selbstverständlich nicht angängig, weil dabei eine weitgehende Verzuckerung anderer Körper, vor allem der Hemicellulosen notwendig stattfinden muß. Aber auch das Hochdruckverfahren birgt die Gefahr einer erheblichen Hydrolyse von Pentosanen und Hexosanen infolge des starken Druckes in sich. Bei Zusatz von organischer Säure wird diese Gefahr noch bedeutend erhöht. Es kann aber auch andererseits eine teilweise Karamelisierung oder auch Reversion des gebildeten Zuckers eintreten (vgl. König, Bd. 3, 1. Teil, S. 439). Die Märckersche Methode bedient sich zur Aufschließung der Stärke der Malzdiastase. Dieses Verfahren ist insofern etwas umständlich, als bei richtiger Ausführung auch noch eine Zuckerbestimmung des Malzauszuges selbst vorgenommen und die mit dem Malz zugesetzte Zuckermenge von dem Stärke-zucker abgerechnet werden muß. Auch manche käufliche Diastasepräparate enthalten, wie ich mich überzeugt habe, reduzierende Körper, deren Menge festzustellen und in Abzug zu bringen ist. Außerdem sind im Malz stets Cytasen ent-



halten (v. Lippmann, Bd. 1, S. 214), sodaß auch Hemicellulosen möglicherweise in Lösung gehen und, durch die Salzsäure später verzuckert, einen nicht unerheblichen Fehler verursachen. Der durch die Hydrolyse von Pentosanen bedingte Gehalt an Pentosen kann allerdings sowohl in der Analysenflüssigkeit als auch im Malzauszug durch die Furfurolbestimmung ermittelt werden: dasselbe gilt auch für das Hochdruckverfahren. Derartige Korrekturen komplizieren aber die Stärkebestimmung außerordentlich.

Es schien daher die Aufschließung der Stärke durch das Ptyalin des Speichels ein sehr viel einfacheres und dankbareres Verfahren bei der Analyse von Pflanzenmaterial. Der menschliche Speichel enthält bekanntlich außer einer geringen Menge anorganischer Salze und dem Mucin noch Maltase und Ptyalin.<sup>1)</sup> Die außerordentliche Wirksamkeit dieses Fermentes ist erst neuerdings wieder durch die Untersuchungen von Biedermann (3) dargetan worden.

Da Angaben über die Verwendbarkeit des Ptyalins in der Laboratoriumspraxis meines Wissens nicht vorliegen, mußten erst Versuche in dieser Richtung angestellt werden.

Ein roher Versuch mit durch Alkohol entzuckertem und entfärbtem Blattpulver von *Tropaeolum majus*, das mit einigen Tropfen einer Jodjodkalilösung zunächst schwarzblaue Färbung gab, zeigte das leichte Eindringen des Ptyalins in die Pflanzenzelle und seine kräftige Einwirkung dortselbst: eine kleine Menge des feingepulverten Materials war mit wenig Wasser auf kochendem Wasserbade  $\frac{1}{2}$  Stunde zur Verkleisterung der Stärke erhitzt worden. Nach dem Abkühlen wurde sie mit ca. 5 ccm Speichel versetzt, gut durchmischt und in den Thermostaten von 40° C. gebracht. Nach 3 Stunden wurde eine Probe entnommen und mit Jodjodkalilösung geprüft; die blauschwarze Färbung war bereits einer grünlichbraunen gewichen. Nach weiteren 3 Stunden war weder mikroskopisch noch makroskopisch mehr Stärke nachzuweisen: einige Tropfen Jodjodkali erzeugten nur noch Gelbfärbung.

Weitere Versuche zeigten, daß die Fermentation der

<sup>1)</sup> Eiweiß kommt in Spuren vor.

Stärke in gegebener Zeit um so vollkommener ist, je kleiner die Menge des Blattpulvers ist, bei gegebener Blattpulvermenge aber der Grad der Einwirkung von der Einwirkungsdauer abhängt. Eine wesentliche Rolle spielt natürlich die Feinheit des verwendeten Pulvers. Die bei allen diesen Versuchen verwandten Speichelmengen betragen stets mehr als 5, nie über 8 ccm. Bedeutende Schwankungen der diastatischen Einwirkung, welche auf die zugefügten, innerhalb der angegebenen Grenzen variierenden Speichelmengen hätten zurückgeführt werden können, sind nicht beobachtet worden; auch ist ja die Menge des Speichels kein unbedingtes Maß für die darin enthaltene Enzymmenge.

Nachdem so die Verwendbarkeit des Ptyalins zur Aufschließung der Stärke im Blattmaterial erwiesen war, habe ich mit reiner Kahlbaumscher Stärke Versuche angestellt, die eine Kombination der Ptyalineinwirkung und der Hydrolyse durch Salzsäure, wie sie die Märckersche Methode angibt, darstellen. Es wurden z. B. 2 g Stärke (Wassergehalt 14,4%, Aschengehalt 0,3%) mit ca. 100 ccm heißem destillierten Wasser übergossen und  $\frac{1}{2}$  Stunde auf kochendem Wasserbad verkleistert. Hierauf wurde auf 40° abgekühlt, 5 ccm Speichel zugefügt und gut mit dem Kleister vermischt, wobei dessen Zähflüssigkeit sofort verschwand, dann die Flüssigkeit in den Thermostaten von 40° gebracht. Nach 3 Stunden wurde sie aufgeköcht, nach dem Abkühlen nochmals mit 5 ccm Speichel in den Thermostaten gebracht; 1 Stunde später wurde wieder aufgeköcht, nach dem Auskühlen auf 250 ccm aufgefüllt und filtriert; 200 ccm des Filtrates wurden mit 15 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewichte 1,13  $2\frac{1}{2}$  Stunden lang im Kochkolben mit aufgesetztem Kühlrohr im kochenden Wasserbade invertiert. Die abgekühlte Flüssigkeit wurde mit Kalilauge neutralisiert, auf 300 ccm aufgefüllt und die Reduktion ermittelt.

15 ccm ergaben 144,3 mg Cu entsprechend 73,6 mg Dextrose entsprechend 66,2 mg Stärke. Die in 15 ccm zu erwartende Stärkemenge beträgt 68,2 mg. Es sind mithin 97,1% der angewendeten Menge gefunden worden.

Auch in zahlreichen andern Versuchen konnten niemals mehr als 97,5% gefunden werden, was seinen Grund in der Zerstörung kleiner Dextrose mengen infolge des langen Kochens mit Säure haben dürfte. Auch bei der Anwendung von Malzextrakt nach den Versuchsbedingungen von Märcker wurden nur 96,8% der angewandten Stärke gefunden. Doch genügt diese Genauigkeit zum Vergleich der Stärkemengen im Blatt vollständig. Bei der vorstehenden Analyse ist allerdings der Einfluß nicht berücksichtigt, den die am Mucin gebundene Kohlenhydratgruppe, der sogenannte «tierische Gummi», möglicherweise nach der Inversion mit Säure auf die Fehlingsche Lösung hat. Bei der Analyse der Blattpulver aber kommt dies in Fortfall, weil hier zwischen dem Fermentationsprozeß und der Säurehydrolyse eine Reinigung des Saftes mit Bleiessig erfolgte und dadurch ohnehin alle Glukoproteide, Gerbstoffe usw. entfernt wurden. Das überschüssige Blei wurde in diesen Fällen mit Schwefelwasserstoff niedergeschlagen. Ein Überschuß an Bleiessig bei der Reinigung wurde nach Möglichkeit vermieden, so daß der Bleisulfidniederschlag nur gering war und eine «Mitfällung» von allenfalls noch vorhandenem Dextrin bei der Behandlung mit Schwefelwasserstoff, wie Davis und Daish vermuten (9), kaum in Frage kam.

Die Einwirkungsdauer des Ptyalins bei den Analysen des Blattmaterials war je nach der Pulvermenge verschieden; sie betrug im Durchschnitt 24—48 Stunden. Es wurden den Flüssigkeiten daher ca. 10 ccm 1%ige alkoholische Thymolösung als Antiseptikum zugesetzt und gut durchgeschüttelt. Zum Verkleistern wurden meist 80—100 ccm Wasser gebraucht; die angewandte Speichelmenge betrug selten mehr als 6 ccm. Die Einwirkung des Ptyalins wurde durch Entnahme und Prüfung kleiner Pulvermengen verfolgt. Ein bestimmtes Schema läßt sich bei der Aufschließung der Stärke im Blattpulver nicht einhalten, da es hier nicht nur auf Menge und Feinheit des Pulvers, sondern auch auf den Stärkegehalt der Blätter (Tag und Nacht!) und nicht zum wenigsten auf individuelle Unterschiede bei verschiedenen Pflanzen ankommt:

namentlich machen die Monokotylen in dieser Hinsicht einige Schwierigkeit. Darauf komme ich bei den betreffenden Analysen noch zurück.

Die weitere Behandlung war in allen Fällen die gleiche: die aus dem Thermostaten genommene Flüssigkeit wurde auf der Nutsche durch ein Doppelfilter vom Pulverrückstand mit der Pumpe abfiltriert und der Rückstand mehrmals mit warmem Wasser in der Weise nachgewaschen, daß die Pumpe beim Aufgießen des Wassers zunächst abgestellt und dieses einige Zeit mit dem Pulver in Berührung gelassen wurde; hierauf wurde scharf abgesaugt. Der gelbbraune Saft wurde mit Bleiessig gereinigt, wobei ein größerer Überschuß an letzterem durch Prüfen kleiner Proben auf dem Uhrglas zu vermeiden gesucht wurde. Darauf wurde mit der Nutsche vom Niederschlag abfiltriert und wie oben nachgewaschen; es wurde dann Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis das überschüssige Blei niedergeschlagen war, abfiltriert und nachgewaschen. Aus der wasserhellen Flüssigkeit ließ sich der Schwefelwasserstoff mittels Durchsaugen von Luft leicht entfernen. Dann wurde die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt (meist 250 ccm), 200 ccm davon mit 15 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,13) in kochendem Wasserbade  $2\frac{1}{2}$  Stunden lang erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit fester Soda neutralisiert, ihr Volumen gemessen und 40 ccm (entsprechend 10 ccm Dextroselösung + 30 ccm Wasser) zur Bestimmung des Reduktionsvermögens verwandt.

## 6. Die Vorbehandlung des Blattpulvers.

Die Blätter wurden nach dem Sammeln möglichst rasch getrocknet. Für die Bestimmung des Zucker- und Stärkegehaltes war es nun wichtig, jede Inversion durch Fermente oder Säuren während des Trockenprozesses nach Möglichkeit zu verhüten. Daher wurde das Blattmaterial gleich nach dem Pflücken portionsweise für 7—10 Minuten in den kochenden Dampftopf gebracht, um die Enzyme durch die hohe Temperatur unwirksam zu machen. Die aus dem Dampftopf genommenen Blätter

wurden sofort getrocknet und zwar geschah dies auf folgende Weise: um einen gut heizenden eisernen Ofen war ein Holzgestell angebracht, das mit Drähten rings bespannt war. An diesen wurden die einzelnen Blätter mittels kleiner Haken aufgehängt. Die Temperatur betrug an den Drähten in mittlerer Höhe bei stärkster Heizung 70—80°; auch wurde die Verdunstung durch starke Zugluft gefördert. Das Trocknen verlief deshalb so schnell, daß eine merkliche hydrolytische Einwirkung von Pflanzensäuren auf die Di- und Polysaccharide wohl nicht angenommen werden kann. Sowohl das Sammeln als auch das Trocknen des oft sehr zahlreichen Materials (z. B. 800 bis 1000 Blätter bei *Tropaeolum majus*) wurde zum Zwecke möglicher Beschleunigung von mehreren Personen vorgenommen. Die getrockneten Blätter wurden wiederholt in der Drogenmühle gemahlen und durch Drogensiebe gesiebt, bis das Pulver die nötige Feinheit besaß. Bei den Monokotylen ist dies wegen der parallelen Anordnung ihrer Blattnerven äußerst schwierig und es konnte nur ein mittelfeines Pulver erhalten werden.

### 7. Gang der Analyse.

Zu einer Analyse wurden durchschnittlich 50—60 g Blattpulver verwendet; gleichzeitig wurde der Wassergehalt des lufttrockenen Materials bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde sofort nach dem Abwägen der zu analysierenden Mengen noch eine kleine Pulvermenge im Wägegglas abgewogen und im Trockenschrank über  $P_2O_5$  bei 80—90° ca. 8 Stunden getrocknet. Das Gläschen wurde dann unter die Luftpumpe gebracht und im Vakuum in Gegenwart von  $P_2O_5$  erkalten gelassen. Der Prozeß wurde bis zur Gewichtskonstanz des Pulvers wiederholt.

Die abgewogenen, gleichgroßen, für Analyse und Kontrollanalyse bestimmten Pulvermengen wurden zur Entfernung von Fett und Chlorophyll in 2 Soxhletschen Extraktoren<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Bezogen von Warmbrunn, Quilitz u. Comp., Berlin; Preisliste 210, über chem. Geräte, Modell 1052.

mit Siebeinsatz 6—8 Tage lang mit Äther extrahiert. Das Chlorophyll ließ sich nicht bei allen Pflanzen gleich gut durch Äther entfernen; meist war die Extraktion unvollständig, so daß der Rest des Blattgrüns erst bei der folgenden Extraktion mit Alkohol aus dem Pulver entfernt wurde. Dieses wurde zur Verdunstung des Äthers zunächst in flachen Schalen ausgebreitet, dann vorsichtig in Kolben übergeführt; es wurde mit 80%igem Alkohol (50 ccm auf je 10 g Pulver) übergossen und 5—6 Tage mit diesem in Berührung gelassen. Dann wurde der Alkohol vorsichtig abgossen und aufbewahrt; der Rückstand wurde mit der gleichen Menge Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak nochmals 24 Stunden lang bei 40° ausgezogen. Hierauf wurde der Saft auf der Nutsche abfiltriert und der Rückstand mit heißem 80%igen Alkohol nachgewaschen. Während das entzuckerte und entfärbte Pulver getrocknet und für die spätere Stärkebestimmung aufgehoben wurde, ist das gesamte alkoholische Extrakt aus je einer Pulvermenge sofort weiter verarbeitet worden. Durch Destillation unter vermindertem Druck wurde der Alkohol aus dem Extrakt entfernt: der dunkelgefärbte wässrige, sehr konzentrierte Rückstand, der auch ausgeschiedenes Chlorophyll enthielt, wurde hierauf mit Wasser versetzt und gereinigt: bei den Monokotylen konnte dies mit Bleizucker geschehen, bei den Dikotylen aber war zur Erreichung einer hellen Flüssigkeit Bleiessig erforderlich. Bei einigen mit je einem der beiden Reagenzien behandelten Parallelversuchen habe ich bei den mit Bleiessig gereinigten Extrakten einen kleinen Verlust an Monosacchariden beobachtet. Da bei gleichmäßiger Behandlung die Resultate aus Parallelversuchen sonst sehr gut übereinstimmten, können diese, wenn auch kleinen Unterschiede, kaum anders als durch Bleiessigfällung verursacht erklärt werden. Von der Bleiessigreinigung konnte aber in den meisten Fällen nicht abgesehen werden, da zur Polarisation eine sehr helle Flüssigkeit nötig war und auch die Hefe in solchen Extrakten besser zu gedeihen schien. Die Bleisalzlösungen wurden zugefügt, bis kein Niederschlag mehr entstand, was durch Proben auf dem Uhrglas festgestellt wurde; auf diese Weise

ließ sich ein größerer Überschuß an Blei vermeiden. Die Extraktflüssigkeit wurde auf der Nutsche durch ein Doppelfilter, eventuell unter Zusatz von etwas Kieselgur, vom Niederschlage abfiltriert und dieser ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit, dann wurde wieder filtriert und der Rückstand nachgewaschen. Der Schwefelwasserstoff wurde durch längeres Durchsaugen (1—1½ Stunden) eines starken Luftstroms durch die Flüssigkeit entfernt. Hierauf wurde die Lösung auf ein bestimmtes Volumen, meist 300 ccm, aufgefüllt und nochmals durch ein gewöhnliches Filter zur Reinigung der Flüssigkeit von allenfalls noch vorhandenen Bleisulfidteilchen filtriert. Dann wurde sie mit fester, reiner Soda neutralisiert.<sup>1)</sup> Es wurden

zweimal 50 ccm zur Inversion der Saccharose benutzt, dreimal 50 ccm dienten zur Maltosebestimmung, der Rest wurde direkt auf sein Drehungs- und Reduktionsvermögen untersucht.

Ferner wurde stets eine Probe des Auszuges auf Pentosen geprüft. Es wurde in allen Fällen nur eine sehr schwache Rötung von Anilinacetatpapier bei der Salzsäuredestillation beobachtet, die auf geringe Furfurolmengen, wie sie auch aus dem Rohrzucker und den Hexosen entstehen können, deutet und für die Abwesenheit von Pentosen spricht. Ich habe daher von der quantitativen Bestimmung dieser Zucker, die außerdem nicht eindeutig ist (v. Lippmann, Bd. 1, S. 103), abgesehen.

Die weitere Behandlung des Auszuges bei der Rohrzuckerinversion und bei der Maltosebestimmung ist bereits im Vorausgehenden (S. 11 u. 15) besprochen worden.

Die Regulierung der Konzentration für jede Untersuchung, sowie die Berechnung der Zuckermengen läßt sich am einfachsten an einem praktischen Beispiel zeigen. Ich wähle hierzu die Analyse der in der Nacht von *Musa Ensete* geschnittenen

<sup>1)</sup> Die Lösung enthält dann meist etwas CO<sub>2</sub> gelöst, das beim Erhitzen abgegeben wird, sodaß die Flüssigkeit dann oft schwach alkalisch reagiert. Daher mußte bei der Maltosebestimmung nach der ersten Sterilisation stets nochmals die Reaktion geprüft werden.

Blätter, weil sie einen Fall darstellt, in dem sich die Meibelsche Invertzucker- und die Weinsche Maltosetabelle als unzureichend erwiesen haben.

Der mit Bleizucker gereinigte Auszug war klar und von schwach gelblicher Färbung; sein Volumen betrug 300 ccm.

Die Drehung im 200 mm-Rohr war  $1,14^{\circ}$ .

10 ccm der Flüssigkeit direkt ergaben 182,3 mg Cu.

Dieser Kupferwert gestattet, zunächst Abwesenheit der Maltose vorausgesetzt, eine rohe Schätzung der Monosaccharide, da sich Monosaccharid- und Kupfermenge ungefähr wie 1 : 2 verhalten. Es konnten also in 10 ccm Lösung 90—100 mg Monosaccharide enthalten sein. Da jedoch auch die Anwesenheit einer geringen Maltosemenge in Betracht gezogen werden mußte,<sup>1)</sup> bei Maltose sich aber Zucker- und Kupfermengen etwa wie 5 : 6 verhalten, so mußte mit einem gesamten reduzierenden Zucker von mehr als 100 mg in 10 ccm gerechnet werden. Die Lösung konnte also mehr als 1% reduzierenden Zucker enthalten und mußte daher verdünnt werden.

Es wurden 8 ccm des Extraktes mit 2 ccm Wasser verdünnt und das Reduktionsvermögen bestimmt :

8 ccm der Lösung direkt ergaben 150,7 mg Cu (A). Nach der Inversion des Rohrzuckers wurden 5 ccm der Lösung, mit 5 ccm Wasser verdünnt, auf das Reduktionsvermögen geprüft :

5 ccm der Lösung invertiert gaben	176,0 mg Cu,
aber 5 ccm der Lösung direkt gaben	101,3 mg Cu,
	mithin sind 74,7 mg Cu

für den Invertzucker zu berechnen.

Die Tabelle für Invertzucker beginnt jedoch erst mit einem Kupferwert von 90 mg, entsprechend 46,9 mg Invertzucker. Dieser Wert war aber nicht zu erreichen, ohne daß die Lösung mehr als 1% Zucker enthielt. Es blieb also nur übrig, den Zuckerwert nach der Proportion  $90 : 46,9 = 74,7 : x$  zu berechnen. Da die Differenz der Kupfermengen nur etwa

<sup>1)</sup> Über die ungefähre Maltosemenge orientiert ein schon vorher angestellter roher Versuch mit einer kleineren Blattpulvermenge (Ver-gären der übrigen Zuckerarten mit Sacch. Marx.).



15 mg beträgt, kann dies wohl ohne Bedenken geschehen. Es beträgt dann der so gefundene Invertzucker 38,9 mg; durch Multiplikation mit 0,95 berechnet sich daraus der Rohrzucker zu 37,0 mg.

Demnach: Saccharose in 100 ccm der ursprünglichen Lösung = 740 mg.

Nach vollendeter Gärung gaben 25 ccm des Gärrückstandes 20,3 mg Cu (B).<sup>1)</sup>

Auch hier wurde der Tabellenwert nicht erreicht und die Berechnung der Maltose mußte in derselben Weise wie beim Invertzucker vorgenommen werden; es wurden 17,1 mg Maltose gefunden.

Demnach: Maltose in 100 ccm der ursprünglichen Lösung = 68,4 mg.

Um nun die Kupfermenge zu finden, welche der Summe von Dextrose und Lävulose entspricht, mußte zunächst die bei (B) gefundene Menge Kupfer auf die in 8 ccm enthaltene Menge umgerechnet und von dem Kupferwert bei (A) in Abzug gebracht werden. Diese Umrechnung kann vorgenommen werden, weil für Maltose, im Gegensatz zu den andern Zuckerarten, die abgeschiedene Kupfermenge der Zuckermenge annähernd proportional (weil unabhängig von dem überschüssigen Kupfer der Fehlingschen Lösung) ist. Es ist dann  $(150,7 - 6,5)$  mg = 144,2 mg der den Monosen entsprechende Reduktionswert. Auf Dextrose berechnet ergeben sich 73,5 mg Zucker.

Demnach: Monosen in 100 ccm der ursprünglichen Lösung = 918,8 mg (C).

Bei gegebener Konzentration berechnet sich der Drehungswinkel einer Zuckerlösung im 200 mm-Rohr nach der Formel

$$\frac{[\alpha]_D^{20} \cdot p \cdot 2}{100} = \alpha \text{ x, wobei } [\alpha]_D^{20} \text{ das spezifische Drehungsver-}$$

mögen der Substanz bei 20° C. und mit Natriumlicht beobachtet, p die in 100 ccm Lösung anwesende Zuckermenge (ausgedrückt in g) bedeutet. Für Saccharose wurde  $[\alpha]_D^{20} = 66,8^\circ$ ,

<sup>1)</sup> Mittelwert aus 2 Gärversuchen, die 20,8 mg und 19,7 mg Maltose ergaben.

für Maltose  $[\alpha]_D^{20} = 137,0^\circ$  gesetzt (v. Lippmann, Bd. 2, S. 1171 und 1471). Mithin beträgt

der Drehungswinkel für Saccharose	0,99°
» Maltose	0,19°
	1,18°.

Der für den Gesamtzucker beobachtete Drehungswinkel war  $1,14^\circ$ , also beträgt die der Summe von Dextrose und Lävulose zukommende Drehung  $(1,14 - 1,18)^\circ = -0,04^\circ$ . Aus diesem und dem bei (C) gefundenen Werte läßt sich nun die Dextrose rechnerisch isolieren nach der Formel  $\frac{0,5122 \cdot b + 0,952 \cdot a}{1,49}$

= Dextrose in 100 ccm Lösung, ausgedrückt in Gramm. (Ableitung der Formel vgl. Abderhalden, Bd. 2, S. 146); b ist die der Summe beider Zuckerarten entsprechende Drehung, a der auf Dextrose berechnete Reduktionswert beider Zucker ausgedrückt in Gramm.

Wir erhalten auf die Weise

Dextrose in 100 ccm der ursprünglichen Lösung = 0,5733 g,  
 die Lävulose in 100 ccm der ursprünglichen Lösung  
 =  $(0,9188 - 0,5733) \text{ g} = 0,3455 \text{ g}$ .

Die so gefundenen Werte für die 4 Zuckerarten, berechnet für 300 ccm Lösung, stellen die in der analysierten Substanz enthaltenen Zuckermengen dar; zur Analyse waren 50 g lufttrockenes Pulver verwandt worden; sein Wassergehalt betrug 11,72%. Man erhält also die in 100 g Trockensubstanz enthaltenen Zuckermengen z. B. für Saccharose nach folgender Berechnung:

$$\text{Saccharose in 100 g} = \frac{0,740 \cdot 3 \cdot 100}{44,14} = 5,03 \text{ g.}$$

Insgesamt berechnen sich für 100 g Trockensubstanz:

}	Saccharose	5,03 g
	Maltose	0,46 g
	Dextrose	3,90 g
	Lävulose	2,35 g.

Die Kontrollanalyse wurde in der genau gleichen Weise durchgeführt; es ergaben sich für 100 g Trockensubstanz:

Saccharose	4,99 g
Maltose	0,50 g
Dextrose	3,77 g
Lävulose	2,51 g.

Zur Bestimmung der Stärke wurde jedesmal ein Teil des entzuckerten trockenen Pulverrückstandes abgewogen und in der bereits beschriebenen Weise behandelt. Bei den Stärkeblättern betrug er  $\frac{1}{8}$ , bei den Zuckerblättern  $\frac{1}{3}$  der Pulvermasse; vor der eigentlichen Behandlung wurde er meist zur Entfernung wasserlöslicher Substanzen 1—2 Tage unter Thymolzusatz mit kaltem destilliertem Wasser ausgezogen.

### III. Ergebnisse der Analysen.

#### 1. *Tropaeolum majus* L.

*Tropaeolum majus* wurde in der Versuchsabteilung des botanischen Gartens in freier sonniger Lage in mehreren Längsreihen an Drähten gezogen. Die Blätter wurden in den Mittagsstunden des 24. und in den ersten Morgenstunden des 25. Juli (1916) gesammelt. Der Tag war sonnig und heiß, zeitweise zeigten sich Gewitterwolken. Die Nacht war warm und brachte mehrfach Gewitterregen. Infolge der zahlreichen Niederschläge in den vorausgehenden Wochen waren die Blätter ungewöhnlich groß und schön entwickelt. Es wurde, soweit es möglich war, beim Pflücken darauf geachtet, daß nur intakte und dem Lichte gut exponierte Blätter entnommen wurden. Zu einer Pulvermenge von 150 g waren ca. 1000 Stück nötig.

Das sorgfältig von den Stielen befreite und im Dampftopf abgetötete Material trocknete unter den geschilderten Bedingungen außerordentlich schnell; es ließ sich bequem pulverisieren. Für die Analyse bzw. Kontrollanalyse wurden jedesmal 60 g verwandt. Die Extraktion des Chlorophylls war nach 6 Tagen der Hauptsache nach beendet, die Farbe des Pulvers gelbgrau. Die Reinigung des Extraktes wurde mit Bleiessig vorgenommen; zwar zeigte die Flüssigkeit zunächst noch dunkelgelbe Farbe, nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff jedoch war diese einer schwach gelblichen gewichen. Die

Vergärung verlief mit Sacch. Marx. glatt, mit Tor. pulch. aber erst nach zweimaliger Impfung und nachdem die Hefe einige Tage mit dem Substrat in Berührung war.

$\frac{1}{8}$  des lufttrockenen Rückstandes diente zur Ermittlung des Stärkegehaltes. Die verkleisterte Masse blieb mit ca. 7 ccm Speichel  $2\frac{1}{2}$ —3 Tage in Berührung. Nach dieser Zeit war nach der Behandlung von Proben mit Chloralhydrat und Jodjodkalilösung keine Spur von Stärke mehr mikroskopisch nachweisbar. Die Resultate sind folgende:

	24. Juli 2 h nachm. (Szt.) <sup>1)</sup> %	25. Juli 3 h vorm. (Szt.) %
Stärke . . . . .	6,44	5,62
Saccharose . . . . .	4,37	2,65
Maltose . . . . .	1,07	0,69
Dextrose . . . . .	0,48	0,26
Lävulose . . . . .	3,28	1,95
Gesamtzucker . . . . .	9,20	5,55
Gesamtkohlenhydratmenge .	15,64	11,17

Verhältnis von:

Monosacchariden : Disacchariden	1 : 1,44	1 : 1,51
Monosacchariden : Saccharose .	1 : 1,16	1 : 1,20
Dextrose : Lävulose . . . . .	1 : 6,83	1 : 7,50

## 2. Cucurbita ficifolia Bché.

Das zur Untersuchung benutzte Material wuchs auf verhältnismäßig großer Fläche auf Komposterde. Der direkten Sonnenbeleuchtung war diese Fläche nur morgens und nachmittags ausgesetzt, da auf der Südseite ein Gebäude in den Mittagsstunden Schatten warf; im übrigen waren die Lichtverhältnisse günstig. Die Blätter, große, ausgewachsene Exem-

<sup>1)</sup> Szt. = Sommerzeit.

plare, wurden am 16. August (1915) geschnitten. Der Tag war sonnig, der Himmel nur zeitweise bewölkt; die Maximaltemperatur betrug 18,5° C. Eine zweite Portion wurde in den ersten Morgenstunden des 24. August gesammelt, nach einem Tage, dessen Licht- und Temperaturverhältnisse die gleichen waren wie am 16. August. Zu 120—150 g Pulver waren ca. 60 Blätter nötig.

Das Trocknen und Pulverisieren ging in der bekannten Weise vor sich. Zu einer Analyse wurden für den «Tagversuch» je 50 g, für den «Nachtversuch» je 60 g verwandt. Die Extraktion des Chlorophylls war in der gleichen Zeit unvollkommener wie bei *Tropaeolum majus*, weshalb der alkoholische Auszug noch beträchtliche Mengen Blattgrün enthielt, die jedoch bei der späteren Reinigung verschwanden. Die Reinigung der wässerigen Lösung geschah mit Bleizucker; nach dem Entbleien war der Saft hellgelb. Er gärte mit Sacch. Marx. kräftig, mit *Tor. pulch.* nicht.

Die Einwirkung des Ptyalins (7 ccm Speichel) war nach 15—26 Stunden vollkommen.

Die Analyse ergab folgende Daten:

	16. August 3h nachm. ‰	24. August 4h vorm. ‰
Stärke . . . . .	6,06	1,50
Saccharose . . . . .	2,63	1,98
Maltose . . . . .	0,58	0,86
Dextrose . . . . .	0,00	0,82
Lävulose . . . . .	0,85	0,09
Gesamtzucker . . . . .	4,06	3,75
Gesamtkohlenhydratmenge .	10,12	5,25

Verhältnis von:

Monosacchariden : Disacchariden	1 : 3,78	1 : 3,12
Monosacchariden : Saccharose .	1 : 3,09	1 : 2,18
Dextrose : Lävulose . . . . .	—	1 : 0,11

3. *Vitis vinifera* L.<sup>1)</sup>

Die Blätter stammten von einem an der Südwand des großen Gewächshauses gezogenen Stocke, mit schönem, gut entwickeltem Laub. Ein Teil derselben wurde am 24., ein anderer am Morgen des 25. August (1916) geschnitten. Der Tag war mäßig warm, der Morgen hell (weiße Wolken), gegen Mittag kam die Sonne; die Nacht war frisch. 400 Blätter gaben etwa 200 g Pulver.

Die Behandlung der Blätter geschah in der üblichen Weise. Sie zeigten nach einigen Minuten Erhitzens im Dampftopf, wahrscheinlich infolge ihres Säuregehaltes, Braunfärbung: das Trocknen verlief relativ rasch. Für jede Analyse wurden 70 g Pulver verwandt. Die Extraktion des Chlorophylls war nach 6 Tagen der Hauptsache nach beendet. Zur Reinigung wurde Bleiessig benutzt; nach dem Entbleien war die Lösung schwach gelblich gefärbt. Sie gärte mit Sacch. Marx. und mit Tor. pulch.

Vor der Bestimmung des Stärkegehaltes wurden die Pulvermengen (je  $\frac{1}{8}$  des Rückstandes) einige Tage mit kaltem destillierten Wasser ausgezogen. Die Blätter von *Vitis vinifera* besitzen einen beträchtlichen Gehalt an Säuren, der sich noch nach dem Verkleistern geltend macht und die Wirksamkeit des Ptyalins vollständig lähmt, wie ich mich überzeugen konnte. Der Saft wurde daher vor dem Zusatz des Speichels mit fester reiner Soda neutralisiert und auch während der Einwirkung des Ptyalins wiederholt auf seine Reaktion geprüft. Nach  $1\frac{1}{2}$ —2 Tagen war keine Stärke mehr nachzuweisen. Das Ergebnis der Untersuchung ersiehe aus folgender Tabelle.

Das Vorkommen von Rohrzucker, den ich in nicht unbeträchtlichen Mengen im Weinblatt fand, ist von Deleano (8) in Abrede gestellt worden. Der Verfasser hatte zwar bei einer früheren Untersuchung (7) ein durch Säuren invertierbares Kohlenhydrat gefunden und für Saccharose gehalten, neuerdings aber glaubt er bewiesen zu haben, daß dieses Kohlenhydrat kein Rohrzucker ist. Es ist daher nötig, auf diese Frage hier etwas näher einzugehen.

<sup>1)</sup> Rasse: Gutedel.

	24. August 2 h nachm. (Szt.) %	25. August 6 h vorm. (Szt.) %
Stärke . . . . .	5,34	1,76
Saccharose . . . . .	3,12	2,28
Maltose . . . . .	0,53	0,62
Dextrose . . . . .	1,01	0,74
Lävulose . . . . .	1,66	2,52
Gesamtzucker . . . . .	6,32	6,16
Gesamtkohlenhydratmenge .	11,66	7,92

Verhältnis von:

Monosacchariden : Disacchariden	1 : 1,37	1 : 0,89
Monosacchariden : Saccharose .	1 : 1,17	1 : 0,70
Dextrose : Lävulose . . . . .	1 : 1,64	1 : 3,41

Ich habe die Auszüge nicht mit Säure, sondern mit Hefeninvertase behandelt. Daraufhin trat eine starke Erhöhung des Reduktionsvermögens ein; so z. B. erhielt ich aus einem Extrakte für

8 ccm der Lösung direkt	82,0 mg Cu
8 ccm » » nach Inversion	185,6 mg Cu
	103,6 mg Cu mehr.

Da nun in der benutzten Hefe, *Saccharomyces Marxianus*, außer Invertase kein anderes kohlenhydrathydrolysierendes Enzym gefunden worden ist (vgl. 11, S. 110; 12), so konnte es sich hier nur um Invertasewirkung handeln. Damit ist die Gegenwart eines Fruktosides, d. h. einer Zuckerart, welche die Lävulose in gleicher Bindung enthält wie der Rohrzucker und deshalb durch Invertase angegriffen wird, bewiesen. Zu den Fruktosiden sind außer Saccharose die Trisaccharide Raffinose und Gentianose und das Tetrasaccharid Stachyose zu rechnen. Von diesen Verbindungen wird durch Invertase Raffinose in Lävulose und das Disaccharid Melibiose, Gentianose in Lävulose und das Disaccharid Gentiobiose Stachyose in Lävulose und Mannatrisaccharid gespalten. Da nun der Ver-

gärung der Zucker ebenfalls mit Sacch. Marx. vorgenommen wurde, so konnte nur Vergärung der Lävulose, nicht aber der Melibiose, Gentiobiose oder des Mannatrisaccharids eintreten, weil zur Spaltung dieser Zucker die entsprechenden Enzyme fehlen. Es müßte daher im Gärrückstand die zweite Komponente des Fruktosides, das Di- oder Trisaccharid außer Maltose zu finden sein. Nun ist das Reduktionsvermögen der Gentiobiose ungefähr gleich dem der Maltose, das der Melibiose ist etwas schwächer, das des Mannatrisaccharids beträgt ca.  $\frac{1}{3}$  von dem der Dextrose. 8 ccm des Gärrückstandes (entsprechend 8 ccm der ursprünglichen Lösung) lieferten eine Kupfermenge von 13,4 mg. Die in 8 ccm nach der Inversion des Fruktosides erhaltene, den beiden Komponenten entsprechende Kupfermenge betrug, wie aus obiger Berechnung ersichtlich, 103,6 mg. Mithin kämen für die Lävulose allein  $(103,6 - 13,4) \text{ mg} = 90,2 \text{ mg Cu}$  in Betracht. Dieser Wert zeigt ohne weiteres, daß von der Anwesenheit eines andern Fruktosides als Rohrzucker nicht die Rede sein kann; denn werden die Kupferwerte 90,2 mg auf Lävulose und 13,4 mg (ohne Rücksicht auf etwa vorhandene Maltose) auf Melibiose, Gentiobiose oder Mannatrisaccharid roh berechnet, so ergibt sich, daß Lävulose bei weitem überwiegt, während sie sich im Fruktosid zur zweiten Komponente ungefähr wie 1 : 3 bzw. 1 : 4 verhält. Wäre also einer dieser Zucker statt Rohrzucker anwesend, so müßte der Gärrückstand ein bedeutend höheres Reduktionsvermögen zeigen. Auch die polarimetrischen Beobachtungen hätten auf die Anwesenheit anderer Zucker hindeuten müssen.

Es wurde noch folgender Versuch angestellt: 130 g Blattpulver von *Vitis vinifera* wurden mit 700 ccm 80%igem Alkohol übergossen. Das Extrakt, das nach einiger Zeit kräftig sauer reagierte, wurde mit Kalilauge neutralisiert und für 24 Stunden in den Thermostaten von 40° gebracht. Darnach wurde mit der Nutsche abfiltriert und der Pulverrückstand mit heißem 80%igem Alkohol nachgewaschen. Der Alkohol wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand mit destilliertem Wasser versetzt und mit Bleiessig gereinigt. Nach dem



Abfiltrieren vom Niederschlag wurde nochmals mit Bleiessig versetzt und dann mit konzentriertem Ammoniak gefällt. Der voluminöse weiße Niederschlag wurde auf einem gewöhnlichen Filter gesammelt, mit Wasser ausgewaschen, in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Bleisulfid wurde abfiltriert, der überschüssige Schwefelwasserstoff mittels Durchsaugen von Luft durch das Filtrat entfernt. Die Lösung wurde, nachdem sie nochmals mit wenig Kalilauge neutralisiert war, in einer flachen Schale durch gelindes Erwärmen eingedampft. Es resultierte schließlich ein Krystallbrei, der aus Aggregaten und sehr kleinen Einzelkrystallen von verschiedenem Habitus bestand; er wurde krystallographisch nicht näher untersucht. Hingegen wurde ein Teil desselben zwecks chemischer Untersuchung in Wasser gelöst. In dieser Lösung konnten an Kohlenhydraten vorhanden sein: Dextrose und Lävulose, da diese Zucker mit ammoniakalischem Bleiessig als Glukosat und Fruktosat gefällt werden; ferner Rohrzucker, der bekanntlich als Bleisaccharat gefällt wird, eventuell statt seiner Raffinose und Stachyose, da diese Kohlenhydrate in 80%igem Alkohol bei 40° etwas löslich sind und ebenfalls Bleiverbindungen liefern; außerdem größere oder kleinere Mengen von Inosit, der im Weinlaub gefunden wird. Gentianose ist in starkem Alkohol unlöslich und daher nicht zu erwarten.

Die Lösung wurde zunächst auf ihr Reduktionsvermögen untersucht:

10 ccm der Lösung ergaben 105,7 mg Cu.

Nach Zusatz von 1—2 Tropfen Ammoniak zur Beseitigung etwaiger Multirotation wurde die Lösung polarimetrisch untersucht; sie gab eine Rechtsdrehung von  $+ 0,34^{\circ}$  <sup>1)</sup>.

Darauf wurden 50 ccm der Lösung mit 4 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,13) 30 Minuten bei 68—70° invertiert, dann mit fester Soda neutralisiert und das Volumen gemessen.

10,8 ccm (entsprechend 10,0 ccm der ursprünglichen Lösung) gaben 179,1 mg Cu.

<sup>1)</sup> Die Lösung konnte nicht konzentrierter hergestellt werden, da sie sonst für die genaue polarimetrische Beobachtung nicht hell genug gewesen wäre. Diese wurde mit möglichster Sorgfalt wiederholt vorgenommen.

Bei der Polarisation wurde eine Linksdrehung von  $-0,27^\circ$  beobachtet. Es berechnet sich also die Drehungsabnahme der Lösung nach der Inversion zu  $[+0,34 - (-0,27)]^\circ = 0,61^\circ$ .

Berechnen wir nun die Differenz der beiden Reduktionswerte auf Invertzucker, so erhalten wir 38,2 mg Invertzucker entsprechend 36,3 mg Rohrzucker: also Rohrzucker in 100 ccm Lösung = 0,363 g.

Der dieser Zuckermenge zukommende Drehungswinkel beträgt 
$$+ \frac{66,8 \cdot 0,363 \cdot 2}{100} = 0,485^\circ.$$

Nach der Inversion beträgt dann der Drehungswinkel

$$\text{für Lävulose} \quad - \frac{92,5 \cdot 0,191 \cdot 2}{100} = -0,353^\circ$$

$$\cdot \text{Dextrose} \quad + \frac{52,5 \cdot 0,191 \cdot 2}{100} = +0,201^\circ$$

$$\cdot \text{Invertzucker} \quad - 0,152^\circ.$$

Es läßt sich also aus den Reduktionswerten eine Drehungsabnahme von  $[+0,485 - (-0,152)]^\circ = 0,637^\circ$  berechnen. Die Differenz der beobachteten und der aus den erhaltenen Reduktionswerten berechneten Drehungsabnahme beträgt also  $(0,637 - 0,610)^\circ = 0,027^\circ$ . Somit dürfte die Anwesenheit von Rohrzucker festgestellt sein; wäre statt seiner Raffinose oder Stachyose vorhanden, so könnten die obigen Werte nicht derart übereinstimmen, da das Drehungsvermögen dieser Zucker sowohl vor wie nach der Inversion von dem des Rohrzuckers abweicht.

Deleano (8, S. 82f.) hat das Blattpulver mit absolutem Alkohol extrahiert; nach dem Entfernen des letzteren hat er aus der neutralisierten wässerigen Lösung nach dem Eindampfen selbst nach wochenlangem Stehen keine Krystalle erhalten. Der Sirup wurde hierauf mit Bleiessig gereinigt; nach dem Abfiltrieren vom Niederschlage wurde mit Bleiessig und konzentriertem Ammoniak gefällt, wobei der Rohrzucker als Bleisaccharat ausfallen sollte. Der entstandene Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt; vom Bleisulfid wurde

abfiltriert, der Schwefelwasserstoff entfernt und die Flüssigkeit zur Sirupkonsistenz eingedampft: es hatten sich nach zwei Wochen noch keine Krystalle abgeschieden. Den Sirup hat Deleano dann mit heißem absoluten Alkohol mehrmals ausgezogen und den Alkohol verdunsten lassen. Auch aus diesem Sirup haben sich (nach zweimonatlichem Stehen) keine Krystalle gebildet. Ein zweiter Versuch mit einer neuen Blattpulvermenge ergab das gleiche Resultat. Daraus schließt der Verfasser auf Abwesenheit von Rohrzucker in den Weinblättern.

Den Sirup hat Deleano nicht weiter auf Rohrzucker untersucht. Es ist übrigens zweifelhaft, ob bei einer solchen Prüfung die Gegenwart von Saccharose sich hätte feststellen lassen, da die Vorbehandlung des Materials ungeeignet war:

Das Weinlaub wurde bei 40—45° getrocknet. Da das Trocknen bei dieser Temperatur nur langsam vor sich geht, war sowohl den reichlich im Zellsafte von *Vitis vinifera* vorhandenen organischen Säuren als auch der Invertase, die ihr Wirkungsoptimum bei dieser Temperatur besitzt, Gelegenheit zur Hydrolyse des Rohrzuckers gegeben.

Nach Mischen mit Calciumcarbonat hat Deleano 1 kg Blattpulver 1—2 Stunden bei 50° mit absolutem Alkohol extrahiert. Nun sind zwar in absolutem Alkohol die eventuell in Frage kommenden höheren Fruktoside unlöslich, aber auch Saccharose ist schwer löslich und es dürfte daher eine Extraktionsdauer von 1—2 Stunden zur Erlangung leicht nachweisbarer Mengen kaum genügen. Da nun Dextrose und Lävalose in absolutem Alkohol bei gesteigerter Temperatur ziemlich löslich sind, so ist nicht recht verständlich, warum Deleano überhaupt keine Krystalle erhalten hat, zumal er angibt, daß der Sirup viele direkt reduzierende Kohlenhydrate enthält. Jedenfalls ist das Ausbleiben der Krystallisation allein kein hinreichender Beweis für die Abwesenheit von Rohrzucker in den Blättern von *Vitis*. Daß dieser Zucker tatsächlich vorhanden ist, zeigen die von mir gemachten, oben angeführten Beobachtungen.

In derselben Arbeit sucht der Verfasser die direkt reduzierenden Kohlenhydrate des Weinlaubes zu bestimmen, Maltose

läßt er dabei außer acht; Dextrose und Lävulose berechnet er aus dem Reduktions- und Drehungsvermögen des Auszuges. Da dieser Berechnung die Voraussetzung zugrunde liegt, daß außer diesen Monosacchariden kein anderer Zucker zugegen ist, so sind die gegebenen Zahlenwerte natürlich nicht richtig; außerdem liegt ein Rechenfehler vor; daß der Verfasser von l-Fruktose statt von d-Fruktose spricht, beruht wohl ebenfalls auf einem Versehen.

Gelegentlich einer Arbeit über den Atmungsstoffwechsel abgeschnittener Laubblätter hat Deleano bereits früher (7) die Kohlenhydrate des Weinlaubes untersucht. Er betrachtet die für Mono- und Disaccharide erhaltenen Zahlen aus verschiedenen, sehr berechtigten Gründen selbst nur als rohe Annäherungswerte (7, S. 559). Ich möchte noch hinzufügen, daß das Verhältnis von Monosacchariden zu Disacchariden schon der Behandlung der Blätter wegen — sie wurden an Fäden aufgereiht und an der Luft getrocknet — kaum stimmen dürfte, weil bei so langsamem Trocknen Inversion des Rohrzuckers durch Invertase und Säuren eintreten kann. Aber auch der Stärkewert dürfte kein wahres Bild von der Menge dieses Kohlenhydrates geben, da die Aufschließung der Stärke nach Säurezusatz unter Druck vor sich ging (7, S. 555), sodaß auch Hemicellulosen in Lösung gehen konnten; auch erfolgte vor der Inversion mit Salzsäure, die übrigens in doppelt so konzentrierter Lösung vorgenommen wurde, als üblich ist (15 ccm HCl v. spez. Gew. 1,125 auf 100 ccm, statt auf 200 ccm), keine Reinigung des Saftes; es konnten daher auch noch aus andern Körpern Kohlenhydratgruppen abgespalten werden.

#### 4. *Musa Ensete* Gmel.

Je ein Blatt wurde von zwei sehr schönen Pflanzen, die direkter Sonnenbeleuchtung ausgesetzt waren, in den Mittagsstunden des 23. und in den ersten Morgenstunden des 24. August (1915) entnommen. Der Tag war warm und sonnig, nur zeitweise zeigten sich Wolken. Die Nacht war warm.

Die Blätter wurden von der Mittelrippe getrennt, diese, sowie die Blattfläche in mehrere kleinere Stücke zerlegt, ab-

getötet und getrocknet. Das Trocknen verläuft bei den Monokotylen etwas langsamer; die Teile der Mittelrippe mußten noch der Länge nach gespalten werden und trockneten nur langsam. Das Mahlen des exsikkatortrockenen Materials machte der Nervatur wegen Schwierigkeit und das Pulver war nur mittelfein (die allergrößten aus der Mittelrippe stammenden Teilchen wurden ausgeschaltet). Zwei Blätter lieferten eine Pulvermenge von ca. 100 g (lufttrocken).

Zur Analyse wurden für den «Tagversuch» je 45 g, für den «Nachtversuch» je 50 g lufttrockenes Pulver abgewogen. Das Chlorophyll ließ sich relativ leicht mit Äther ausziehen. Die Reinigung wurde mit Bleizucker vorgenommen; es resultierte eine fast wasserhelle Flüssigkeit. Sowohl mit Sacch. Marx. als auch mit Tor. pulch. erfolgte kräftige Gärung, die aber bei Sacch. Marx. in der gleichen Zeit vollkommener war, wie die Untersuchung des Gährückstandes zeigte.

Zur Bestimmung der Stärke wurde  $\frac{1}{3}$  des abgewogenen trockenen Pulverrückstandes (ca. 10 g) verwandt. Diese relativ große Pulvermenge war nötig, weil der Stärkegehalt von *Musa Ensete* nur gering ist. Der letzte Rest der Stärke konnte auch nach tagelanger Einwirkung des Ptyalins und mehrmaligem Speichelzusatz nicht entfernt werden. Er mag, so weit es sich nach der Aufhellung mit Chloralhydrat und Behandlung einer Probe mit Jodjodkalilösung mit Hilfe des Mikroskops erkennen ließ,  $\frac{1}{10}$  der Gesamtstärke betragen haben. Dieselbe Erfahrung habe ich auch bei der Untersuchung von *Canna iridiflora* gemacht. Es muß dahingestellt bleiben, ob die Stärke dieser Monokotylen überhaupt schwerer von Ptyalin angegriffen wird, oder ob die gröbere Beschaffenheit des Pulvers nur das völlige Eindringen des Enzyms in die Zellen erschwerte. Dem mikroskopischen Bilde nach schien letzteres der Fall zu sein; denn aus den peripheren Teilen eines Pulverpartikelchens, sowie aus den Schließzellen war die Stärke in der Regel verschwunden. Andererseits kamen neben kleineren, noch etwas stärkeführenden Teilchen auch größere, völlig entstärkte vor. Die Menge der zurückgebliebenen Stärke war nicht so groß, daß sie die Bestimmung dieses Kohlenhydrates unmöglich gemacht hätte.

Die Resultate für *Musa Ensete* sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

	23. August 1 h nachm. %	24. August 4 h vorm. %
Stärke . . . . .	0,67	0,38
Saccharose . . . . .	7,36	5,01
Maltose . . . . .	0,68	0,48
Dextrose . . . . .	2,62	3,84
Lävulose . . . . .	2,43	2,43
	} 5,05	} 6,27
Gesamtzucker . . . . .	13,09	11,76
Gesamtkohlenhydratmenge .	13,76	12,14
Verhältnis von:		
Monosacchariden : Disacchariden	1 : 1,59	1 : 0,88
Monosacchariden : Saccharose .	1 : 1,46	1 : 0,80
Dextrose : Lävulose . . . . .	1 : 0,93	1 : 0,63

### 5. *Canna iridiflora* R. und Pav.

Von *Canna iridiflora* standen nur einige, aber große und sehr gut entwickelte Pflanzen zur Verfügung. Sie befanden sich in der biologischen Abteilung des botanischen Gartens an einem Platze, der, frei gelegen, dem direkten Sonnenlichte zugänglich war. Es wurden je 15 Blätter am Mittag des 24. und am Morgen des 25. August (1916) gleichzeitig mit dem Laub von *Vitis vinifera* geschnitten. Der Tag war, wie bereits S. 30 angegeben wurde, hell und gegen Mittag sonnig; die Nacht war frisch.

Das Pulverisieren machte dieselben Schwierigkeiten wie bei *Musa*; es konnte auch hier nur ein mittelfeines Pulver erhalten werden. Auch das Mahlen des Materials mit Quarzsand in einer Kugelmühle ergab kein besseres Resultat. Je 15 Blätter gaben ca. 75 g Pulver; zu jeder Analyse wurden 35 g verwandt. Die Extraktion des Chlorophylls war weniger vollkommen als bei *Musa*. Zur Reinigung der wässrigen Lösung wurde Bleizucker verwandt; die Flüssigkeit war wasserhell; es erfolgte mit beiden Hefen sofortige Gärung.

Für die Stärkebestimmung gilt das bei Musa Gesagte.  
Die Analysen ergaben folgende Resultate:

	24. August 2 h nachm. (Szt.) %	25. August 6 h vorm. (Szt.) %
Stärke . . . . .	1,27	0,86
Saccharose . . . . .	5,89	4,68
Maltose . . . . .	0,38	0,50
Dextrose . . . . .	0,00	0,00
Lävulose . . . . .	0,30	0,19
Gesamtzucker . . . . .	6,57	5,37
Gesamtkohlenhydratmenge .	7,84	6,23
Verhältnis von:		
Monosacchariden : Disacchariden	1 : 20,90	1 : 27,26
Monosacchariden : Saccharose .	1 : 19,63	1 : 24,63

#### IV. Allgemeines.

Beim Überblicken der gewonnenen Resultate bemerken wir trotz der Unterschiede, die sich aus der Verschiedenheit des Pflanzenmaterials ergeben, gewisse Gleichmäßigkeiten in der Verteilung der Kohlenhydrate.

Betrachten wir zunächst das Mengenverhältnis der Zucker, so sehen wir, daß dem Rohrzucker gegenüber alle andern Zuckerarten zurücktreten; nur bei *Vitis vinifera* wird er in der Nacht von der Lävulose um weniges übertroffen. In allen Fällen nimmt der Gehalt an Rohrzucker in der Dunkelheit ab. Den höchsten Betrag erreicht er in *Musa Ensete* mit 7,36% am Tage; dann schließen sich *Canna iridiflora*, *Tropaeolum majus*<sup>1)</sup> und *Vitis vinifera* an; die kleinste Saccharosemenge finden wir in *Cucurbita ficifolia* mit 2,63%. Natürlich ist diese Reihenfolge eine zufällige und keine feststehende, denn es waren nicht alle diese Pflanzen vor der Entnahme der Blätter den gleichen Außenbedingungen ausgesetzt. Überhaupt dürfte

<sup>1)</sup> Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die für *Trop. m.* von mir berechneten Werte sich auf das gesamte Trockengewicht des Pulvers beziehen, während Brown und Morris ihre Resultate auf die nach der Ätherextraktion erhaltene Trockengewichtsmenge berechnet haben.

man, sollten die Objekte hinsichtlich ihres Gehaltes an der einen oder andern Zuckerart untereinander verglichen und zur Lichtwirkung in Beziehung gebracht werden, die bei der Analyse des Extraktes gewonnenen Zahlen nur auf die assimilierende Fläche berechnen, nicht aber auf die Trockensubstanz, die bei so verschiedenen Pflanzentypen wie den untersuchten in der Flächeneinheit dem Gewichte nach nicht dieselbe sein kann. Indes lag mir ein solcher Vergleich von vornherein fern. — Deutlich tritt auch die quantitative Überlegenheit des Rohrzuckers zutage, wenn wir seine Menge zur Gesamtzuckermenge in Beziehung setzen. Nachstehende Tabelle zeigt uns dieses Verhältnis für jedes der untersuchten Objekte.

## I.

Pflanze	Tag	Nacht
	Saccharose : Gesamtzuck.	Saccharose : Gesamtzuck.
<i>Tropaeolum majus</i> . .	1 : 2,11	1 : 2,09
<i>Cucurbita ficifolia</i> . .	1 : 1,54	1 : 1,89
<i>Vitis vinifera</i> . . . .	1 : 2,03	1 : 2,70
<i>Musa Ensete</i> . . . .	1 : 1,78	1 : 2,35
<i>Canna iridiflora</i> . . .	1 : 1,12	1 : 1,15

Während also die relative, d. h. zum Gesamtzucker in Beziehung gesetzte Saccharosemenge für *Tropaeolum* bei Tag und Nacht annähernd konstant ist, sinkt sie in den andern Fällen mehr oder weniger in der Nacht; sie geht bei *Cucurbita* ungefähr vom  $\frac{2}{3}$ fachen auf das  $\frac{1}{2}$ fache, bei *Vitis* vom  $\frac{1}{2}$ fachen auf das rund  $\frac{1}{3}$ fache, bei *Musa* vom  $\frac{5}{9}$ fachen auf das  $\frac{5}{12}$ fache zurück. Bei *Canna* ist sie wiederum fast konstant und nahe 1. In keinem Falle macht der Rohrzucker während des Tages viel weniger als die Hälfte des Gesamtzuckers aus.

Im Gegensatz zum Rohrzucker ist Maltose nur in geringer Menge vorhanden; am stärksten ist sie noch in *Tropaeolum* mit rund 1% am Tage vertreten; doch steht auch dieser Wert noch in auffallendem Gegensatz zu den von Brown und Morris (bei der Assimilation unter normalen Bedingungen) erhaltenen großen Werten (vgl. S. 44, Versuch 1, c und Ver-



such 2, b). Auch schwankt der Maltosebetrag bei Tag und Nacht nur wenig, so daß in einigen Fällen die Differenzen kaum über der Fehlergrenze liegen. In der Dunkelheit nimmt die Maltose meist etwas zu, bei *Musa* und *Tropaeolum* aber ab. Auch Brown und Morris haben bei *Tropaeolum* Abnahme dieses Zuckers bei sistierter Assimilation beobachtet. Das Verhältnis zum Gesamtzucker zeigt Tabelle II.

II.

Pflanze	Tag	Nacht
	Maltose : Gesamtzucker	Maltose : Gesamtzucker
<i>Tropaeolum majus</i> . .	1 : 8,60	1 : 8,04
<i>Cucurbita ficifolia</i> . .	1 : 7,00	1 : 4,36
<i>Vitis vinifera</i> . . . .	1 : 11,93	1 : 9,94
<i>Musa Ensete</i> . . . .	1 : 19,25	1 : 24,50
<i>Canna iridiflora</i> . . .	1 : 17,30	1 : 10,54

Dextrose ist in wechselnden Mengen vorhanden. Am stärksten ist sie in *Musa* vertreten; den extremen Fall liefert *Canna*, denn hier konnte Dextrose überhaupt nicht nachgewiesen werden. Auch in *Cucurbita* war sie tagsüber nicht nachzuweisen. In *Tropaeolum* und *Vitis* dagegen war sie am Tage in Mengen von rund 0,5% bzw. 1% vorhanden. Was ihre Zu- oder Abnahme in den Nachtstunden betrifft, so stimmen hierin nicht alle Objekte überein: bei *Tropaeolum* können wir in der Nacht eine geringe Abnahme feststellen, ebenso bei *Vitis*; bei *Cucurbita* und *Musa* aber Zunahme. Tabelle III orientiert uns über das Verhältnis der Dextrose zum Gesamtzucker.

III.

Pflanze	Tag	Nacht
	Dextrose : Gesamtzucker	Dextrose : Gesamtzucker
<i>Tropaeolum majus</i> . .	1 : 19,17	1 : 21,35
<i>Cucurbita ficifolia</i> . .	—	1 : 4,57
<i>Vitis vinifera</i> . . . .	1 : 6,26	1 : 8,32
<i>Musa Ensete</i> . . . .	1 : 4,99	1 : 3,06
<i>Canna iridiflora</i> . . .	—	—

Wir sehen, daß gerade der Zucker, in dem man vielfach den primären vermutet, zur Zeit stärkster Assimilation bei *Tropaeolum* nur bescheidenen Anteil am Gesamtzucker hat, bei *Cucurbita* und *Canna* überhaupt fehlt und im Höchsthalle, nämlich bei *Musa*,  $\frac{1}{5}$  der ganzen Zuckermenge beträgt.

Lävulose ist stets in größerer oder geringerer Menge vertreten. Sie übertrifft die Dextrose in den meisten Fällen; eine Ausnahme macht *Musa*, auch in *Cucurbita* ist Lävulose in der Nacht nur in Spuren gefunden worden. Ihren Anteil am Gesamtzucker zeigt Tabelle IV.

## IV.

Pflanze	Tag	Nacht
	Lävulose : Gesamtzucker	Lävulose : Gesamtzucker
<i>Tropaeolum majus</i> . . .	1 : 2,81	1 : 2,85
<i>Cucurbita ficifolia</i> . . .	1 : 4,77	1 : 41,66
<i>Vitis vinifera</i> . . . . .	1 : 3,81	1 : 2,44
<i>Musa Ensete</i> . . . . .	1 : 5,39	1 : 4,84
<i>Canna iridiflora</i> . . . . .	1 : 21,90	1 : 28,26

Das Verhältnis von Dextrose zu Lävulose ist bereits am Ende jeder Analyse berechnet worden; ebenso das der Monosaccharide zu den Disacchariden, sowie der Monosaccharide zur Saccharose. Da die beiden letzten Berechnungen weiteres Interesse beanspruchen, stelle ich sie der Übersicht halber zusammen.

## V.

Pflanze	Tag	Nacht
	Monosaccharide : Disaccharide	Monosaccharide : Disaccharide
<i>Tropaeolum majus</i> . . .	1 : 1,44	1 : 1,51
<i>Cucurbita ficifolia</i> . . .	1 : 3,78	1 : 3,12
<i>Vitis vinifera</i> . . . . .	1 : 1,37	1 : 0,89
<i>Musa Ensete</i> . . . . .	1 : 1,59	1 : 0,88
<i>Canna iridiflora</i> . . . . .	1 : 20,90	1 : 27,26

## VI.

Pflanze	Tag	Nacht
	Monosaccharide : Saccharose	Monosaccharide : Saccharose
<i>Tropaeolum majus</i> . .	1 : 1,16	1 : 1,20
<i>Cucurbita ficifolia</i> . .	1 : 3,09	1 : 2,18
<i>Vitis vinifera</i> . . . .	1 : 1,17	1 : 0,70
<i>Musa Ensete</i> . . . .	1 : 1,46	1 : 0,80
<i>Canna iridiflora</i> . . .	1 : 19,63	1 : 24,63

Alle diese Ergebnisse stimmen in den wesentlichen Punkten mit den Resultaten von Brown und Morris überein: es konnte in allen untersuchten Blättern das deutliche Überwiegen der Disaccharide zur Zeit der stärksten Assimilation festgestellt werden. Tabelle VI zeigt, daß dies im wesentlichen durch das Mengenverhältnis von Monosacchariden zur Saccharose bedingt ist. In der Nacht verschiebt sich das Verhältnis der Mono- zu den Disacchariden meist zugunsten der ersteren.<sup>1)</sup> Dextrose trat mehr oder weniger zurück und fehlte in zwei Fällen tagsüber ganz. Ferner konnte auch ich feststellen, daß, mit einer einzigen Ausnahme (*Musa*), die Lävulose wenigstens am Tage die Dextrose an Menge übertrifft. Daraus scheint hervorzugehen, daß es sich bei den seinerzeit von Brown und Morris gemachten Erfahrungen nicht etwa um das spezifische Verhalten einer einzelnen Pflanze, sondern um Erscheinungen allgemeinerer Verbreitung handelt, denen denn auch eine allgemeinere Bedeutung zugesprochen werden muß. Daß auch schon früher einzelne derartige Beobachtungen gemacht worden sind, habe ich bereits eingangs hervorgehoben.

Brown und Morris hielten bekanntlich auf Grund ihrer Analysenresultate den Rohrzucker für den ersten bei der Assi-

<sup>1)</sup> Eine Ausnahme macht *Canna*, da hier in der Nacht überhaupt nur noch Spuren von Hexosen nachweisbar waren. Außerdem nimmt *Tropaeolum*, wie auch noch in anderer Hinsicht, eine Sonderstellung ein, auf die ich noch zurückkomme: Tabelle V und VI zeigen für Tag und Nacht konstante Werte.

milation sich bildenden Zucker. Die Verfasser haben nicht alle Blätter direkt untersucht, sondern meist eine Portion derselben erst unter bestimmte Außenbedingungen gebracht. Es handelt sich im ganzen um vier Versuche, die ich zur besseren Übersicht hier wiedergeben möchte.

Bei Versuch 1 wurden Blätter an einem Tage a) um 5<sup>h</sup> vorm. gepflückt und direkt untersucht (bezw. getrocknet), b) um 5<sup>h</sup> vorm. gepflückt und nach 12ständiger Assimilation untersucht, c) um 5<sup>h</sup> nachm. gepflückt und direkt untersucht.

## Versuch 1.

Stärke	a	b	c
	1,23	3,91	4,59
Saccharose . . . . .	4,65	8,85	3,86
Dextrose . . . . .	0,97	1,20	0,00
Lävulose . . . . .	2,99	6,44	0,39
Maltose . . . . .	1,18	0,69	5,33
Gesamtzucker . . . . .	9,79	17,18	9,58

Bei Versuch 2 wurde ein Teil der Blätter um 9<sup>h</sup> vorm. (a), ein anderer um 9<sup>h</sup> nachm. (b) direkt analysiert.

## Versuch 2.

Stärke	a	b
	3,24	4,22
Saccharose . . . . .	4,94	8,02
Dextrose . . . . .	0,81	0,00
Lävulose . . . . .	4,78	1,57
Maltose . . . . .	1,21	3,62
Gesamtzucker . . . . .	11,74	13,21

Bei Versuch 3 und 4 sind mit a Blätter bezeichnet, die sofort untersucht wurden, mit b solche, die untersucht wurden, nachdem sie 24 Stunden verdunkelt waren.

Versuch 3.

Stärke	a	b
	3,693	2,980
Saccharose . . .	9,98	3,49
Dextrose . . . .	0,00	0,58
Lävulose . . . .	1,41	3,46
Maltose . . . . .	2,25	1,86
Gesamtzucker	13,64	9,39

Versuch 4.

Stärke	b	b
	5,425	0,906
Saccharose . . .	7,33	3,35
Dextrose . . . .	0,00	1,34
Lävulose . . . .	2,11	3,76
Maltose . . . . .	2,71	1,28
Gesamtzucker	12,15	9,73

Nach der Ansicht der Verfasser mußte, wenn der primäre Zucker eine Glukose war, wenigstens bei Versuch 1 b, nachdem also die Ableitung sistiert war und die Atmung der gleichzeitigen Assimilation gegenüber in den Hintergrund treten mußte, eine starke Anhäufung dieser Glukose zu konstatieren sein. Statt dessen fanden sie eine auffallende Zunahme des Rohrzuckers und schrieben daher diesem die Rolle des primären Zuckers zu. Es kann nun behauptet werden, daß damit noch nichts bewiesen sei; denn es kann die zuerst gebildete Hexose sehr rasch weiter verarbeitet worden sein, vor allem sich zum Disaccharide kondensiert und mit steigender Assimilation wachsende Mengen von Saccharose erzeugt haben, zumal die Blätter infolge der unterbrochenen Ableitung sich in anormalen Verhältnissen befanden. Dieser letzte Einwand fällt bei meinen Analysenbefunden fort, weil hier die Blätter direkt untersucht wurden; trotzdem stimmen meine Beobachtungen hinsichtlich des Überwiegens der Disaccharide über die Monosaccharide, sowie der quantitativen Überlegenheit der Saccharose während der Assimilation durchaus mit den Erfahrungen von Brown und Morris überein. Natürlich kann man auch hier, abgesehen von der Ableitung und Veratmung, den raschen Verbrauch der Hexosen zur Bildung höhermolekularer Saccharide und anderer Synthesen ins Feld führen.

Eine Schwierigkeit bei der Annahme, daß der Rohrzucker ein direktes Assimilationsprodukt sei, besteht auch darin, daß man sich ein Disaccharid schwerlich anders als aus Monosacchariden entstanden denken kann. Überhaupt müssen wir uns fragen, ob wir unter dem primären Zucker das erste

Kohlenhydrat, das aus den anorganischen Grundstoffen hervorgeht, verstehen wollen. In diesem Falle sagen Analysen wie die vorliegenden und die von Brown und Morris ausgeführten nichts. Es ist vielleicht richtiger, den Begriff des primären Zuckers lediglich auf den ersten analytisch nachweisbaren Zucker bei der Assimilation zu beschränken ohne Rücksicht darauf, ob er mit dem zuerst gebildeten Kohlenhydrat identisch ist oder nicht; denn es läßt sich ja auch ein Assimilationsprodukt denken, das aus einer Reihe synthetischer Prozesse hervorgegangen ist, die sich in so rascher und steter Aufeinanderfolge vollziehen, daß Zwischenprodukte, als welche auch Kohlenhydrate mit kleinerem Molekulargewicht wohl denkbar sind, nicht nachgewiesen werden können und das als Endprodukt dieser Reihe sich in der Zelle anhäuft und dadurch analytisch faßbar wird. In diesem Sinne kann die Saccharose der primäre Zucker sein. Gehen wir z. B. von der speziellen Vorstellung aus, der vorgebildete Zucker sei Dextrose, die sich, vielleicht unter teilweiser Umlagerung in Lävulose, zu Rohrzucker kondensiere, so liegt es nahe, in allen den Fällen, in welchen wir zur Zeit der stärksten Assimilationstätigkeit keinen Traubenzucker nachweisen können, während die Bildung des Rohrzuckers ohne Störung kräftig vor sich geht, dies durch die Annahme zu erklären, daß der Traubenzucker im Augenblicke seiner Entstehung sofort zur Synthese des Rohrzuckers verwendet wird. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß er auch noch zu andern Zwecken sofort verbraucht wird und sich deshalb nicht speichern kann.

Jedenfalls müssen wir festhalten:

Es kann nicht als bewiesen gelten, daß die im Blatte gefundenen Monosen anders als durch Inversion von Di- und Polysacchariden entstanden sind. Daß auf diese Weise Anhäufungen von Hexosen im Zellsafte zustande kommen, das geht aus den Versuchen 3 und 4 von Brown und Morris hervor und das erklärt auch bei meinen Analysenresultaten die wiederholt beobachtete Verschiebung im Verhältnis von Mono- und Disacchariden zugunsten ersterer während der Nacht.

Von den untersuchten Fällen zeigt das Analysenergebnis bei *Canna iridiflora* mit großer Deutlichkeit, daß die Entstehung des Rohrzuckers keineswegs an eine größere Konzentration von Monosen im Zellsaft gebunden ist: es wurde neben einer Saccharosemenge von rund 6% überhaupt keine Dextrose und nur 0,3% Lävulose gefunden. Das legt die Auffassung nahe, daß der Rohrzucker tatsächlich der erste nachweisbare Zucker ist. Einen sichern Beweis aber liefern meine Analysenergebnisse ebensowenig wie die von Brown und Morris mitgeteilten, obwohl sie beide für diese Auffassung sprechen.

Volle Klarheit in dieser Frage können uns vielleicht einmal mikrochemische Studien neben gleichzeitigen makrochemischen Untersuchungen verschaffen. Dazu wäre allerdings eine absolut zuverlässige und sehr feine mikrochemische Methode erforderlich, wie sie leider bis jetzt nicht existiert. Dann wäre es vielleicht möglich, aus der Lokalisation der einzelnen Zuckerarten im Blatte sowie durch verschiedene Versuchsanstellungen an ein und demselben Individuum sichere Anhaltspunkte für die Entstehung der einzelnen Saccharide in der Pflanze zu gewinnen. Eine solche Methode, wie gesagt, gibt es zurzeit nicht, denn die bisher gebräuchlichen Osazonmethoden von Senft und Grafe können nach den Ausführungen Ruhlands (30) für diesen Zweck nicht mehr geeignet erscheinen.

Die Osazonmethode ist von Strakosch (35) und später von van Rytel (31) zur Untersuchung des Blattes von *Beta vulgaris* angewandt worden. Beide Autoren behaupten auf Grund ihrer Beobachtungen mittels dieser Methode, daß im Blattparenchym der Zuckerrübe nur Dextrose vorhanden sei und erst in den Nerven allmählich Lävulose und Saccharose aufträten. Daraus ginge nun allerdings ohne weiteres hervor, daß Dextrose der primäre Zucker ist. Indes hat Ruhland, wie bereits erwähnt, die mikroskopische Beobachtung der Osazonbildungen in der Pflanzenzelle zum Zwecke genauer Differenzierung der Zuckerarten in sehr treffender Weise kritisiert. Außerdem hat Ruhland selbst auf makrochemischem Wege die Anwesenheit von Saccharose im Parenchym des Blattes

von Beta vulg. feststellen können. Übrigens hat auch Strakosch bei der makrochemischen Untersuchung des Blattparenchyms Rohrzucker in geringer Konzentration gefunden, was er durch das Vorhandensein feinsten Nervenendigungen zu erklären sucht.

Zur Lösung der Frage nach dem primären Zucker scheint mir gerade das Blatt der Zuckerrübe ein ungeeignetes Untersuchungsmaterial zu sein, da hier das Verhältnis der Saccharide insofern außergewöhnlich zu sein scheint, als der Invertzucker bedeutend vorherrscht, während Rohrzucker wenigstens zu gewissen Zeiten in relativ geringer Menge gefunden wird. Man wird kaum fehlgehen, wenn man dieses Verhalten mit der Füllung des Speicherorgans in Zusammenhang bringt. Jedenfalls kann daraus nicht gefolgert werden, daß eine Glukose der primäre, d. h. der erste nachweisbare Zucker bei der Assimilation sei; denn es ist gut möglich, daß größere Saccharosemengen nur deshalb nicht gefunden werden, weil sehr bald eine äußerst kräftige Inversion dieses Zuckers einsetzt. Der Zweck dieser starken Inversion wird uns verständlich, wenn wir uns erinnern, daß die Wanderung des Zuckers in das Speicherorgan nach Ruhland überwiegend in Form von Invertzucker erfolgt: der Stoff wird also sehr bald in die zur Wanderung geeignetste Form gebracht.

Eine interessante Mitteilung Girards (14, S. 810), auf die ich schon eingangs aufmerksam gemacht habe, zeigt, daß hinsichtlich der Zu- und Abnahme des Rohrzuckers im Licht und in der Dunkelheit die bei Beta gemachten Beobachtungen keinen prinzipiellen Gegensatz zu den an andern Objekten gewonnenen Erfahrungen bilden. Girard fand in sorgfältig angestellten Versuchen, daß der Rohrzucker am Lichte sich bildet bzw. zunimmt, in der Dunkelheit aber abnimmt. Er folgert daraus, daß der Rohrzucker ein direktes Assimilationsprodukt sei, das sich unter dem Einfluß des Lichtes bilde. Die Befunde von Girard hat Strakosch insofern bestätigt, als auch er die Bildung der Saccharose bei der Belichtung einsetzen und fortschreiten sah, während beim Verdunkeln dieser Zucker abnahm.



Was nun das Verhältnis von Dextrose zu Lävulose in den untersuchten Fällen betrifft, so ergibt sich als einzige Folgerung nur, daß die Dextrose im allgemeinen rascher im Stoffwechsel verwendet wird, falls wir nicht annehmen wollen, daß die Lävulose direkt entstehe, was nicht bewiesen werden kann. Was die Art der Verwendung betrifft, so geben uns die gefundenen Werte keinerlei sichere Anhaltspunkte. Möglich, daß der Traubenzucker die für die Ableitung oder Veratmung günstigste Form darstellt, möglich auch, daß sich zur Eiweißsynthese die eine oder andere Zuckerart besser eignet: Der Verbrauch richtet sich jedenfalls nach den jeweiligen Bedürfnissen der Pflanze und es ist leicht einzusehen, daß diese nicht nur bei verschiedenen Pflanzen mehr oder weniger verschieden sind, sondern auch bei demselben Individuum zu verschiedenen Zeiten nicht dieselben zu sein brauchen. Auch Umlagerung von Hexosen durch die Tätigkeit des lebenden Plasmas, wobei z. B. die Aldo- in die Ketoform übergeht, erscheinen nicht ausgeschlossen. Daß die in der Zelle gefundenen Monosaccharide, speziell Dextrose, auch der Stärke bzw. Maltosebildung dienen, wird durchweg angenommen, kann aber nicht mit Sicherheit behauptet werden. Brown und Morris nahmen Stärkebildung aus Rohrzucker an; auch dies ist unbewiesen.

Die Maltose hielten diese Verfasser für ein Abbauprodukt der Stärke. Auch wir müssen zunächst an dieser Auffassung festhalten, da bei der Hydrolyse der Stärke auch außerhalb der Pflanze Maltose entsteht, wenn man mit pflanzlicher Diastase operiert. Die Analysenwerte selbst sagen in dieser Hinsicht nicht viel, da die Maltosewerte bei Tag und Nacht verhältnismäßig klein sind und nur wenig schwanken. In den meisten Fällen sehen wir eine kleine Zunahme während der Nacht; bei *Tropaeolum* ist, wie auch die Ergebnisse von Brown und Morris zeigen, die Maltose dann am stärksten vertreten, wenn die Stärkebildung kräftig vor sich geht. Es wäre voreilig, wenn wir daraus schließen wollten, hier stelle die Maltose eine Vorstufe der Stärke dar, denn es ist möglich, daß der Abbau der letzteren bei der einen oder andern Pflanze dann am kräftigsten vor sich geht, wenn das Abbaumaterial am reich-

lichsten vorhanden ist. Möglich wäre es aber, daß Maltose auch als Vorstufe der Stärke im Blatt auftritt.

Zum Schlusse möchte ich noch auf eine Eigentümlichkeit hinweisen, die sich beim Vergleich der Stärke- und Gesamtzuckermengen der Stärkeblätter ergibt. Ich stelle daher die betreffenden Zahlen hier zusammen.

		Tag %	Nacht %
Tropaeolum majus	Stärke . . . . .	6,44	5,62
	Gesamtzucker . . .	9,20	5,55
Cucurbita ficifolia .	Stärke . . . . .	6,06	1,50
	Gesamtzucker . . .	4,06	3,75
Vitis vinifera . . .	Stärke . . . . .	5,34	1,76
	Gesamtzucker . . .	6,32	6,16

Bei Cucurbita<sup>1)</sup> und Vitis sehen wir, daß die Stärke in der Nacht stark abnimmt, während der Gesamtzuckerbetrag nahezu der gleiche ist wie am Tage. Hier wird also anscheinend der Verlust an Zucker infolge der Atmung, der Ableitung oder synthetischer Prozesse durch die fortschreitende Inversion der Stärke immer wieder gedeckt, so daß der Zuckergehalt des Blattes annähernd konstant bleibt. In scharfem Gegensatz hierzu stehen die Resultate der Analyse bei Tropaeolum. Hier zeigt auffallenderweise die Stärke bei Tag und Nacht einen geringen Unterschied in der Menge, während der Gesamtzucker in der Nacht bedeutend abnimmt. Es liefert in diesem Falle beinahe der Zucker allein das Material für den weiteren Verbrauch. Damit scheinen einige Erscheinungen, die sich aus der Betrachtung der Tabellen I—IV ergeben, im Zusammenhange zu stehen. Wir sehen nämlich, daß das Verhältnis von Rohrzucker und Fruchtzucker zum Gesamtzucker bei Tag und Nacht jedesmal konstant ist, bei der Maltose ist die Differenz der Verhältnisse bei Tag und Nacht nicht groß und nur bei der Dextrose zeigt sich ein etwas größerer Unter-

<sup>1)</sup> Bei Cucurbita muß allerdings daran erinnert werden, daß das Sammeln der Blätter nicht an unmittelbar aufeinander folgenden Tagen vorgenommen wurde, wiewohl die Witterungsverhältnisse dieselben waren.

schied. Vergleichen wir dann das Verhältnis von Mono- und Disacchariden in Tabelle V und das von Monosacchariden und Saccharose in Tabelle VI, so ergibt sich wiederum eine auffallende Konstanz der für Tag und Nacht erhaltenen Werte. Es ist also von jeder Zuckerart so viel verschwunden, daß ihr Verhältnis zum Gesamtzucker das gleiche geblieben ist, also von jeder der gleiche Bruchteil in der gleichen Zeit. Eine Ergänzung aus dem Stärkevorrat hat nur in geringem Maße stattgefunden. Wie diese Erscheinung zu erklären ist, läßt sich um so weniger sagen, als dieses merkwürdige Verhalten nicht etwa die Regel bei *Tropaeolum* zu sein scheint; wenigstens läßt sich aus den Analysenergebnissen von Brown und Morris nichts dergleichen ersehen. Vergleichen wir z. B. in Versuch 1 die Kolumnen a und c, so haben wir offenbar den gleichen Fall wie bei *Cucurbita* und *Vitis* vor uns: der Stärkebetrag verändert sich stark, der Gesamtzuckerbetrag praktisch gar nicht, nur daß es sich hier um die Zunahme an organischer Substanz handelt, nicht um die Abnahme wie in unserem Falle. Versuch 2 ist ein Übergangsfall: hier steigt sowohl Stärke- wie Zuckerbetrag, jedoch beide nur mäßig; ob diese Erscheinungen auf inneren oder äußeren Ursachen beruhen, und welche Bedeutung ihnen zugesprochen werden muß, kann auf Grund des nur spärlichen Tatsachenmaterials natürlich nicht entschieden werden.

---

Vorliegende Untersuchungen wurden am botanischen Institut der Universität Würzburg ausgeführt. Herrn Professor Dr. Kniep sage ich für die mannigfachen Ratschläge und die mir stets freundlichst gewährte Unterstützung herzlichen Dank.

---

### Literatur.

1. Abderhalden, E., Handbuch der biochem. Arb.-Meth., Bd. 2, Berlin 1910.
2. Allihn, F., Verzuckerungsprozeß bei der Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure auf Stärke bei höheren Temperaturen. *Journal f. prakt. Chemie*, Bd. 22, 1880.

3. Biedermann, W., Fermentstudien. 1. Mitteil.: Das Speichel-ferment, Fermentforschung, Bd. 1, 1916.

4. Brown, H. T. und Morris, G. H., A Contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journal of the Chem. Society, May 1893.

5. Böhm, Über Stärkebildung aus Zucker. Botan. Zeitung 1883.

6. Czapek, F., Biochemie der Pflanzen, Bd. 1, Jena 1913.

7. Deleano, N. T., Studien über den Atmungsstoffwechsel abgeschchnittener Laubblätter. Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., Bd. 51, 1912.

8. Deleano, N. T., Untersuchung über die in den Weinblättern enthaltenen Kohlenhydrate und stickstoffhaltigen Körper. Diese Zeitschr., Bd. 80, 1912.

9. Davis, W. A. und Daish, A. J., Methods of estimating carbohydrates II. The estimation of starch in plantmaterial. Journ. of agric. science, Bd. 6, 1914.

10. Davis, W. A. und Daish, A. J., A study of the methods of estimation of carbohydrates, especially in plant extracts. Journ. of agric. sc., Bd. 5, 1913.

11. Euler und Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung. Leipzig 1915.

12. Fischer, E. und Lindner, P. Über die Enzyme von Schizosaccharomyces octosporus und Saccharomyces Marxianus. Ber. der Deutsch. Chem. Ges., Jahrg. 28, 1895.

13. Giltay, E., Über die vegetabilische Stoffbildung in den Tropen und in Mitteleuropa. Annales du jardin botanique de Buitenzorg, Bd. 15, 1898.

14. Girard, A., Recherches sur la saccharogénie dans la betterave. Compt. rendus, Bd. 99, 1884.

15. Hönig und Jesser, Zur Kenntnis der Kohlenhydrate. Sitz-Ber. d. Akademie Wien, math.-naturw. Kl., Bd. 97, 1888.

16. Hörmann, P., Trennung der Kohlenhydrate durch Reinhefen. Inaug.-Diss. Münster 1906.

17. König, J., Chemie der menschl. Nahrungs- und Genußmittel, Bd. 3. Berlin. 4. Aufl.

18. Kreuzler, Landw. Jahrb., Bd. 14, 1885; Bd. 16, 1887; Bd. 17, 1888; Bd. 19, 1890.

19. Lehmann, F., Über maßanalyt. Methoden zur Bestimmung von Zuckerarten. Inaug.-Diss. Marburg 1908.

20. Lindet, Sur la présence du dextrose et du lévulose dans les feuilles des betteraves. Annales agronomiques, Bd. 20, 1900.

21. v. Lippmann, E., Chemie der Zuckerarten, Bd. 1 u. 2. Braunschweig 1914.

22. Meyer, Arth., Bildung der Stärkekörner in den Laubblättern aus Zuckerarten, Mannit und Glycerin. Botan. Zeitschr. 1886.

23. Meyer, Arth., Über die Assimilationsprodukte der Laubblätter angiospermer Pflanzen. *Botan. Zeitschr.* 1885.
  24. Meyer, Arth., Untersuchung über die Stärkekörner. Jena 1895.
  25. Müller, Arno, Die Assimilationsgröße bei Zucker- und Stärkeblättern. *Jahrb. f. wissensch. Botan.*, Bd. 40, 1904.
  26. Perrey, A., Sur l'origine des matières sucrées dans la plante. *Compt. rend.*, Bd. 94, 1882.
  27. Petit, A., Sur le sucre contenu dans les feuilles de vigne. *Compt. rend.*, Bd. 77, 1873.
  28. van Rijn, J. J. L., Die Glykoside. Berlin 1900.
  29. Rupp, E. und Lehmann, F., Über die K. Lehmannsche Titration von Zuckerarten. *Archiv d. Pharm.*, S. 247, 1909.
  30. Ruhland, W., Untersuchung über den Kohlenhydratstoffwechsel in *Beta vulgaris*. *Jahrb. f. wissensch. Bot.*, Bd. 50, 1912.
  31. van Rytel, S., Beitrag zur Kenntnis der Entstehung und Wanderung der verschiedenen Zuckerarten in der Zuckerrübe. Inaug.-Diss. Breslau 1914.
  32. Sachs, J., Ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungstätigkeit der Blätter. *Arb. d. botan. Inst. Würzb.*, Heft 1, 1884.
  33. Schimper, A. F. W., Über Bildung und Wanderung von Kohlenhydraten in den Laubblättern. *Botan. Zeitschr.*, Bd. 43, 1885.
  34. Soxhlet, F., Das Verhalten der Zuckerarten zu alkal. Kupfer- und Quecksilberlösungen. *Journ. f. prakt. Chemie*, Bd. 22, 1880.
  35. Strakosch, S., Ein Beitrag zur Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels von *Beta vulgaris*. *Sitz.-Ber. d. Akademie Wien, math.-naturw. Kl.*, Bd. 116, 1907.
  36. Thoday, Critical examination of Sachs' method for using increase of dry weight as a measure of carbondioxyde-assimilation in leaves. *Proc. of Roy. Soc.*, Bd. 82, 1910.
  37. Wehmer, C., Die Pflanzenstoffe. Jena 1911.
  38. Wohlgemuth, J., Fermentmethoden. Berlin 1913.
-