

# Wissenschaftliche Original-Mittheilungen.\*)

## Studien über Reservecellulose.

Von  
Dr. J. Grüss.

Mit 2 Tafeln.\*\*)

### I.

Die in der Natur vorkommenden, einem Lösungsprocess unterliegenden Cellulosen sind in der Regel Hemicellulosen; dieselben sind ihrer chemischen Natur nach Anhydride von Zuckerarten. Durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren oder durch lange andauernde Behandlung mit diastatischen Enzymen werden in dem Hemicellulosemolekül die Bindekräfte, welche die Zuckergruppen zusammenhalten, gesprengt, wodurch dann die Hydroxylgruppen eintreten können. Die Thätigkeit der verdünnten Säuren und der Enzyme ist also eine hydratisirende; das Hemicellulosemolekül  $C_{6n}H_{10n}O_{5n}$  geht über in mehrere Moleküle  $C_6(n-x)H_{10(n-x)}O_{5(n-x)}H_2O$ . Bei fortgesetzter Hydrolyse werden diese Moleküle noch weiter zerspalten, wobei dann der Betrag der Grösse  $x = n - 1$  erfüllt ist; bei Diastase und Stärke ist der endgültige Werth  $x = n - 2$ , da hier die Hydrolyse mit der Bildung der Maltose ihr Ende erreicht.

Am besten ist der Process von der Stärke bekannt. Nach Lintner können bei demselben folgende Verbindungen erhalten werden: Amylo-, Erythro- und Achroodextrin I und II, Isomaltose, Maltose. Ueber den Abbau der Stärke äussert sich dieser Forscher\*\*\*) folgendermassen:

„Man hat sich nun selbstverständlich den Abbau der Stärke durch Diastase nicht so zu denken, dass die einzelnen Phasen des Zerfalles in der ganzen Menge der vorhandenen Stärke gleichzeitig stattfinden, etwa in der Weise, dass zunächst alles Amylodextrin vollständig in Erythroextrin übergeht u. s. w. Der Verlauf gestaltet sich vielmehr nach den Gesetzen der chemischen Massenwirkung derart, dass einzelne Moleküle schon am Ende des ganzen Zersetzungsprocesses angelangt sind, während andere noch intact sind und wieder andere in verschiedenen Zwischenstufen sich befinden. So ist es nicht auffällig, dass man schon in den ersten Stadien des Processes Isomaltose und Maltose nachweisen kann.

\*) Für den Inhalt der Originalartikel sind die Herren Verfasser allein verantwortlich. Red.

\*\*\*) Die Tafeln liegen dieser Nummer bei.

\*\*\*) C. J. Lintner: Ueber den Abbau der Stärke durch Diastase. (Verh. d. Ges. deutsch. Naturforscher und Aerzte, Nürnberg 1893 und Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1893, 2533.)

So erklären sich auch die verschiedenen Nüancen der Jodreaction von blau durch violett nach roth, bis endlich keine Reaction mehr auftritt. Unter günstigen Bedingungen — Temperatur- und Concentrationsverhältnissen — verläuft der Abbau bekanntlich rapid bis zum Eintritt eines Gleichgewichtszustandes. Letzterer macht sich im Allgemeinen bemerklich, wenn  $\frac{2}{3}$  der Stärke in Maltose übergeführt sind, entsprechend der Gleichung:  $(C_{12}H_{20}O_{10})_{54} + 39H_2O = 3(C_{12}H_{20}O_{10})_5 \cdot C_{12}H_{22}O_{11} + 36C_{12}H_{22}O_{11}$ “.

Anders verläuft der Process, wenn die Diastase auf Stärkekörner einwirkt. Es bilden sich die bekannten Korrosionserscheinungen, aber die Masse selbst bleibt unverändert, wie dies durch die Jodfärbung angezeigt wird. Die Erscheinung wird dadurch bedingt, dass das Enzym in die Stärkesubstanz nicht eindringt: es wirkt hier energisch an der Oberfläche, wo die Entstehungsproducte alsbald durch Lösung fortgeschafft werden, was bei der Enzymwirkung in Stärkekleister nicht der Fall ist. Am Stärkekorn bewirkt die Diastase eine kurze, gewissermassen sprungweise Hydrolyse der Amylosemoleküle ohne Bildung von Zwischenproducten, im Stärkekleister dagegen findet eine successive Hydrolyse statt.

Dies ist auch die Ansicht von Lintner, nach welchem die Auflösung der Stärkekörner ohne die Entstehung von Zwischenproducten verläuft. Er sagt:\*) „In den bei der Keimung korrodierten Stärkekörnchen ist die Stärkesubstanz gegenüber den nicht korrodierten in ihrer Zusammensetzung keineswegs verändert.“ Diese Art der Lösung wird dadurch bedingt, dass die Diastase in die Masse des Stärkekorns nicht eindringt, sondern nur an der Oberfläche wirksam ist; beim Stärkekleister ist dagegen die ganze Masse von dem Enzym mehr oder weniger durchdrungen.

Nach A. Meyer\*\*) dringt die Diastase in das Stärkekorn ein und bewirkt in demselben die Bildung centraler Risse. Indessen ist es auffällig, dass man das Eindringen der Diastase nicht mittelst der Guajak-Wasserstoffsperoxyd- Reaction nachweisen kann. \*\*\*) Ich neige mich daher zur Ansicht, dass das Enzym nicht in die Masse des Stärkekorns eindringt. Dieser Gegensatz kann für unsere zu behandelnden Fragen ausser Acht gelassen werden, denn stellt man sich auf den Standpunkt von A. Meyer, so muss man mindestens zugeben, dass das Enzym nur in äusserst geringer Verdünnung die Poren des Stärkekorns erfüllt, dass diese eingedrungene Diastase durch die Guajak-Wasserstoffsperoxyd- Reaction nicht sichtbar gemacht werden kann und dass die Masse des Stärkekorns chemisch nicht verändert wird. Ueber letzteren Punkt äussert sich A. Meyer l. c. folgendermassen: „Dass bei Ein-

\*) C. J. Lintner: Bericht über Fortschritte in der Bierbrauerei. Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Beziehung zur Hygiene, über forsen Chemie und Pharmakognosie. 1. Jahrg. Heft 9.

\*\*) A. Meyer: Untersuchungen über die Stärkekörner. Jena 1895. p. 96.

\*\*\*) S. darüber J. Grüss: Ueber das Eindringen von Substanzen, besonders der Diastase in das Stärkekorn. Beiträge zur wissenschaftlichen Botanik I.

wirkung auf intakte Stärkekörner chemische Veränderungen in den ungelöst bleibenden, schwerlöslichen Resten der Stärkekörner hervorgebracht werden, war bisher nicht mit Sicherheit bewiesen.“ Der Autor selbst kann nur vereinzelt Fälle anführen, in denen eine Substanzverwandlung wahrscheinlich ist, so zum Beispiel als Stärkekörner von *Dieffenbachia* mit Diastase in der Kälte und bei 40° behandelt wurden. Dabei zeigte sich, dass in einzelnen Fällen sich die Substanz der Körner durch Jodjodkaliumlösung nicht mehr sofort blau färbte. Ferner wurde an einzelnen kleinen Stellen von Stärkekörnern der Kartoffel, welche 6 Monate der Diastaseeinwirkung bei 40° ausgesetzt worden waren, Skelettbildung beobachtet. „Wie weit diese Stellen, bemerkt der Autor, verändert waren, ob sie aus reinen  $\alpha$ -Amylosekryställchen, aus reinem Amylodextrin oder aus beiden Körpern bestanden und ob sie noch  $\beta$ -Amylose einschlossen, habe ich nicht untersuchen können, weil die Skelettbildung zu vereinzelt vorkam und eben nur an beschränkten Stellen sonst wenig veränderter Stärkekörner.“

Würde das Enzym in erheblicher Menge in die Substanz des Stärkekorns eindringen, so würde sich dies durch das Auftreten einer schwächer lichtbrechenden Zone bemerklich machen; aber selbst A. Meyer schreibt darüber l. c.: „Ich betrachte es danach als ganz sicher festgestellt, dass keine irgend scharf begrenzte, schwächer lichtbrechende Schicht in der Peripherie durch das Eindringen und die Arbeit des Ferments entsteht.“

Wir können daher annehmen, dass beim Stärkekorn das diastatische Enzym nur an der Oberfläche (zu der auch die Wandungen der Porenkanäle gehören) wirkt, und dass die Masse selbst bis zum Verschwinden chemisch unverändert bleibt. Anders verhält es sich, wenn man auf Stärkekörner verdünnte Säure einwirken lässt. Dieselbe dringt in die Masse ein, welche dann allmählich hydrolytisch verändert wird. Bei der Behandlung solcher Körner mit Jod tritt ein Farbenwechsel von Blau, Violett nach Roth hin ein.

Es ist zu vermuthen, dass diejenigen unlöslichen Kohlenhydrate, welche in gewissen Samen die Stärke vertreten, ähnliche Erscheinungen aufweisen werden. Für diese Untersuchung bildet die Jodreaction ein hervorragendes Mittel, denn ähnlich wie bei der Stärke wird man auch bei der Reservecellulose aus einer Aenderung dieser Reaction auf eine hydrolytische Substanzveränderung schliessen können.

### Die Reservecellulose.

(*Phoenix dactylifera*.)

Nachdem Sachs\*) die Keimungsgeschichte der Dattel ausführlich behandelt hatte, gelang es Reiss, den Auflösungsmodus der verdickten Zellwände bei der Keimung festzustellen. Derselbe

\*) Ueber die Vorarbeiten von Sachs vergl. R. Reiss: Ueber die Natur der Reservecellulose. (Thiel's landwirthschaftliche Jahrbücher 89. Botanischer Theil. 1.)

besteht darin, dass zunächst die innersten, dem Lumen anliegenden Schichten der verdickten Zellwand ihre Lichtbrechung ändern: sie werden schwächer lichtbrechend, hyalin oder fast gelatinös, wie Reiss sagt. Die von dem Lösungsprocess noch nicht ergriffenen Wandpartien erscheinen in der hyalinen Masse wie Inseln. Eine Quellung tritt bei diesem Vorgang nicht auf, sondern im Gegentheil: die zuerst hyalin gewordenen Schichten „schmelzen“, je weiter die Hyalinisierung vorrückt, allmählich ab, so dass also die ganze Zellwand dünner wird. Geht die „Abschmelzung“ nicht zu schnell vor sich, so kann man in der hyalinen Zone auch die Schichtung erkennen.

Nach Reiss habe ich es unternommen, die physiologischen Vorgänge bei der Keimung der Dattel zu erschliessen. Die erste Frage musste naturgemäss die sein, ob überhaupt das diastatische Enzym lösend auf die Reservecellulose der Dattel einwirkt. Es gelang mir schon früher, dies festzustellen.\*) Lässt man Stücke von dem Endosperm der Dattel mindestens zwei Monate in einer kräftigen Diastaselösung, die häufig zu erneuern ist und der man etwas Chloroform zusetzt, bei 28° und unter Lichtabschluss stehen, so treten an der verdickten Zellwand dieselben Erscheinungen ein, wie bei der Keimung. Die Masse wird da, wo sie mit der Flüssigkeit in Contact gestanden hat, hyalin, wonach alsdann die „Abschmelzung“ eintritt.

Da sich nun aus keimenden Datteln mittelst Glycerin ein diastatisch wirkendes Extract herstellen liess, schloss ich, dass das Agens bei der Lösung der verdickten Zellwände ein Enzym der Diastasegruppe sei.

Ein Unterschied zeigt sich darin, dass bei der Keimung die Hyalinisierung zumeist vom Lumen aus centrifugal vorschreitet, bei der Diastaseeinwirkung von der Schnittfläche des Objects und manchmal von der Mittellamelle aus, wie es auch in der Natur der Sachlage begründet ist. Ferner ist im letzteren Falle die „Abschmelzung“ nicht so energisch, so dass in der hyalinen Zone, welche viel weiter um sich greift, die Schichtung der Membran mitunter hervortritt.

Ein weiterer Schritt in dieses dunkle Gebiet war dadurch möglich, dass ich auf mikroskopischen Schnitten das Enzym durch die Guajak-Wasserstoffsperoxyd-Reaction\*\*) sichtbar machen konnte. Es gelingt leicht, sich solche Schnitte herzustellen: Man lässt einen durchschnittenen gekeimten Dattelkern längere Zeit in einer hellbraunen alkoholischen Guajak-Lösung, die frisch bereitet sein muss, liegen. Nach Abdunstung des Alkohols wird von der Oberfläche ein dünner Schnitt abgenommen, der zu verwerfen ist, da man beim Durchschneiden des frischen Objects das Enzym

\*) J. Grüss: Ueber die Einwirkung der Diastase-Fermente auf Reservecellulose. (Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 1894. Generalversammlungsheft.)

\*\*) Ueber die Ausführung verweise ich auf meine Abhandlung: Beiträge zur Physiologie der Keimung. (Landwirthschaftl. Jahrbücher 1896.)

leicht über die Schnittfläche mit fortführen kann. Wird nun die Oberfläche mit verdünntem Wasserstoffsuperoxyd befeuchtet, so werden die von dem Enzym durchsetzten Stellen stark gebläut. (S. Fig. 8.)

Es zeigt sich, dass stets diejenigen Endospermzellen das Maximum der Bläuung geben, welche dem Scutellum zunächst liegen. Die Färbung nimmt von hier aus allmählich ab, ferner bemerkt man, dass die hyalinen Randzonen sich durch ihre intensive Blaufärbung von den in ihnen liegenden intacten Wandmassen gut abheben, welche meist farblos bleiben.

In gleicher Weise kann die hyalin gewordene Verdickungsschicht in Endospermstücken blau gefärbt werden, welche längere Zeit mit Diastaselösung behandelt worden waren.

Durch diese Versuche ist zur Genüge festgestellt worden, dass in der hyalinen Zone das Enzym wirksam ist.

### Die Zusammensetzung der Reservecellulose.

Durch Reiss wurde zuerst erkannt, dass die Reservecellulose, wenn dieselbe längere Zeit mit verdünnter Schwefelsäure gekocht wird, einen Fehling'sche Lösung reducirenden Zucker, die Mannose, liefert, welche besonders durch ihr in der Kälte ausfallendes Osazon charakterisirt wird.

Später wurde von E. Schulze \*) nachgewiesen, dass sich bei der Verzuckerung ausser der Mannose noch eine zweite Zuckerart, die Galactose, bildet. Danach wäre die Substanz als Galactomannan zu bezeichnen.

Anknüpfend an diese Untersuchung gelangte ich \*\*) zu der Auffassung, dass die Reservecellulose ein Gemenge der beiden Kohlenhydrate Mannan und Galactan sei, wonach also die Moleküle beider nicht chemisch verbunden wären.

Zu dieser Hypothese führte das Verhalten der Verdickungsschicht bei der Anlage. Die junge secundäre Membran bleibt bei Behandlung mit Alkali-Alizarin farblos; aber von der Mitte des Endospermgewebes aus lagert sich allmählich eine Substanz ein, welche mit diesem Reagens eine schön violette Färbung annimmt. Diese Einlagerung erfolgt centrifugal. Man findet dann auf Querschnitten durch den Dattelkern, dass sich in der Mitte die secundären Verdickungsschichten intensiv tingiren, und nach der Peripherie hin, wo die Zellen eine mehr gestrecktere Form haben, nimmt die Färbbarkeit ab. Ist das Gewebe völlig ausgebildet, so wird der ganze Querschnitt meist gleichmässig violett gefärbt. Bei diesem Verhalten drängt sich folgende Vorstellung auf: Das Mannan-Molekül ist durch Verkettung von Mannose Molekülen unter Austritt von Wasser entstanden. Ist nun ein solches Mannan-Molekül fertig ausgebildet und aus den betreffenden Elementen des

\*) E. Schulze: Znr Chemie der pflanzlichen Zellmembran. (Zeitschrift f. physiolog. Chemie. Bd. XVI. 1892. p. 391.)

\*\*) J. Grüss: Ueber Lösung und Bildung der aus Hemicellulose bestehenden Zellwände und ihre Beziehung zur Gummosis. (Biblioth. Bot. Heft 33.)

Plasmas abgeschieden, so ist eine Verkettung dieses Moleküls mit Galactose-Molekülen unter Wasseraustritt nicht mehr möglich. Dies könnte nur dann stattfinden, wenn jenes Molekül mit den betreffenden plasmatischen Elementen noch chemisch verbunden wäre. Das ist allerdings möglich; aber die Lösungserscheinungen der Reservecellulose deuten abermals darauf hin, dass dieselbe ein Gemenge der beiden Kohlenhydrate Mannan und Galactan ist.

Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass aus Mannosocellulosen bei Behandlung mit heissen verdünnten Mineralsäuren das Galactan leicht entfernt werden kann, während sich noch beträchtliche Mengen des Mannans in dem Rückstand vorfinden.

Es gelingt auch, die Reservecellulose mittelst Diastaselösung zu verzuckern: Die fein zerriebene Substanz wird mit Alkohol-Aether entfettet und darauf zur Entfernung der Eiweissstoffe mit sehr verdünnter Kalilauge längere Zeit behandelt. Die Kalilauge wird abfiltrirt und der Rückstand mit 1 procentiger Essigsäure und darauf mit Wasser ausgewaschen. Lässt man diese Masse unter Zusatz von etwas Chloroform bei  $28^{\circ}$  in einer kräftig wirkenden Diastaselösung stehen, so kann man nach längerer Zeit mittelst Fehling'scher Lösung in der Flüssigkeit Zucker nachweisen, dessen Procentgehalt bei fortgesetzter Enzymwirkung ansteigt.

In einer so erhaltenen 1-procentigen Zuckerlösung war keine Mannose vorhanden, denn nach Zusatz von Phenylhydrazinacetat wurde in der Kälte kein oder nur Spuren von einem Niederschlag erhalten; erst beim Erhitzen im Wasserbad schied sich ein Osazon aus. Vermuthlich ist der Zucker Galactose. Die Ueberführung derselben durch Salpetersäure in Schleimsäure misslang, denn der erhaltene Niederschlag war zu gering und noch mit Eiweissstoffen verunreinigt.

Als dagegen der Rückstand von dem Verzuckerungsprozess noch einmal mit Diastaselösung behandelt worden war, schied sich aus der Lösung, aus welcher durch Erhitzen die Diastase zum grössten Theil entfernt wurde, nach Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin in der Kälte ein aus kleinen Kryställchen bestehender Niederschlag aus.

Nach diesem Ergebniss ist es sehr wahrscheinlich, dass bei lang andauernder Enzymwirkung zunächst das Galactan in Galactose, dann bei weiterer Einwirkung das Mannan in Mannose übergeht. \*)

Wenn man sich nun vorstellt, dass in den secundären Verdickungsschichten die Reservecellulose aus Galactanmannan-Molekülen aufgebaut ist, so müssten dieselben bei der Enzymeinwirkung

\*) Eine ähnliche fractionirte Lösung erhielt E. Schulze durch Verzuckerung der Zellhäute der Cotyledonen von *Lupinus angustifolius* mittelst verdünnter Mineralsäuren: S. Bericht der Deutschen botanischen Gesellschaft 1896. Heft 2: „Die Cotyledonen 2-wöchentlicher etiolirter Keimpflanzen lieferten nur  $\frac{1}{10}$  der Glukose-Menge und nur  $\frac{1}{25}$  der Schleimsäure-Menge, die bei gleicher Behandlung aus den zugehörigen Samen erhalten werden konnten.“ Danach löst sich bei der Keimung das Galactan leichter als der andere Bestandtheil.

gesprengt werden. Der Galaktantheil wird in die lösliche Galactose übergeführt, wodurch der Mannantheil aus seiner Verkettung frei wird. Die einzelnen übrigbleibenden Mannanmoleküle müssten nun — also gleich bei der Einwirkung — etwa als feiner Niederschlag sich aus dem Verband loslösen. Das geschieht jedoch nicht, vielmehr tritt als erstes sichtbares Zeichen der Enzymwirkung an der verdickten Zellwand eine hyaline Zone auf, wie dies oben bemerkt wurde. So führt demnach auch diese Erscheinung zu der Deutung, dass das Galactan dem Mannan eingelagert ist.

#### Mikrochemischer Nachweis der Zuckerbildung.

Von Endospermstücken, die längere Zeit (mindestens 2 — 3 Monate) mit zuckerfreier Diastaselösung behandelt worden waren, wurden nicht zu dünne Schnitte gemacht und diese mit Fehling'scher Lösung erlitzt. Der Niederschlag von  $\text{Cu}_2\text{O}$  trat nur in den Zellen ergiebig auf, deren Wandung die hyaline Zone zeigte, in den übrigen Zellen dagegen nur spärlich und zerstreut.

Die  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Körnchen lagen meist im Lumen; ob sie in den hyalinen Zonen auftraten, vermochte ich mit Sicherheit nicht festzustellen; dieselben schienen im Gegentheil vielmehr frei von Niederschlag zu sein. Dies änderte sich selbst dann nicht, als die Schnitte in kochende Fehling'sche Lösung eingetragen wurden.

In ähnlicher Weise verhalten sich Schnitte durch das Endosperm der keimenden Dattel: Die  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Körnchen treten massenhaft in der Korrosionszone auf, und es schien mir, dass sie auch hier nicht in der Wandung hervorgerufen wurden.

Dieses Verhalten erschien mir um so merkwürdiger, als in Schnitten, welche von jungen noch nicht ausgebildeten Endospermen gemacht wurden, die  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Körnchen mit aller Sicherheit in den Wandungen der Zellen aufzufinden waren.

Mit essigsaurem Phenylhydrazin erreicht man in den korrodirten Gewebselementen, mögen diese nun mit Diastaselösung behandelt worden sein oder der keimenden Dattel entstammen, kaum mehr als eine Gelbfärbung. Es scheint, dass gewisse Stoffe im Zellsaft die Ausscheidung der Osazone in krystallinischer Form verhindern. Nur in einem Falle beobachtete ich die Bildung von Kryställchen: auf Schnitten, die einem noch nicht ausgebildeten Endosperm entstammten.

#### Die hydrolysirte Membran.

Von einem angefeuchteten Dattelendosperm wurden dünne Schnitte gemacht und diese in einem Kölbchen mit Wasser, das 1,5% Schwefelsäure enthält, 2 Stunden erlitzt. Während nun in der Lösung Zucker erscheint, werden die verdickten Zellhäute verändert.

Die Veränderungen sind folgende:

1. Alkali-Alizarin färbt die Schnitte nicht oder nur sehr schwach. Man bringt auf den Objectträger zwei Schnitte, der eine in der angegebenen Weise behandelt, der andere direct dem ruhenden

Endosperm entnommen, und setzt Kalilauge nebst etwas Alizarin hinzu. Nach einer Weile werden die Schnitte mit verdünnter Kalilauge abgespült. Der Unterschied tritt nun gut hervor. Die hydrolysirte Membran erscheint farblos oder nur sehr wenig gefärbt, die intacte Membran ist schön violett. Endospermschnitte, die mit Salpetersäure erhitzt werden, bleiben gleichfalls in Alkali-Alizarin ungefärbt. Das herausgelöste Galactan wird in diesem Falle nicht in Galactose, sondern in Schleimsäure verwandelt.

2. Congorot färbt die Verdickungsschicht intensiv dunkelroth und lässt die primären Membranen ungefärbt. (S. Fig. 3, in der die blaue Färbung roth zu denken ist.) Die intacten Membranen werden gleichmässig schwach hellroth gefärbt, wobei die primären Membranen nicht hervortreten.

3. Jod-Schwefelsäure färbt die Verdickungsschicht leicht blau und löst sie zu einer formlosen flockigen Masse, die bei weiterer Einwirkung schwindet; dabei geht keine oder eine geringe Quellung voran. Unterbricht man durch Zusatz von Wasser die Lösung, so kann man Zellwände erhalten, welche wenig oder gar nicht gequollen sind, und in denen die Schichtung durch intensivere Bläuung hervortritt. Die Mittellamellen sind meist farblos. (Siehe Fig. 2.)

Die intacte Membran löst sich unter starker Quellung und wird schwieriger blau gefärbt.

Diesen Unterschied konnte ich konstatiren, als auf beide nebeneinanderliegende Schnitte die gleiche Mischung von 2 Tropfen Schwefelsäure und einem Tropfen Jodtinktur gegeben wurde.

4. Jod-Phosphorsäure. Diese Reaction ist nach der unter 1 angegebenen die wichtigste. Das Reagens wird folgendermassen hergestellt: man trägt die in Stangenform erhältliche Hydrophosphorsäure in Wasser bis zur Syrupeconsistenz ein; dazu werden einige Körnchen Kaliumjodid nebst Jod hinzugesetzt. Nach einiger Zeit ist die Lösung schwach gelbbraun gefärbt.

Setzt man einen Tropfen dieser Flüssigkeit auf einen hydrolysirten Schnitt, so färben sich die Verdickungsschichten violett; die primären Membranen bleiben farblos. Bei Zusatz von Wasser geht die violette Färbung der Verdickungsschichten in eine blaue über. (S. Fig. 3.)

Das intacte Gewebe wird gleichmässig gelb und bei mehr Jod gelbbraun gefärbt, ohne dass die primären Membranen hervortreten. Diese Färbung geht bei längerer Einwirkung nicht in violett über, sondern bleibt gelbbraun. Mit diesem Reagens tritt keine Quellung ein.

5. Kupferoxyd-Ammoniak löst die hydrolysirte Membran ohne Quellung; die intacte Membran quillt vor der Lösung.

Dies sind die hauptsächlichsten Erscheinungen. Zu bemerken ist noch, dass dieselben umso schärfer hervortreten, je länger die Schnitte mit der verdünnten Säure gekocht werden.

Bei der Hydrolyse durch heisse verdünnte Mineralsäuren wird zunächst aus der Verdickungsschicht das Galactan herausgelöst.



Die übrig bleibende Masse ist jedoch nicht Mannan, sondern, wie die Behandlung mit Jod-Phosphorsäure ergibt, ein Hydrolyisationsproduct, welches als Mannin zu bezeichnen ist. Bei weiterer hydrolytischer Einwirkung geht dasselbe in Mannose über.

Es ist wahrscheinlich, dass mehrere Mannin-Stufen existiren, wie dies von der Stärke bekannt ist, bei welcher die einzelnen Hydrolyisations-Abkömmlinge, die Dextrine, getrennt werden können.

### Das Speicherungsvermögen.

Bevor wir auf die eigentliche Untersuchung übergehen, ist es noch nöthig, auf die Frage einzugehen, wie sich die gequollene Membran unseren Reagentien gegenüber verhält.

Man bringt dünne Schnitte vom Dattelendosperm in Kupferoxyd-Ammoniak und unterbricht nach einiger Zeit die Einwirkung durch Zusatz von Wasser. Die erste Veränderung besteht darin, dass in der Verdickungsschicht die Lamellen als feine Linien sichtbar werden und gleichzeitig machen sich auch die primären Membranen bemerkbar. (S. Fig. 4.) Darauf erfolgt alsbald das Aufquellen. Bei Unterbrechung desselben finden sich dann in der gequollenen gelatinösen Masse noch einzelne intacte Partien, gleichsam wie Inseln mit zackigem oder gattertem Rande. (S. Fig. 5.)

Bei der ersten Einwirkung, wenn die Quellung beginnt, wird die hyalin gewordene Verdickungsschicht durch Alkali-Alizarin intensiver gefärbt, als die intacte Masse. (S. Fig. 10, in welcher die blaue Färbung violett zu denken ist.) In den weiteren Stadien der Quellung und zwar unmittelbar vor dem Verschwinden nimmt die Färbbarkeit ab. Man kann dann Bilder von stark gequollenen Zellwänden erhalten, deren innere und äussere Schichten fast farblos und deren mittlere Schichten mehr und mehr intensiv violett gefärbt sind. (S. Fig. 9; blau ist violett zu denken.)

Es zeigt sich also hier, dass bei der Quellung die Tingirbarkeit steigt; kurz vor der Lösung nimmt dieselbe ab. Dies entspricht dem Verhalten der durch heisse verdünnte Mineralsäuren hydrolysirten Membranen: dieselben werden nicht gefärbt, denn das Galactan ist herausgelöst. Kurz vor der gänzlichen Lösung der gequollenen Verdickungsschicht tritt Abnahme der Farbstoffspeicherung ein, denn das Galactan wird zunächst herausgelöst, während das Mannan widerstandsfähiger ist. Umgekehrt wird auch die durch heisse verdünnte Mineralsäuren hydrolysirte Membran nicht intensiver gefärbt, da sie nicht gequollen ist.

Congoroth wird von der hyalinen gequollenen Verdickungsschicht intensiv gespeichert; die intacte Masse wird nur hellroth gefärbt. Hellere Randzonen waren nur undeutlich zu bemerken. Das Speicherungsvermögen für Congoroth wird also durch zwei Umstände erhöht: durch Quellung und, wie wir oben gesehen haben, durch Hydrolysirung.

Jod-Phosphorsäure färbt die gequollene Membran nur gelb. In diesem Zustand wird mehr Jod gespeichert: die intacten Verdickungsschichten erscheinen hellgelb, die angegriffenen dunkelgelb.

Kurz vor der Lösung erfolgt Abnahme des Speichervermögens. Da das Reagens nur eine Gelbfärbung bewirkt, wird die Membran bei der Einwirkung von Kupferoxydammoniak nicht hydrolysiert.

Bei der Quellung durch concentrirte Schwefelsäure erhält man durch die erwähnten Reagentien ähnliche Erscheinungen. (S. Fig. 11, in der eine Membran durch Alkali-Alizarin violett [in der Zeichnung blau] gefärbt ist.) Geht aber die Einwirkung der Schwefelsäure langsam vor sich, so erhält man nach Abspülen mit verdünntem Ammoniak und Wasser durch Jod-Phosphorsäure zunächst noch eine Gelbfärbung, wobei die Mittellamellen weniger Jod annehmen. Nur diejenigen Membranen, die am meisten von der Schwefelsäure angegriffen und fast structurlos geworden waren, wurden nach einiger Zeit ein wenig violett. Bei der Lösung durch concentrirte Schwefelsäure kann also Hydrolysirung eintreten.

## Untersuchung der hyalinen Zone bei der Keimung und bei der Diastaseeinwirkung.

### I. Die hyaline Zone bei der Keimung.

Von der sich lösenden Endospermschicht in der Umgebung des Scutellums einer keimenden Dattel werden dünne Schnitte angefertigt, welche mit unseren Reagentien zu behandeln sind.

#### 1. Alkali Alizarin.

Man setzt zu dem Schnitt einen Tropfen Kalilauge und etwas Alizarin. Nach einiger Zeit spült man mit verdünnter Kalilauge ab: die hyaline Zone ist wenig oder gar nicht gefärbt, die intacte Masse violett. (S. Fig. 1, in der die blaue Färbung violett zu denken ist.) Diese Reaction besagt also, dass aus der von dem diastatischen Enzym durchdrungenen Masse ein Bestandtheil, das Galactan, herausgenommen ist. Die hyaline Zone verhält sich gegen Alkali-Alizarin wie die mit heisser verdünnter Mineralsäure behandelte Membran, aus der ebenfalls das Galactan herausgelöst ist.

Dass aus der hyalinen Zone ein Bestandtheil der Reservecellulose entfernt ist, stimmt ferner mit dem Verhalten im polarisirten Licht überein: die Polarisation ist gegen diejenige der intacten Masse bedeutend herabgesetzt.

#### 2. Jod-Phosphorsäure.

In dem Schnitt dürfen diejenigen Membranthteile nicht herausgefallen sein, die unmittelbar vor der Lösung stehen, die also dem Scutellum zunächst liegen. Dieselben werden intensiv violett gefärbt. Diese Färbung nimmt centrifugal vom Scutellum allmählich ab und geht durch eine Mischfärbung, die als braunviolett zu bezeichnen ist, in hellgelb über. Die hyalinen Zonen, welche noch intacte Stellen einschliessen, werden stets hellgelb; sie heben sich scharf von den intacten Massen ab, die dunkelgelb bis gelbbraun tingirt werden. Bei Zusatz von Wasser geht das Violett in Blau über. (S. Fig. 7.)

### 3. Congoroth.

Sämmtliche hyalinen Massen werden intensiv, die intacte Substanz nur hellroth gefärbt.

Nach diesen Ergebnissen verläuft der Vorgang folgendermassen: vom Scutellum und vom Lumen der diesem zunächst liegenden Zellen aus dringt das diastatische Enzym in die Verdickungsschicht ein, wodurch dieselbe hyalin wird. Dass in der hyalinen Zone das Enzym vorhanden ist, wird durch die intensive Blaufärbung mittelst Guajak-Wasserstoffsperoxyd bewiesen. (S. Fig. 8.)

Durch die Enzymwirkung wird zunächst das Galactan herausgelöst, welches dabei durch Wasseraddition in Galactose übergeführt wird. Die hyaline Zone besteht somit aus einem Mannan, welches wenig hydrolysirt ist und mit Galactose- und Enzymlösung durchtränkt ist. Für die Herauslösung des Galactans sprechen folgende Gründe: 1. Alkali-Alizarin wird von der hyalinen Zone wenig oder gar nicht angenommen. (S. Fig. 1.) 2. Die Polarisation ist abgeschwächt. 3. Jod-Phosphorsäure färbt die Zone hellgelb, d. h. das Jod wird im Verhältniss zur intacten Membran in geringerem Maasse gespeichert. Das Mannan in der hyalinen Zone ist ferner wenig hydrolysirt, denn sonst müsste es durch Jod-Phosphorsäure violett werden.

Das zweite Stadium der Enzymwirkung besteht darin, dass das Enzym weiter eindringt und die ganze Verdickungsschicht hyalin wird. Dann beginnt auch schon „das Abschmelzen“, welches nach dem Scutellum hin mehr und mehr gesteigert ist. In diesem Zustand wird das Mannan weiter hydrolysirt und in ein Mannin übergeführt, welches durch Jod-Phosphorsäure violett gefärbt wird. Die Membran gleicht nunmehr derjenigen, welche mit heisser verdünnter Mineralsäure behandelt ist.

Den ersteren Vorgang kann man als fractionirte hydrolytische Lösung bezeichnen. Der Entwicklungsgeschichte der Verdickungsschicht gemäss bildet das Galactan in der Zellwand eine gleichmässig vertheilte Masse, welche beim Eindringen des Enzyms schwindet; das zurückbleibende wohl auch schon veränderte Mannan bildet die hyaline Zone: es ist aber nicht eine einfache fractionirte Lösung, denn das Galactan wird nicht gelöst, sondern in Galactose übergeführt, weshalb der Zusatz hydrolytisch erforderlich ist. Wahrscheinlich fehlt hierbei das Zwischenproduct Galactin, so dass also diese hydrolytische Lösung ähnlich wie beim Stärkekorn aus dem Canna-Rhizom verläuft.

Den zweiten Vorgang kann man als Allöolyse bezeichnen, denn die vom Enzym durchsetzte aus Mannan bestehende Schicht wird bei der Lösung verändert, d. h. vor der Ueberführung in Mannose in verschiedene Mannine verwandelt.

Die Einwirkung des Enzyms auf das Mannan wird alsbald seinen Anfang nehmen, wenn jenes in die Zellwand eingedrungen ist. Somit entsteht das erste Hydrolysations-Product des Mannans, welches also folgende Eigenschaften hat: Alkali-Alizarin wird wenig gespeichert, Congoroth sehr stark ge-

speichert und Jod-Phosphorsäure färbt es hellgelb. Wirkt das Enzym weiter, so wird das Mannan noch weiter hydrolysiert. Von den 3 eben erwähnten Eigenschaften ändert sich dann nur die letztere: Jod-Phosphorsäure färbt die Masse violett; diese Färbung geht bei Zusatz von Wasser in eine blaue über. Die erste Hydrolysestufe wird unter diesen Umständen farblos; sie sei daher Leukomannin und die zweite Cyanomannin genannt.

## II. Die hyaline Zone bei der Diastaseeinwirkung.

Von Endospermstücken, welche 4—5 Monate mit Diastase-lösung behandelt worden waren, wurden dünne Schnitte gemacht, und diese der Einwirkung unserer Reagenzien ausgesetzt.

1. Alkali-Alizarin wirkt genau so, wie es für die hyaline Zone bei der Keimung angegeben wurde.

2. Für Congoroth gilt das Gleiche.

3. Jod-Phosphorsäure färbt die Zone nur hellgelb; die intacte Membran vermag mehr J zu speichern. An stark korrodirt Stellen war nur eine schwache braun-violette Färbung zu bemerken; keineswegs war diese so intensiv rein violett, wie sie bei der Keimung zu beobachten war. Es scheint danach, dass das Dattel-Enzym stärker hydrolysirend wirkt, als wie Malz-Diastase.

4. Kupferoxyd Ammoniak löst die hyalinen Zonen und die intacten Wandmassen leicht fort, so dass diese übrig bleiben; an ihnen ist dann sehr deutlich der zackige Rand zu erkennen. Die Zone schwindet ganz allmählich und, wie mir schien, ohne zu quellen. Bei fortgesetzter Einwirkung des Reagens — man lässt neue Lösung unter dem Deckglas hindurchfließen — gehen die intacten Wandstücke, von denen die hyaline Zone entfernt ist, in Quellung über; diese erfolgt nun meist von der Mittellamelle aus. (S. Fig. 6a, 6b, 6c.)

Die Reservecellulose verhält sich also bei der Diastaseeinwirkung genau so wie bei der Keimung; nur ist die Hydrolyse eine schwächere, und die Veränderung geht überhaupt viel langsamer von statten.

Ganz allgemein lassen sich bei der Lösung der Reservecellulose zwei Hauptbestandtheile beobachten, von denen der eine schwerer löslich ist, als der andere. Eine ähnliche Erscheinung habe ich schon früher bei der Einwirkung concentrirter Schwefelsäure constatiren können; ich fand, dass die rundlichen Zellen in der Mitte des Dattelnkerns leichter angegriffen werden, als die mehr nach Aussen hin liegenden, welche eine langgestreckte Form haben. Dass mindestens zwei verschieden lösliche Kohlenhydrate die Reservecellulose zusammensetzen, lässt sich auch bei der Einwirkung von Kupferoxyd-Ammoniak auf dieselbe constatiren.

## Die Lösung in Kupferoxyd-Ammoniak.

Eine Anzahl von Dattelnkernen, von denen die Oberhaut so gut wie möglich entfernt worden war, wurde mittelst einer Feile zerrieben. Die pulverige Masse wurde mit Alkohol-Aether entfettet und darauf zur Entfernung der Eiweissstoffe mit stark verdünnter

Kalilauge schwach erwärmt. Die Masse wurde dann mit Wasser ausgewaschen und mit Kupferoxyd-Ammoniak übergossen. Darin quoll sie stark auf und ein beträchtlicher Theil ging in Lösung, die dann von dem Rückstand abgehoben wurde.

Durch diese Flüssigkeit wurde Kohlensäure geleitet, wodurch ein geringer Niederschlag entstand, der entfernt wurde. \*) Zu der Lösung wurde nun Essigsäure gesetzt, und der ausfallende Niederschlag mit verdünnter Essigsäure und darauf mit Wasser ausgewaschen; derselbe lieferte eine körnige weissliche Masse: die sei als Präparat I bezeichnet.

Der oben erhaltene Rückstand wurde mit neuen Mengen von Kupferoxyd-Ammoniak behandelt und nun löste sich weit weniger.

Nachdem diese Lösung, die längere Zeit auf der Masse belassen wurde, entfernt worden war, wurde der Rückstand in einen Literkolben gebracht und dieser mit frisch bereiteter starker Kupferoxyd-Ammoniaklösung angefüllt. Nach schwachem Erwärmen und nachdem die Lösung unter häufigem Umschütteln 24 Stunden gestanden hatte, war noch ein nicht unbedeutender Bodensatz vorhanden, welcher aber bei weiterer Behandlung allmählich geringer wurde. In die Lösung war dementsprechend wieder ein Theil übergegangen, sie wurde von dem Rückstand entfernt, welcher nun von der Kupferlösung gereinigt und dann ausgewaschen wurde. = Präparat II.

#### Präparat I.

Das Präparat stellte eine weisslich-körnige Masse dar. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden kleine Stückchen zwischen zwei Objectträgern zersplittert.

1. Bei Zusatz von Kupferoxyd-Ammoniak lösten sich die Körnchen leicht und vollständig auf; dabei wurde der Rand wolkig verschwommen, und eine Quellung unterblieb. In Fig. 14 ist ein sich lösendes Körnchen dargestellt.

2. Chlorzinkjod in nicht zu starker Concentration färbt die Körnchen blauviolett.

3. Alkali-Alizarin färbt intensiv violett.

4. Congoroth färbt schwach.

5. Jod-Phosphorsäure färbt gelb bis rothgelb; die Substanz ist also sicher nicht hydrolysirt.

6. Concentrirte Schwefelsäure ergiebt eine interessante Erscheinung: Sobald die Säure die Körner angreift, entsteht um dieselben eine schleimige Zone, die sich, je mehr die Objecte schwinden, weiter und weiter ausdehnt. Die letzteren werden dabei rissig; die Risse bilden auf der Oberfläche ein anastomosirendes Netzwerk. (S. Fig. 15.) In der schleimigen Hülle werden häufig einige kleinere offenbar schwerer lösliche Körnchen sichtbar, welche häufig als radiär gerichtete Reihen von der noch intacten

\*) Dieser Niederschlag ist nach Gilson Cellulose. (S. E. Gilson: La cristallisation de la cellulose et la composition chimique de la membrane cellulaire. La cellule vulgaire. Bd. 9. II. 2.)

Masse nach dem Rande der schleimigen Zone hin laufen. Am Rande selbst wird die Zone alsbald körnig-wolkig. Nach einiger Zeit ist auch der innere Kern von der Schwefelsäure ergriffen und verflüssigt worden.

Um die in Fig. 15 dargestellten Körner weiter zu untersuchen, wird die Einwirkung der Schwefelsäure durch Zusatz von Wasser unterbrochen und die Schwefelsäure durch verdünnte alkoholische Ammoniaklösung entfernt.

Ein Zusatz von Jodphosphorsäure färbt die Hülle rothgelb; die am Rande sich ausscheidenden Körnchen werden nach einiger Zeit braunviolett. Congoroth färbt die Hülle dunkel intensiv, den rissigen Kern dagegen nur hellroth.

Wir haben hier also dasselbe Resultat wie oben erhalten: die intacte Masse wird durch Congoroth hellroth, die gequollene intensiv dunkelroth gefärbt. Ebenso verhielt sich auch die Membran.

Was die chemische Zusammensetzung des Präparats anbetrifft, so scheint es, dass dasselbe zum grössten Theil aus Galactan besteht. Die pulverige Masse wurde nach der Methode von Tollens mit Salpetersäure behandelt: es schied sich aus der Lösung ein krystallinischer Niederschlag aus, der aus kleinen rhombischen Säulchen bestand. Derselbe ist also als Schleimsäure anzusprechen. Das Präparat muss daher sicher zum grössten Theil wenigstens aus Galactan bestehen. Ein anderer Theil des Präparates wurde mit verdünnter Schwefelsäure verzuckert.

Nachdem die Schwefelsäure mittelst Bariumcarbonat entfernt worden war, wurde die Lösung mit Essigsäure, Natriumacetat und Phenylhydrazin versetzt: Es schied sich das bekannte Mannosehydrazon aus. Daraus geht hervor, dass unser Präparat I zwei in Kupferoxyd-Ammoniak leicht lösliche Kohlenhydrate enthielt: ein Galactan und ein Mannan. Letzteres sei als  $\alpha$ -Mannan bezeichnet; es unterscheidet sich von einem anderen noch zu erwähnenden Mannan hauptsächlich durch seine Leichtlöslichkeit sowie dadurch, dass es durch verdünnte Mineralsäuren leicht verzuckert werden kann. Ueber die anderen Eigenschaften lässt sich nichts aussagen, da bis jetzt die Trennung von dem beigemengten Galactan nicht durchführbar ist.

## Präparat II.

Das Präparat stellt getrocknet eine gelbliche bis schwach bräunliche Masse dar. Unter dem Mikroskop erwies es sich als ein Gemenge: es enthielt noch Stücke aus der Samenhaut, ferner eine formlose körnige Masse und zum grössten Theil noch langgestreckte Endospermzellen, die mehr oder minder deformirt waren; einige von diesen enthielten noch protoplasmatischen Inhalt, andere nicht mehr. Die Reagentien wirkten folgendermassen ein:

Chlorzinkjod: Die körnigen Massen färbten sich meist dunkelblau; einzelne Flocken blieben farblos. Die Endospermzellen färbten sich nur selten ganz blau; meist blieben sie farblos. Dann aber fanden

sich viele Endospermzellen, welche einen deutlich körnig blauen Inhalt und völlig farblose Membranen aufwiesen. Solche Zellen habe ich in Fig. 16 abgebildet. Die Erscheinung deute ich folgendermassen: Die Kupferoxyd-Ammoniaklösung durchdringt die Zellwände und löst hier das Galactan, welches dann theilweise in das Zelllumen eingeführt wird; beim Auswaschen bleibt jener Bestandtheil im Innern der Zelle viel leichter als in der Membran zurück und wird hier durch die verdünnte Essigsäure als kleine Flocken niedergeschlagen. Durch Chlorzinkjod werden dieselben blau gefärbt, wie ja auch das Präparat I diese Färbung ergibt.

Von Wichtigkeit ist, dass die Membran dieser Zellen farblos bleibt: sie bildet den zweiten Bestandtheil der intacten Zellwand, das  $\beta$ -Mannan.

Dieses Resultat stimmt mit demjenigen überein, welches Gilson l. c. gefunden hat.

Derselbe löste die aus Kaffeebohnen dargestellte Cellulose in Kupferoxydammonik und leitete in die Lösung Kohlensäure; dadurch schied sich gewöhnliche Cellulose ab. Die Mannanlösung wurde eingedunstet und aus dem Rückstand durch sehr verdünnte Salzsäure das Kupfer entfernt. Dieser Körper lieferte bei der Hydrolyse nur Mannose; er giebt mit Chlorzinkjod keine Blaufärbung. Gilson nennt es Paramannan oder Mannosocellulose. \*) Ich habe die Zellen, deren Membranen aus reinem Mannan bestehen, als Rückstand bei der Einwirkung von Kupferoxyd-Ammoniak auf zerkleinerte Reservecellulose erhalten. Es sind dies die oben erwähnten langgestreckten Zellen, welche sich auch bei der Einwirkung von concentrirter Schwefelsäure als sehr widerstandsfähig erweisen.

Mit Alkali-Alizarin wird das Präparat, da es kein reines Product ist, in entsprechender Weise gefärbt: nach dem Auswaschen sind die Zellen theils farblos, theils gefärbt oder sie sind farblos und zeigen einen violetten Inhalt. Einzelne flockige Massen sind farblos, andere gefärbt.

Congoroth wirkt ebenso, nur überwiegen die gefärbten Zellen die farblosen; viele werden nur hellroth, andere noch dunkelroth gefärbt, und die flockigen Massen tingiren sich meist intensiv.

Danach sind also die Reactionen folgende:

I. Galactan +  $\alpha$ -Mannan:

Chlorzinkjod: blauviolett.

Alkali-Alizarin: violett.

Congoroth: hellroth.

Jodphosphorsäure: gelb.

II.  $\beta$ -Mannan:

Chlorzinkjod: farblos.

Alkali-Alizarin: farblos.

Congoroth: hellroth.

Jodphosphorsäure: gelb.

\*) S. E. v. Lippmann: Chemie der Zuckerarten. 1895. p. 327.

Die beiden Präparate wurden 10 Stunden mit verdünnter Schwefelsäure (2%) gekocht. Dabei zeigte sich ganz auffallend, dass das  $\beta$ -Mannan schwer angreifbar war: es lieferte weit weniger Zucker als das Präparat I. Aus den Lösungen wurde mittelst Bariumcarbonat die Schwefelsäure entfernt, worauf die Flüssigkeiten bis zur genügenden Concentration eingedampft wurden. Bei Zusatz von Phenylhydrazinacetat fiel aus der Lösung von Präparat I schon nach  $\frac{1}{4}$  Stunde das Osazon in kleinen Kryställchen aus, die meist büschelförmig vereinigt waren. (S. Fig. 17.) Aus der Lösung von Präparat II erfolgte erst ganz allmählich nach mehreren Stunden ein Absatz von kleinen meist nadelförmigen Kryställchen, die häufig ein kleines Gitterwerk bildeten. (S. Fig. 18.)

Leider konnte ich die chemische Natur des letzteren Osazons nicht feststellen, da die Quantität zu gering war. Ob beide Osazone identisch sind, liess sich nach der Krystallform nicht bestimmen, und die Art der Krystallisation war möglicherweise durch die Gegenwart von Fremdkörpern beeinflusst gewesen. Dafür aber, dass in dem letzterwähnten Körper ein Mannosazon vorliegt, spricht die Erscheinung, dass es sich aus der verdünnten Lösung in der Kälte abschied. Ferner können die Zellwände (Fig. 16) nicht aus gewöhnlicher Cellulose bestehen, da sie sich sonst durch Chlorzinkjod blau färben müssten; sie sind jedenfalls aus der Mannosocellulose ( $\beta$ -Mannan) zusammengesetzt, welche, wie erwähnt, nach Gilson mit Chlorzinkjod keine Blaufärbung geben.

Im Endosperm des Dattelsamens sind also 3 Kohlenhydrate zu constatiren: das Galactan, das  $\alpha$ -Mannan und das  $\beta$ -Mannan. Die Verschiedenheit der beiden letzteren tritt bis jetzt nur in der mehr oder minder leichten Löslichkeit und Hydrolysirung hervor.

Was die Vertheilung anbelangt, so enthalten die langgestreckten Zellen unter der Oberhaut vorzugsweise das  $\beta$  Mannan, dessen Menge centripetal im Gewebe abnimmt. In dem mittleren Theil des Endosperms wiegt mehr das  $\alpha$ -Mannan vor. Die Zellwände, in denen es ein integrierender Bestandtheil ist, gehören den mehr rundlichen Zellen an. Das Galactan ist, wie ich vermthe, ziemlich gleichmässig in dem ausgebildeten Gewebe vertheilt, worauf die überall fast in gleicher Weise auftretende Violettfärbung durch Alkali-Alizarin hinweist.

In Schnitten des unreifen Samens verläuft die Reaction verschieden, und zwar wird dann die Mitte des Endosperms am intensivsten tingirt.

Diesen Bestimmungen gemäss lässt sich eine Analyse der hyalinen Zone, welche bei der Keimung und bei der Diastaseeinwirkung an den Zellwänden erscheint, bis zu einem gewissen Grade ausführen. Zu dünnen Schnitten von Endospermstücken, welche mit Diastaselösung behandelt worden waren, wurde ein Tropfen Chlorzinkjodlösung gesetzt: die hyaline Zone blieb nicht farblos, sondern färbte sich noch leichter und intensiver, als die intacten Wandstellen. Die Masse ist also hydrolysirt; denn wie wir oben sahen, werden durch Jod-Schwefelsäure — und das gilt



auch von Chlorzinkjod — die mit heissen verdünnten Mineralsäuren behandelten Membranen, aus denen die leicht löslichen Bestandtheile, Galactan und  $\alpha$ -Mannan, entfernt sind, leicht und intensiv gebläut.

Alkali-Alizarin muss die Zone ungefärbt lassen, denn das Galactan ist entfernt.

Congoroth färbt nicht hellroth, sondern intensiv roth; auch dies stimmt mit den obigen Erfahrungen überein. Da die Masse nicht gequollen ist, rührt die Intensivfärbung nur von einer Hydrolysirung her, denn wie wir oben sahen, wird die mit heissen verdünnten Mineralsäuren behandelte Membran durch Congoroth intensiv gefärbt.

Jodphosphorsäure färbt hellgelb; durch nachfolgendes Wasser wird die Zone farblos. Ich habe wegen dieser Reaction, wie schon erwähnt, die Substanz der Zone im ersten Stadium der Enzymwirkung als Leukomannin bezeichnet. Ob an der Bildung desselben nur das  $\beta$ -Mannan (Mannosocellulose) oder beide Mannanarten theiligt sind, lässt sich nicht ermitteln.

Vor der Lösung wird die Zone durch Jodphosphorsäure violett und durch nachfolgendes Wasser blau gefärbt: das Leukomannin ist in Cyanomannin übergegangen.

#### Die Quellung der Zellwand in Schwefelsäure.

Im Anschluss an vorstehendes Ergebniss kann man die Quellungserscheinung der Zellwand in Schwefelsäure folgendermassen deuten:

Die in die Zellwand eindringende concentrirte Säure verbindet sich mit dem Galactan und dem  $\alpha$ -Mannan zu einer chemischen Verbindung, zu Galactan- resp. Mannan-Schwefelsäure; diese würde, wie dies bei den in Fig. 15 dargestellten Körnern der Fall ist, auseinanderfliessen, wenn nicht das  $\beta$ -Mannan gewissermassen als widerstandsfähiges Gerüst eingelagert wäre. Erst bei stärkerer Säureeinwirkung fliessen die Massen auseinander.

#### Die fractionirte Lösung und Allöolyse.

Mit dem Ausdruck „fractionirte Lösung“ soll die Trennung zweier ein zusammenhängendes Gemenge bildender Substanzen durch Lösung bezeichnet sein. Dies würde dem Begriff der fractionirten Destillation entsprechen, bei welcher zwei flüssige Körper, die ein Gemenge bilden, durch Destillation von einander getrennt werden. Für uns kommt hier der Lösungsmodus bei der fractionirten Lösung in Betracht. Es gelang mir, ein gutes Beispiel zu finden:

In einem Reagensgläschen werden gleiche Mengen Kalium- und Natriumnitrat zusammengeschmolzen. Die durchgeschüttelte Flüssigkeit, aus der man die Gasbläschen aufsteigen lässt, wird auf eine kalte Metall- oder Schieferplatte ausgegossen, sie erstarrt dann zu einer weissen homogenen kryptokrystallinen Masse. Kleine Stückchen derselben werden auf den Objectträger gebracht, worauf ein Tropfen Wasser zugesetzt wird. Die Stückchen

erscheinen dunkel, aber bald tritt das Lösungsmittel ein, und es erscheint eine helle Randzone, welche centripetal vorrückt, andererseits aber an ihrem Aussenrande gleichmässig schwindet.

In Fig. 13a ist ein solches Schmelzstück mit der hellen Randzone abgebildet; in Fig. 13b ist die Zone centripetal vorgerückt, und der dunkle Kern ist kleiner geworden. In Fig. 13c endlich ist der dunkle Kern ganz verschwunden.

Die Deutung ist hier leicht. Das Wasser dringt in die Schmelzmasse ein und löst zunächst die kleinen Natriumnitratkryställchen, so dass also die helle Zone aus Kaliumnitratkryställchen besteht, die eine zusammenhängende Schicht bildet. Dieselbe ist durchsetzt von einem anastomosirenden Netzwerke kleiner Kanälchen, die mit Natrium- und auch mit Kaliumnitratlösung angefüllt sind. Die Zone muss natürlich am Aussenrande am energischsten abschmelzen, da hier das Lösungsmittel den leichtesten Zutritt hat; die Kaliumnitratkryställchen im Innern der hellen Zone schmelzen schwer und langsamer ab, da in den Kanälchen die Concentration der Lösung an Kaliumsalz mehr und mehr ansteigt.

Schmelzstücke aus Kaliumnitrat und aus Natriumnitrat allein geben die helle Zone nicht. Erstere schmelzen gleichmässig, letztere mit zerbröckelndem Rande ab.

Ein anderes Beispiel bietet die Natriumphosphat-Boraxperle. Man stellt sich aus Natriumphosphat am Platindraht eine Perle her und eine ebensolche aus Natriumborat. Beide Perlen werden zusammengesmolzen und, damit die Lösungserscheinung deutlicher hervortritt, mit Cobaltoxyd gefärbt. An kleinen Stückchen dieser Perle konnte auf dem Objectträger in Wasser, soviel mir schien, keine Lösungszone beobachtet werden.

Die Lösung geht ausserordentlich langsam vor sich. Bei Zusatz von Salzsäure schiessen sofort an der Oberfläche der Stücke kleine Kryställchen an, die bisweilen herauswachsen. Bald darauf dringt das Lösungsmittel ein, und es erscheint eine farblose kryptokrystallinische Randzone. (S. Fig. 12a.) Nach einiger Zeit ist das ganze Stück vom Lösungsprocess ergriffen und der blaue Kern verschwunden, während das ganze Stück kleiner geworden ist. (S. Fig. 13b.) Die farblose Zone besteht hier aus einem zusammenhängenden Krystallnetzwerk, dessen Elemente Borsäure und Natriumpyrophosphat sind. In den Kanälchen finden sich diese Körper mit Salzsäure und Natriumchlorid in Lösung, wobei das Pyrophosphat in ein Hydrophosphat übergeht. In diesem Falle haben wir also nicht eine einfache Lösung, sondern eine Lösung mit Veränderung der ganzen Masse. Dies wäre gewissermassen eine Allöolyse; andererseits ist dieser Ausdruck nicht zutreffend, wie bei der Lösung des Mannans; denn hier ist die ganze Masse von dem Enzym durchsetzt und wird allmählich in Mannin übergeführt, also verändert, bevor sie „gelöst“, d. h. in Mannose verwandelt wird.

Bei der Einwirkung von Salzsäure auf eine reine Boraxperle, wobei die Borsäurekryställchen aus der hellen Randzone förmlich hervorschiessen, ist die Lösung demnach nicht als Allöolyse zu

bezeichnen; man könnte hier von Spaltungslösung sprechen, weil die Substanz bei ihrer Lösung in Natrium, das durch die Salzsäure gebunden wird, und in Borsäure gespalten wird, welche sich ausscheidet.\*) Letztere nimmt natürlich bei diesem Vorgang Wasser auf, weshalb auch die Kryställchen aus der Zone herauswachsen. Das Mannan hydratisirt sich auch, aber nicht so sprunghaft, sondern allmählich und fortgesetzt, bis endlich Mannose entstanden ist.

### Resultat.

1. Bei der Keimung dringt das diastatische Enzym vom Zelllumen aus in die verdickte Zellwand ein, und zwar je näher dem Schildchen, um so ausgiebiger.
2. Bei dem Eindringen des Enzyms erfolgt eine fractionirte hydrolytische Lösung, durch welche aus der Zellwand das Galactan entfernt wird. Es entsteht dadurch die hyaline Randzone.
3. Das in der hyalinen Zone restirende Mannan unterliegt der Allöolyse, d. h. die mit Enzym durchsetzte Masse geht in verschiedene Manninstufen und schliesslich in Mannose über.
4. Den Reactionen gemäss kann man ein Leukomannin und ein Cyanomannin unterscheiden.

### Figuren - Erklärung.

- Fig. 1: Schnitt von einem mit Diastaselösung behandelten Endospermstück; gefärbt mit Kalilauge-Alizarin. Diese Färbung ist violett zu denken. Durch Congoth wird die helle Zone intensiv dunkelroth und die dunklen intacten Stellen schwach hellroth gefärbt. Schnitte durch das Endosperm der keimenden Dattel verhalten sich genau so.\*\*)
- Fig. 2: Schnitt von einem Endospermstück; 2 Stunden mit verdünnter (1,5 pCt.) Schwefelsäure gekocht; zu dem Schnitt Jod und Schwefelsäure gesetzt.
- Fig. 3: Ein ebensolcher Schnitt in Jod-Phosphorsäure: die Verdickungsschicht färbt sich ohne Quellung violett; diese Färbung geht bei Zusatz von Wasser in Blau über.
- Fig. 4: Eine Endospermzelle in Kupferoxyd-Ammoniak: erstes Stadium der Einwirkung; die Lamellen werden sichtbar.
- Fig. 5: Wie vorher zweites Stadium der Einwirkung; die Quellung beginnt. Die dunklen Partien sind noch intact. Diese färben sich mit Congoth schwach hellroth, die gequollenen Massen intensiv dunkelroth.
- Fig. 6a: Stück einer Zellwand von einem mit Diastaselösung behandelten Endospermstück. z = hyaline Zone; i = intacte Substanz.

\*) Bei der Einwirkung von Enzymen auf Saccharocolloide kann man nicht von einfacher „Lösung“ sprechen; mindestens ist der Ausdruck „hydrolytische Lösung“ und „hydrolytisch gelöst“ zu wählen.

\*\*) Um ein gutes Präparat zu erhalten, verfährt man folgendermassen: Der Schnitt wird mit verdünnter Kalilauge ausgewaschen, worauf man etwas stärkere Kalilauge und Alizarin zusetzt. Letztere wird nach einiger Zeit mit Wasser abgespült. Ist die Färbung nicht intensiv genug, so muss Nachfärbung eintreten. Nach dem Abspülen setzt man einen Tropfen reiner Kalilauge zu, lässt diese abfließen und ersetzt sie durch Glycerin: die hyaline erscheint nun farblos; die intacte Masse tritt scharf abgegrenzt hervor und ist intensiv violett gefärbt.

- Fig. 6b: Wie vorher, aber nach Zusatz von Kupferoxyd-Ammoniak. Die Zone z ist gelöst.
- Fig. 6c: Wie vorher; die Quellung beginnt bei q, wodurch die primäre Membran sichtbar wird.
- Fig. 7: Schnitt aus dem Endosperm einer keimenden Dattel; die Zellwände m liegen dem Scutellum an; sie sind durch Jod-Phosphorsäure violett gefärbt; bei Zusatz von Wasser geht die violette Färbung in eine blaue über. (Cyanomannin.) Bei M. wird die hyaline Zone noch hellgelb gefärbt, durch nachfolgendes Wasser wird diese Partie farblos (Leukomannin). G ist noch intacte Substanz (Galactan-Mannan).
- Fig. 8: Schnitt wie vorher nach Behandlung mit Guajak-Wasserstoff-superoxyd.
- Fig. 9: Eine Endospermzelle nach längerer Einwirkung von Kupferoxyd-Ammoniak. Die Schichten a und i gehen schon in Lösung über. Färbung mittelst Alkali-Alizarin. Die blaue Färbung ist violett zu denken.
- Fig. 10: Wie vorher; die Einwirkung von Kupferoxyd-Ammoniak ist bei Eintritt der Quellung unterbrochen.
- Fig. 11: Die Zellhaut einer Endospermzelle ist durch concentrirte Schwefelsäure zur Quellung gebracht; nach Entfernung der Säure wurde mit Alkali-Alizarin gefärbt. Die Färbung ist violett zu denken.
- Fig. 12a: Eine Perle aus Natriumborat und -phosphat, welche durch  $\text{CO}_2$   $\text{O}_3$  blau gefärbt ist, bei der Einwirkung von Salzsäure.
- Fig. 12b: Wie vorher. Die Salzsäure ist ganz eingedrungen.
- Fig. 13a: Ein Stück einer Schmelzmasse von Natriumnitrat und Kaliumnitrat in Wasser.
- Fig. 13b: Dasselbe Stück wie vorher bei weiterer Lösung.
- Fig. 13c: Dasselbe Stück wie vorher vor dem gänzlichen Verschwinden; es besteht jetzt nur noch aus Kaliumnitrat.
- Fig. 14: Ein Stück von Präparat I, bei der Lösung in Kupferoxydammoniak.
- Fig. 15: Ein Stück von Präparat I, bei der Lösung in Schwefelsäure.
- Fig. 16: Einige Zellen von Präparat II, mit Chlorzink-Jod behandelt.
- Fig. 17: Osazonkrystalle aus Präparat I.
- Fig. 18: Osazonkrystalle aus Präparat II.

## Original-Berichte gelehrter Gesellschaften.

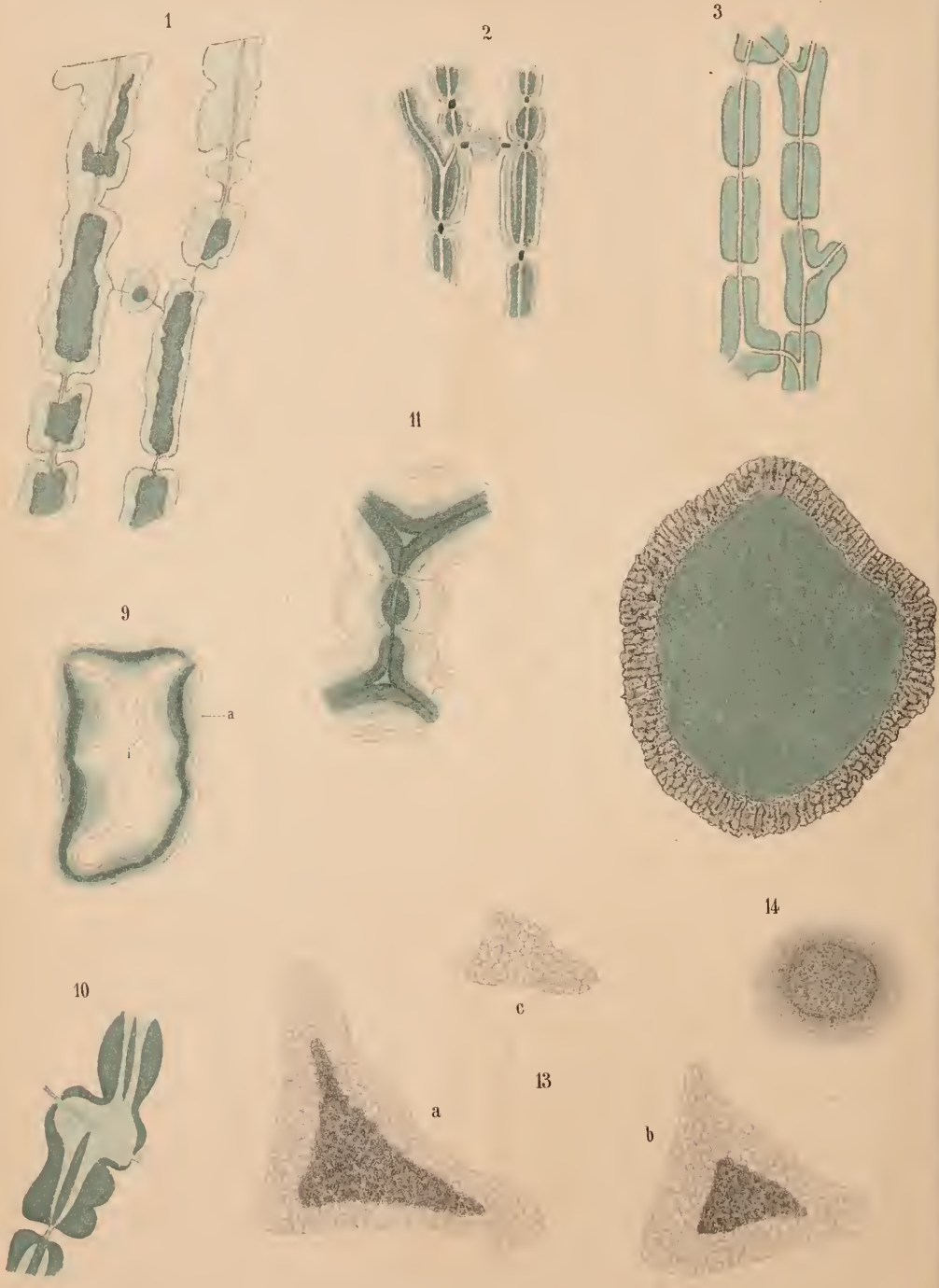
### Kaiserliche Gesellschaft der Naturforscher in Moskau.

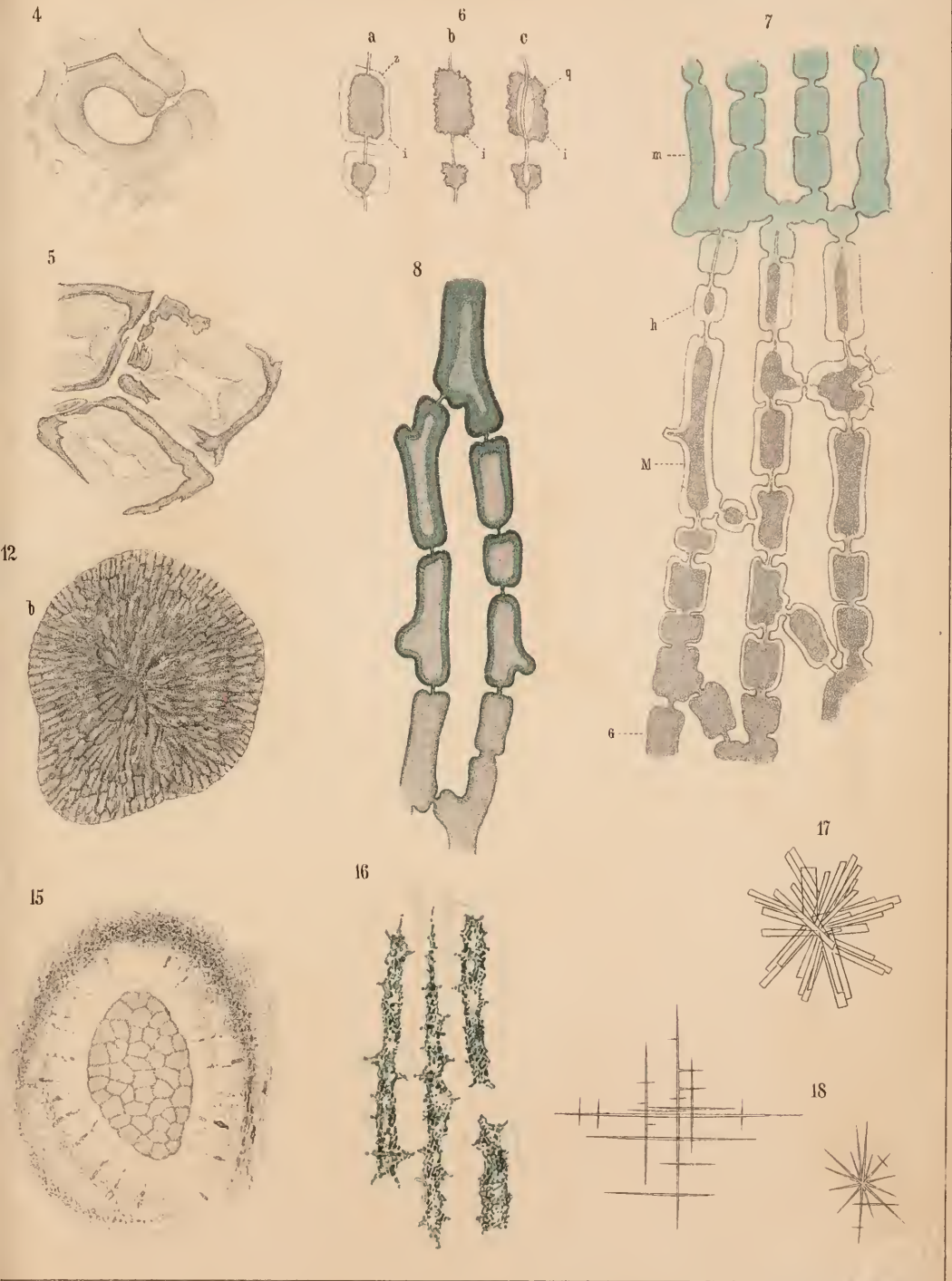
Sitzung vom 20. Februar/4. März 1897.

A. F. Flerow giebt:

„Eine kurze Skizze der Pflanzengenossenschaften des nordwestlichen Theiles des Wladimir'schen Gouvernements.“

Im ersten Theile seines Vortrages bespricht der Verfasser die seltenen Arten, die er bei seinen Excursionen fand, deren Fundorte und Verbreitung, und geht dann zur Erläuterung der Resultate über, welche ihm sein Studium der Pflanzengenossenschaften und ihrer gegenseitigen Verhältnisse gab. Wenn die einst so verbreiteten Laub- und Kiefernossenschaften jetzt energisch durch gemischte Fichtenwälder verdrängt werden, so glaubt der Verfasser, dass in diesem Wechsel nicht allein die äusseren Verhältnisse (wie das Klima und dergleichen) eine Rolle





# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Centralblatt](#)

Jahr/Year: 1897

Band/Volume: [70](#)

Autor(en)/Author(s): Grüss(Grüß) J.

Artikel/Article: [Studien über Reservecellulose. 242-261](#)