

ist, von Dr. Meß in einer aufgenommenen Drehwertskurven (vgl. Fig. 7 u. 8) beweisen, daß das Lichenin mit Cellulose nicht strukturidentisch ist und nicht der Cellulose so gegenübersteht, wie wir es für Cellulose und Cellulose A bewiesen haben. Karrer hat unter anderm seine Beweisführung darauf gestützt, daß Lichenin in Cellobiose übergeführt werden kann. Wir haben diesen interessanten Befund an unseren Präparaten bestätigen können. Nicht aber können wir Karrer in einem anderen

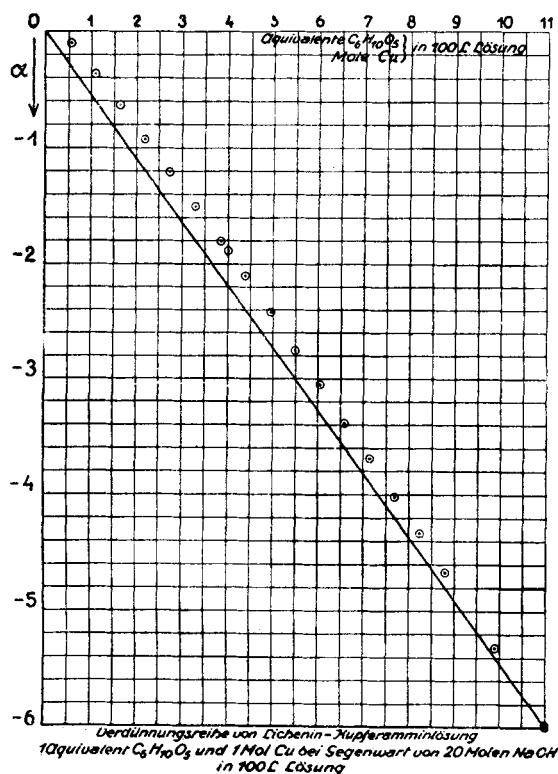


Fig. 8.

Punkte seiner Beweisführung folgen, nämlich in dem Drehwert seines Licheninacetates, den er zu $[\alpha]_D = -23,8^\circ$ findet, und den er wegen seiner Übereinstimmung mit dem Drehwert von gewissen Celluloseacetaten $[\alpha]_D = -24^\circ$ als weiterhin beweisend für die Cellulosenatur des Lichenins hält. Wir können nachweisen, daß Licheninacetate vom Drehwert $-23,8$ strukturchemisch nicht unerheblich angegriffene Präparate sind. Unsere reinsten Acetatpräparate zeigen $[\alpha]_D = -32^\circ$. Aber die Verseifungsprodukte dieser Präparate erweisen sich ganz im Gegensatz zu der Cellulose durch die Kupferamminmethode noch als erheblich verunreinigt: $\alpha = -1,8^\circ$ bis $-2,0^\circ$ (vgl. S. 1002). Reines strukturchemisch intaktes Präparat wird erheblich über -32° drehen. Aus diesen Befunden geht einwandfrei hervor, daß Lichenin strukturchemisch etwas anderes ist wie Cellulose. Leider hat eine Auswertung der Licheninkurven für die Bestimmung des Molekulargewichtes noch nicht zum Abschluß gebracht werden können, da hier die Verhältnisse komplizierter als bei der Cellulose liegen. Es ist möglich, daß das strukturchemische Molekulargewicht des Lichenins größer als das strukturchemische Molekulargewicht der Cellulose ist, es ist aber Lichenin nach dem Verlaufe unserer Drehwertskurven in Kupferamminlösung möglicherweise auch ein Gemisch mehrerer Komponenten; das letztere scheint uns vorläufig das wahrscheinlichere.

Dieser Abstecher von der Cellulose zu Lichenin soll die Bedeutung unserer Kupferamminmethode für die Charakterisierung von Polysacchariden im allgemeinen hervorheben. In meinem Laboratorium sind Versuche in Gang, sie für weitere „Polysaccharide“ in ähnlicher

Weise zu verwenden, wie ich es heute für die Cellulose entwickelt habe.

Die vorliegende Darstellung unserer Celluloseuntersuchungen läßt vielleicht erkennen, daß eine gewisse Grundlage gegeben ist, von der aus sich das bisher scheinbar unentwirrbare Durcheinander der Cellulosechemie einigermaßen übersehen läßt, und die darüber hinaus auch für andere Polysaccharide Gewinn verspricht. Die Ergebnisse möchten dazu beitragen, dem an synthetischen Erfolgen gewohnten Organiker den mühsamen entsagungsvollen Weg zu jener Höhe zu bahnen, die, wie unser Großmeister der Zuckerforschung vor 30 Jahren²⁵⁾ in einer optimistischen Laune zuversichtlich geäußert hat, ihm für eine künstliche Bereitung von Cellulose und Stärke nicht unzugänglich erschien. Möge diese Höhe auch weniger Zuversichtlichen nicht hoffnungslos unzugänglich erscheinen.

[A. 217.]

Über Reservecellulose und Cellulose.

Von P. KARRER, Zürich.

(Eingeg. 9./10. 1924.)

Das führende Kohlenhydrat des Isländischen Mooses, Lichenin, das Berzelius schon im Jahre 1813 in Händen hatte und mit dem Namen Moosstärke belegte, führt seit jener Zeit in den Lehr- und Handbüchern der organischen Chemie ein stilles Dasein. Die mangelnde Kenntnis über seine chemische Natur dürfte einen Hauptgrund dafür bilden, daß es in die große Gruppe von Unbekannten eingereilt wurde, für die Schulze — nicht eben glücklich — den Namen „Hemicellulosen“ geprägt hat.

Als vor etwas mehr wie zwei Jahren die Bearbeitung dieses Polysaccharides in unserem Laboratorium aufgenommen wurde, erkannten wir, daß in dem Lichenin aus *Cetraria islandica* ein der gewöhnlichen Cellulose nahestehender Stoff vorliegt. Die Verwandtschaft folgt aus den folgenden chemischen Umsetzungen, deren Resultate auch tabellarisch zusammengestellt sind.

1. Lichenin ist in wässriger Lösung wie Cellulose optisch inaktiv.
2. Die Acetyllose des Lichenins mit Essigsäureanhydrid-schwefelsäure führt, wie bei Cellulose, zu Cellobiose-octacetat. Doch besteht hier insofern eine Differenz, als aus dem Kohlenhydrat des Isländischen Mooses etwa nur halb so viel Octacetylcellobiose gebildet wird wie unter denselben Bedingungen aus Baumwolle. Allerdings ist bekannt, daß auch die verschiedenen Arten von Gerüstcellulosen in der Acetylolyse große Unterschiede zeigen, wie namentlich neue Versuche von Wise lehren.
3. Licheninacetat hat die spez. Drehung $-23,8^\circ$, für gute Celluloseacetate beträgt sie ebenfalls -23 bis -24° . Auch die Licheninacetate geben vortreffliche Filme.
4. Die Kupferzahl des Lichenins schwankt zwischen $0,5$ — $2,4$ und liegt demnach gleich hoch wie jene der Gerüstcellulose.
5. Lichenin zeigt wie Cellulose beim Erhitzen mit konz. Salzsäure geringe Furfurolabspaltung; diese hält sich in beiden Fällen unter 1% (meist 0,2—0,3%). Die Vakuumdestillation führt in beiden Fällen zu Lävoglucosan.
6. Phosphorpentabromid spaltet aus beiden Kohlenhydraten etwas Aceto-1,6-dibromglucose ab.

²⁵⁾ E. Fischer, Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente [1884—1908], S. 107.

7. Jodjodkalium, das Cellulose blau färbt, tut es auch mit Lichenin, doch nur, wenn letzteres unlöslich dem Reagens zur Einwirkung geboten wird.
8. Die erschöpfende Methylierung des Lichenins führt zu einem Methylierungsprodukt mit 42 % OCH_3 . Methylierte Baumwolle enthält nach den Untersuchungen von Irvin und Hirst, E. Heuser und K. Heß ebenfalls 42–43 % OCH_3 . Aus beiden methylierten Verbindungen läßt sich nach der Hydrolyse die 2,3,6-Trimethylglucose kristallisiert abtrennen; die Ausbeute, die wir bei Verarbeitung des Methylolichenins erzielten, erreicht allerdings jene nicht, die Irvin bei der Spaltung der methylierten Baumwolle festgestellt haben will.
9. Die bakterielle Zersetzung der beiden Kohlenhydrate, in verschiedenen Laboratorien ausgeführt, hat die nämlichen Abbauprodukte entstehen lassen: Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Milchsäure.
10. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Lichenin und Gerüstcellulose besteht in ihren Löslichkeitsverhältnissen: erstes wird von heißem Wasser kolloidal gelöst und auch von Natronlauge ziemlich leicht und reichlich aufgenommen.

	Baumwolle	Lichenin
Optische Drehung	inaktiv	inaktiv
Acetolyse (118°)	11 % Cellobioseacetat	6,5 % Cellobioseacetat
Drehung des Acetates	—23 bis —24°	—23,8°
Kupferzahl	etwa 1,0—2,4	0,5—2,3
Furfurolabspaltung	weniger wie 1 %	0,29 %
Vakuumdestillation	Lävoglucosan	Lävoglucosan
Jodjodkalium	Schwarzblau	Schwarzblau, gelöst
PBr ₃ -Einwirkung	wenig Aceto-1,6-di-bromglucose	wenig Aceto-1,6-di-bromglucose
Höchste Methylierungsstufe	42—43 %	42 %
Bakterielle Zersetzung	verschiedene niedere Fettsäuren	verschiedene niedere Fettsäuren

Diese Reaktionen, deren Verlauf an Lichenin und Cellulose eben geschildert wurde, weisen deutlich darauf hin, daß hier zwei nahe verwandte Kohlenhydrate vorliegen; so weit geht die Analogie, daß wir uns schwerlich etwas vergeben, wenn wir das Kohlenhydrat des Isländischen Mooses als eine besondere Celluloseart bezeichnen, und aus seinem Studium auch einen Gewinn zur Lösung des Konstitutionsproblems der gewöhnlichen Cellulose erhoffen.

Die neu erschlossene Celluloseart gewinnt nun ein besonderes Interesse dadurch, daß sie — im Gegensatz zur unveränderten Gerüstcellulose — durch Fermente glatt abgebaut wird. Saiki hat bereits vor 18 Jahren eine Zerlegung des Lichenins durch Takadiastase und Enzyme aus *Aspergillus niger* beobachtet, v. Tschermak wies sie gelegentlich im Kaninchenpankreas nach, Jewell und Lewis fanden sie in Invertebraten. Die Abbauprodukte wurden in keinem Falle untersucht. Anderseits war auf das Vorhandensein von reservcellulolösenden Fermenten in Pflanzen schon von zahlreichen Forschern, wie Brown und Morris, Grubb, Reinitzer, Newcombe, de Bary, hingewiesen worden; sie beschrieben, daß solche Enzyme die Zellwandungen auflösen, indem sie die dort gespeicherte Reservecellulose verzuckern.

Nachdem in dem Lichenin eine solche kolloidlösliche Celluloseart leicht zugänglich gemacht war, hatte es Interesse, die Verbreitung des Lichenin abbauenden Enzyms im Tier- und Pflanzenreich zu verfolgen, und so zugleich ein Bild von der Verbreitung des Lichenins selbst zu erhalten; denn es darf vorausgesetzt werden, daß das Fer-

ment nur dann in den Pflanzen gebildet wird, wenn ihm das Substrat dort zur Verfügung steht.

Pringsheim und Seifert fanden tatsächlich Lichenase in Malz, wir selber in keimendem Mais, Hafer, Weizen, Spinat, Bohnen, Spitzgras, treibenden Hyacinthenzwiebeln. Die Verbreitung des Lichenin spaltenden Enzyms, und damit auch die des Kohlenhydrates selbst im Pflanzenreich, speziell auch in keimenden Samen, ist eine allgemeine. Lichenin ist Reservecellulose, die Reservecellulose, deren Auflösung in Zellwandungen unter Fermentwirkung von den Botanikern schon lange beobachtet und beschrieben worden ist. Dabei ist der Name „Reservecellulose“ beschränkt auf das assimilierbare Kohlenhydrat, das mit der Gerüstcellulose eine so weitgehende chemische Verwandtschaft besitzt, wie sie für Lichenin nachgewiesen wurde; ausgeschlossen sind Mannane, Galaktane und analoge Stoffe. Aus Flechten, in denen Lichenin in sehr bedeutenden Mengen auftritt, kann es besonders leicht und rein abgeschieden werden. Isländisch Moos ist nicht die einzige Flechte dieser Art. Auch aus der gelben Evernia vulpina, aus Usnea barbata, der Bartflechte, aus Parmelia furfuracea haben wir Reservecellulose mühevlos und in bedeutenden Mengen extrahieren können. Die Identität der verschiedenen Präparate wird nicht allein durch ihre chemischen Reaktionen, sondern auch besonders durch die gleichartig verlaufende enzymatische Spaltung erwiesen.

Gewöhnlich haben wir die enzymatischen Spaltungen der Licheninpräparate mit der Lichenase, aus dem Magen-Darmkanal der Weinbergschnecke, *Helix pomatia*, ausgeführt. Eine geübte Hand präpariert leicht 50 Schnecken in der Stunde. Im ganzen wurden schon mehr wie 3000 verarbeitet. Vor der pflanzlichen Lichenase bietet die tierische den Vorteil größerer enzymatischer Homogenität. Zwar haben Biedermann, Berry und Gaja gelehrt, daß die Fermente aus *Helix pomatia* Mannane, Galaktane und andere Hemicellulosen, Stärke, Rohrzucker, Inulin und Fett zerlegen können, aber wir finden, daß mehrere dieser Enzymwirkungen schon durch mehrtägige Dialyse verlorengehen. Der dialysierte Saft enthält keine Diastase, keine Maltase, keine Inulase, keine Laktase und Lipase mehr, meist sehr wenig oder gar kein Invertin — die Schnelligkeit, mit der diese Inaktivierung erfolgt, scheint wesentlich von dem benutzten Schneckenmaterial abzuhängen.

	Reduktionskraft nach 48 Stunden	
	ohne Enzym	mit Enzym
Lichenin	0,2 ccm KMnO ₄	3,3 ccm KMnO ₄
Cellobiose	3,4 " KMnO ₄	4,5 " KMnO ₄
Gentiobiose	2,1 " KMnO ₄	3,1 " KMnO ₄
Maltose	2,4 " KMnO ₄	2,4 " KMnO ₄
Rohrzucker	0,4 " KMnO ₄	0,6 " KMnO ₄
Laktose	3,0 " KMnO ₄	3,1 " KMnO ₄
Stärke	0,2 " KMnO ₄	0,2 " KMnO ₄
Inulin	0,2 " KMnO ₄	0,2 " KMnO ₄
β -Methylglucosid	0,1 " KMnO ₄	0,1 " KMnO ₄
β -Salicilsäureglucosid . . .	0,1 " KMnO ₄	0,1 " KMnO ₄

Daß eine ganze Reihe der im Schneekensaft enthaltenen Enzyme bei der Dialyse verschwindet, beruht wahrscheinlich auf ihrer Labilität in wässriger Lösung. Sie scheinen sich in dieser Beziehung wie manche Pankreas- und Darmfermente höherer Tiere zu verhalten, die in wässrigem Medium einer schnellen Inaktivierung verfallen. Für die Pankreasamylase zeigten dies Berry, Sherman und Schlesinger, Willstätter; für die Darminvertase Euler, Svanberg und Myrbäck, für die Pankreaslipase eine ganze Reihe verschiedener Forscher.

Die Schneckenlichenase ist beständiger; längere Zeit bleibt ihre Aktivität in wässriger Lösung ungeschwächt; auch Mannan abbauende Enzyme konnten wir bisher von ihr nicht abtrennen.

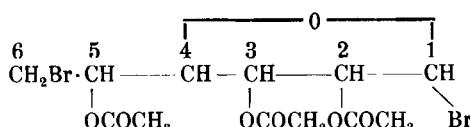
Wie von Aufang an erwartet wurde, ist die Lichenase kein einheitliches Ferment, sondern eine Enzymmischung. Darauf werden wir später einzugehen Gelegenheit finden.

In dieser Enzymmischung wird voraussichtlich eine Cellobiase, ein Cellobiose abbauendes Ferment nicht fehlen dürfen, da ja Lichenin Cellobiosekomplexe enthält. Ein solches ist in der Tat in der gereinigten Schneckenlichenase immer enthalten; es baut, wie die Tabelle lehrt, Cellobiose fast gleich schnell zu Glucose ab, wie der Enzymkomplex der Lichenase die Reservecellulose. In Gerste und in Malz wurde die Cellase schon im Jahre 1910 von Holder aufgefunden.

Außer diesem Disaccharid gibt es noch ein zweites, die Gentiobiose, das durch gereinigte Schneckenlichenase schnell und vollständig fermentiert wird. In der Schnelligkeit der Spaltung von Cellobiose, Gentiobiose und Lichenin besteht kein wesentlicher Unterschied. Die Tatsache, daß die Lichenase Gentiobiose gleich wie Cellobiose abzubauen vermag, während sie Maltose, Rohrzucker und Laktose abbauende Teilenzyme nicht enthält, ist sehr bemerkenswert.

Sie erhält eine erhöhte Bedeutung durch die Beobachtung, daß auch die pflanzliche Lichenase und Cellobiase stets von der Gentiobiase begleitet wird, und daß zwischen Lichenase, Cellobiase und Gentiobiase auch in quantitativer Beziehung annähernd Parallelität besteht. Spinatsamen und Haferkörnerextrakt enthalten beispielsweise von allen drei Enzymen wenig, Malzextrakt viel, ebenso der Darmsaft von Helix pomatia. Es scheint daher wahrscheinlich, daß nicht nur die Cellobiase, sondern auch die Gentiobiase ein Teilenzym der Lichenase darstellt. Vor wenigen Jahren hat Czapek in seiner Biochemie der Pflanzen die Tatsache des Vorkommens von Cellobiase in Gerste und Malz mit den Worten begleitet: „Es ist unbekannt, ob diese Enzymwirkung einem selbständigen Ferment zukommt, und was ihr Nutzen ist.“ Heute wissen wir, daß die Cellobiase als Teilenzym der Lichenase dem Abbau der Reservecellulose dient. Von neuem könnte man jetzt die Frage erheben nach dem Nutzen der Gentiobiose in Samen aller Art, in anderen Pflanzenteilen, in Invertebraten, da die Gentiobiose ja ein sehr seltener Zucker ist. Anders wird die Sachlage, wenn wir sie als Teilenzym des die Reservecellulose abbauenden Enzymkomplexes betrachten dürfen. Liegt ein Anhaltspunkt vor, daß Gentiobiosebindungen in der Reservecellulose vorhanden sind?

Vor längerer Zeit wurde aus den Ergebnissen der Phosphorpentabromidspaltung der Acetylcellulose der Schluß gezogen, daß in der Cellulose 6-Glucosidoglucosebindungen enthalten seien. Die Schlußfolgerung beruht auf der Beobachtung, daß ein Produkt der Phosphorpentabromidspaltung acetylierter Cellulose die 2,3,5-Triacetyl-1,6-dibromglucose ist:



Die Verbindung kann offensichtlich nur aus einem Polysaccharid gebildet werden, in dem die Hydroxyle 2,3 und 5 acetyliert waren, und die Stellung 6 zur Verknüpfung mit der nächsten Glucosemolekel gedient hatte. Unser Schluß hat nicht überall Glauben gefunden; Irvine, Pringsheim traten ihm, ohne eine andere

Erklärung für die Bildung der Aceto-1,6-dibromglucose zu geben, entgegen. Aus Lichenin spaltet Phosphorpentabromid in gleicher Art etwas Aceto-1,6-dibromglucose ab. Man kennt heute beide möglichen Glucosido-6-glucosen: die eine, die α -glucosidische Form, ist die Maltose; die andere, die β -glucosidische Struktur hat, die Gentiobiose. Daß Maltosegruppen in der Reservecellulose nicht vorkommen, dürfte auf Grund der Beständigkeit der Maltose gegen das Reservecellulose spaltende Enzym wahrscheinlich sein. Dagegen wird vielleicht die Tatsache, daß die Gentiobiase, Cellobiase und Lichenase stets zusammen und in ungefähr gleicher Menge auftreten, eine Stütze dafür werden, daß neben den Cellobiosegruppen Gentiobiosebindungen, d. h. 6- β -Glucosidoglucoreste in der Cellulose enthalten sind, wie wir bereits früher aus dem Phosphorpentabromidabbau dachten schließen zu dürfen. Dem uaheliegenden Einwand, die Schneckenlichenase sei allgemein auf β -Glucoside eingestellt und die Gentiobiose sei darum als β -glucosidischer Zucker dem Abbau ausgesetzt, begegnen wir durch die Feststellung, daß β -Glucoside, z. B. β -Methylglucosid und β -Salicylsäureglucosid durch das gereinigte Ferment nicht zerlegt werden.

Die Kinetik der enzymatischen Reservecellulosespaltung, deren Kenntnis für die Wertbestimmung der Lichenasepräparate unerlässlich war, ist nach verschiedenen Richtungen verfolgt worden. Die Reservecellulose wird von dem Ferment am schnellsten in schwach saurer Lösung gespalten; das Optimum ist ziemlich breit und reicht etwa von $p_A = 4,5$ bis 5,9 mit leichtem Kulminationspunkt bei $p_H = 5,2$. Die größte Wirksamkeit in saurer Lösung teilt die Lichenase mit den meisten anderen Polysaccharid spaltenden Fermenten.

Die Spaltung zeigt im ersten Drittel annähernd, — aber nicht genau — den Verlauf einer monomolekularen Reaktion.

Spaltungszeit in Min.	Spaltung %	$\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} \cdot 10^5$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
45	9,6	97,2	43
105	16,7	75,4	49
225	31,5	73,0	63
345	39,3	63,0	63
465	44,2	54,6	62
1355	69,3	37,9	59
4264	79,5	15,9	

Nachher verläuft sie längere Zeit nach der Schützischen Regel, d. h., die gespaltene Substratmenge wird proportional der Quadratwurzel aus der Spaltungszeit. — Die pflanzliche Lichenase baut die Reservecellulose nach denselben Gesetzmäßigkeiten ab.

Die Schnelligkeit der Reservecelluloseverzuckerung hängt im übrigen außerordentlich stark vom Dispersitätsgrad des Kohlenhydrates ab; während hochdisperse Lichenin schnell und quantitativ zu Glucose fermentiert wird, unterliegt zusammengedrücktes, schwer löslich gewordenes Lichenin dem Abbau sehr langsam und unvollkommen. Dies ist für quantitative Fermentierungsstudien zu berücksichtigen. Gerüstcellulose, Watte u. dgl. werden von dem Schneckenenzym nur spurenweise angegriffen, wie weit ihre vollkommene Unlöslichkeit daran Schuld trägt, soll noch zur Erörterung kommen.

Läßt man auf gleiche Gewichtsmengen Lichenin die 1,2,4,8 fachen Enzymquantitäten einwirken, so nimmt die Spaltung in gleichen Zeiten nicht im selben Verhältnis zu. Innerhalb des 10- bis 40 %igen Abbaues spaltet die doppelte Lichenasemenge nur das 1,45 fache desjenigen Reservecelluloseanteils, den die einfache Enzymmenge in derselben Zeit abbaut.

Spaltungszeit	% Spaltung durch die Fermentmenge				Verhältnis der gespaltenen Licheninmengen bei einfacher und doppelter Enzymkonzentration		
	1	2	4	8	1,41	1,45	1,39
1 Stunde	13,8	19,6	28,4	39,4			
2 Stunden	21,3	30,2	45,3	57,2	1,41	1,5	1,26
3 Stunden	27,8	39,9	52,4	61,9	1,44	1,31	1,18

Oder mit anderen Worten: im 10—40 %igen Spaltungsbe- reich ist die gespaltene Substratmenge proportional der Quadratwurzel aus der Enzymkonzentration.

Diese Gesetzmäßigkeit erlaubt es, verschiedene Mengen gereinigter Lichenase auf Grund ihres Spaltungsvermögens in bezug auf ihren Gehalt an aktivem Prinzip zu vergleichen. Spaltet nämlich die Fermentmenge 1 die Licheninmenge 1, so gilt nach obigem angenähert:

Fermentmengen	1	2	4	8	2^n
Spaltung in gleichen Zeiten	1	1,45	1,45 ²	1,45 ³	1,45 ⁿ

d. h. die Fermentmenge 2^n zerlegt in einer Einheitszeit das 1,45ⁿ fache der einfachen Licheninquantität.

Als Lichenaseeinheit wählten wir jene Enzymmenge, die bei 37° und $p_H = 5,28$ 1/g Lichenin innerhalb zweier Stunden zu 20 % abbaut. Die Reinheit eines Lichenasepräparates oder seinen Gehalt an aktivem Prinzip drücken wir im Lichenasewert aus, unter dem wir die Anzahl von Lichenaseeinheiten verstehen, die in 100 mg Trocken- substanz des Enzympräparates enthalten sind.

Unsere bisher aktivsten Lichenasepräparate besaßen den Wert 9. 100 mg dieses Enzympräparates waren also imstande, in zwei Stunden 9 g Lichenin zu 20 % abzubauen.

Die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Lichenaseeinheiten gestattet, die vorhandenen Fermentmengen in verschiedenen Pflanzen und Tieren zu vergleichen, und z. B. ihr Anwachsen während des Keimungsprozesses der Samen zu bestimmen.

So fanden wir beispielsweise in 2 kg Grünmalz etwa gleichviel Lichenase wie in 35—40 Schnecken, es waren etwa 95 Lichenaseeinheiten. In keimendem Hafer und keimendem Mais waren weniger, nur $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ dieser Menge enthalten.

Etwas unerwartet war die Beobachtung, daß sich im keimenden Samen von Gerste und Spinat die Enzymmenge während der Keimung nur unwesentlich ändert. Nach einem kleinen Anstieg in der ersten Keimzeit bleibt die Fermentmenge ziemlich konstant. Es sei übrigens betont, daß die Versuchsfehler nicht unwesentliche sind, denn die Enzymextrakte müssen vor der Bestimmung dialysiert werden, wobei wegen der nie ganz gleichartigen Durchlässigkeit der Membranen für das Ferment unkontrollierbare Verluste eintreten.

Am Maiskorn haben wir zu bestimmen versucht, ob die Lichenase ihren Sitz vornelmlich im Endosperm oder im Keimling hat. In Maiskörnern, die eine verschieden lange Keimzeit hinter sich hatten, trafen wir das Ferment stets im Endosperm und im Keimling an; anfangs ist es in beiden Teilen in ungefähr gleicher Menge vorhanden; nach den ersten Keimtagen steigt die im Embryo stationierte Lichenase auf Kosten jener, die im Endosperm sitzt, an. Das Verhältnis wird 2:1. Auch die Verteilung der Diastase im keimenden Maissamen ist eine analoge; nach Krauch verlegt sie ihren Sitz mehr und mehr in den Keimling.

Im Verdauungskanal höherer Tiere existiert bekanntlich ein gerüstcelluloseabbauendes Ferment nicht; man führt die teilweise Assimilation dieses Kohlenhydrates auf Bakterientätigkeit zurück. Auch dem Lichenin gegenüber sollen die Verdauungssäfte der Wirbeltiere ohne fer-

mentierende Wirkung sein; eine einzige gegenteilige Angabe liegt vor: nach v. Tschermak ist im Kaninchendarm die Lichenase zu finden. Wir suchten das Ferment im Magen des Schweines und des Rindes und trafen es in beiden, beim Rind besonders im Pansen, an. Aber alle Tiere, die uns zur Verfügung standen, hatten kurz vorher Futter erhalten, mit dem die Lichenase möglicherweise eingeschleppt worden ist. Bei Saugkälbern, denen nie Grünfutter verabreicht worden war, fehlte sie. Ob die Lichenase im Magen des ausgewachsenen Rindes und Schweines von innen oder, was wahrscheinlicher ist, von außen stammt, ist noch eine offene Frage; daß sie aber hier wirksam sein kann, steht fest. Die Bakterienflora ist für die Verzuckerung dieser Art von Cellulose nicht unentbehrlich.

Diese Beispiele, die aus einem größeren Versuchsmaterial herausgegriffen wurden, zeigen, daß die Reservecellulose dem anderen pflanzlichen Reservestoff, der Stärke, vielleicht der Menge nach, schwerlich aber in bezug auf Verbreitung und Interesse, nachsteht; ebenso verhält es sich mit ihrem Enzym, der Lichenase. Dem Botaniker öffnen sich zahlreiche neue Fragen, deren Studium keine unüberwindlichen Hindernisse mehr im Wege stehen dürften, seit es möglich ist, die Reservecellulose mittels ihres Enzyms und die Lichenase mittels ihres Substrates zu suchen und zu bestimmen.

Der Chemiker verspricht sich vom Studium des Lichenins auch einen Gewinn für das Problem der Cellulosekonstitution. Die Vorstellung einer Celluloseriesenmolekel im Sinne der Strukturchemie hat zwar heute, und wie es scheint mit Recht, nur noch vereinzelte Anhänger, aber über die Natur und Größe der sogenannten Elementarteilchen gehen die Meinungen noch wesentlich auseinander. Das ist leicht zu verstehen. Die Cellulose gehört zu den Kolloiden, deren Primärteilchen micellare Ausbildung besitzen; ihre Aufspaltung in Elementarmolekel ist noch nicht geglückt. Daher ist hier der Betrachtungsweise des Forschers in der Abgrenzung der Elementarmolekel ein weiter Spielraum offen, der nur durch die auf osmometrischem Wege ermittelte Größe der Micelle eine Grenze nach oben gesteckt ist. Die Kenntnis der Abgrenzung nach unten vermitteln die einfachen Spaltstücke, die Zucker, die man durch diese oder jene Reaktion aus der Cellulose abtrennen kann. Je nach der Art des Reagenz, das den Abbau diente, wechselt deren Natur, und es wird verständlich, daß verschiedene Forscher ihren Versuchen in bezug auf das Konstitutionsproblem verschiedene Deutungen geben.

Im allgemeinen sagen die größten Spaltstücke, wenn sie einheitlich sind, am meisten aus, denn die kleineren können immer aus ihnen hervorgegangen sein. Der Auf- fassung, die jüngst geäußert worden ist (K. Heß), daß die höhere Zucker, speziell also die Cellobiose, ein Produkt der Synthese darstellen, und daß ein Glucosanhydrid $C_6H_{10}O_5$ das Elementarteilchen sei, kann ich mich nicht anschließen. Nicht die leiseste Andeutung liegt vor, daß unter den Bedingungen der Acetolyse nach Franchimont Cellobiose synthetisch entstehen kann.

Wohin die Weiterverfolgung dieses Weges führen müßte, ist unschwer zu erkennen. Bereits spricht H. Pringsheim die aus Stärke bei der Hydrolyse entstehende Maltose als das Produkt einer Synthese an. Ich erwähne dies bloß, um hervorzuheben, wie sehr man sich hier vom Boden des experimentell Begründeten entfernt.

Daß der Komplex der Lichenase Cellobiose als Teil- enzym enthält, wurde schon erwähnt. In der Malzlichenase hat sie im Jahre 1910 Holderer entdeckt, in der Schneckenlichenase haben wir sie aufgefunden. Prings-

h e i m beobachtete, daß die Malzlichenase bei längerem Stehen der Lösung die Cellobiase verliert, und daß von dem übrigbleibenden Restenzym die Reservecellulose nur bis zu Cellobiose zerlegt wird. Auch diese Erscheinungen lassen sich ungezwungen nur durch die Auffassung erklären, daß die Cellobiose Baustein der Cellulose ist. Wenn es sich bestätigen sollte, daß dabei die Aufspaltung des Lichenins zur Cellobiose sogar quantitativ vor sich geht, so wäre damit für die Konstitution des Lichenins ein neuer Gesichtspunkt gewonnen. Und es würde damit erneut dargetan, daß die Ausbeuten an Cellobiose in der Acetolyse verschiedener Cellulosearten, wie ich eingangs schon hervorhob, kein zuverlässiges Kriterium für ihren wirklichen Cellobiosegehalt abgeben.

Die Lichenase aus *Helix pomatia* konnten wir in anderer Weise abschwächen. Die besten Bedingungen dafür stehen noch nicht fest; denn die Abschwächung gelang mit einem im Herbst gesammelten Enzym, mit dem wir den ganzen letzten Winter über gearbeitet hatten, leichter, als mit Lichenase aus Frühjahrsschnecken. Der Enzymkomplex verlor nicht nur die Cellobiase, sondern wahrscheinlich noch ein anderes Teilenzym, denn Reservecellulose wurde jetzt nur noch bis zu einem Polysaccharid abgebaut. Über die Natur desselben können wir noch nichts Abschließendes sagen, da es sich aus Materialmangel noch ungenügend untersuchen ließ; es ist frei von Glucose und Cellobiose. Beim Erhitzen mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung wird es in Glucosazin und das Osazon eines Trisaccharids zerlegt. Letzteres kristallisiert in Drusen, ist in Wasser spielend löslich und veränderte auch nach viermaligem Umkristallisieren seine Eigenschaften nicht mehr, so daß es als einheitlich angesehen werden muß. Der durch Fermentation aus Reservecellulose entstandene Zucker ist daher sehr wahrscheinlich molekular als ein Disaccharid.

In viel zu wenig beachteten Untersuchungen hat Seilliére im Jahre 1907 nachgewiesen, daß aus Kupferoxydammoniak umgefällte Cellulose im Gegensatz zur unveränderten Watte, vom Hepatopankreasaff der Weinbergschnecke zum Teil verzuckert wird, und daß hierbei Glucose entsteht. Er verfolgte die fermentative Spaltung nur qualitativ.

Im Anschluß an die Arbeiten über Reservecellulose haben wir, an die Beobachtung Seilliéres anknüpfend, diese Frage weiter verfolgt. Bleibt die Watte etwa 1 Stunde im Schweißerischen Reagens liegen, so kann sie nach dem Wiederausfällen und gründlichen Auswaschen durch Schneckenlichenase zu rund 50 % gespalten werden; fällt man den nicht gelösten Celluloseteil hernach nochmals aus Kupferoxydammoniak um, so werden in einem Versuch wieder 20 % durch das Ferment zerlegbar, und nach einem dritten Umfällen des noch nicht aufgelösten Celluloserestes aus der Kupferlösung wurde er durch das Enzym praktisch vollkommen verzuckert¹⁾). Es gelingt also, Baumwolle quantitativ durch Lichenase in Glucose abzubauen, wenn man sie in geeigneter Weise aus der Schweißerischen Lösung umfällt.

Cellulose, die Kupferoxydammoniakbehandlung durchgemacht hat, besitzt nach dem Trocknen die ursprüngliche Zusammensetzung und weist kaum erhöhte Kupferzahl auf. Nach Untersuchungen von Herzog, Katz und andern besitzt sie noch normales Cellulosediagramm mit unveränderten Gitterdimensionen; indessen scheint die Parallelorientierung der Micellen mehr oder weniger gestört zu sein, offenbar die Folge der außerordentlich starken intermicellaren Quellungsvorgänge, die zu einer weit-

gehenden Auflockerung der Kristallite, zu einer Erhöhung des Dispersitätgrades führen. Ich lasse die Frage offen, ob solche, aus Schweißer-Lösung umgefällte Cellulose auch chemisch verändert ist, oder ob sie sich von der strukturierten nur durch Verwerfung des Micellargefüges, und damit durch größere Dispersität unterscheidet. Solche umgefällte Cellulose wird also vom Ferment gespalten. Auch aus Viscose umgefällter Zellstoff, und mit Zinkchloridlösung in der Kälte behandelte Watte, werden nach dem Auswaschen von der Lichenase, allerdings in geringerem Maße, abgebaut. Beide Vorbehandlungen haben auf den strukturellen Bau der Cellulosefaser ähnlichen Einfluß wie das Umfallen aus Kupferoxydammoniak, d. h. sie führen zur Auflockerung des Zusammenhangs der Micellen.

Auch wenn man die Möglichkeit in Betracht zieht, daß eine chemische Veränderung während des Umfalls der Cellulose aus Kupferoxydammoniak vor sich geht, so scheint doch die Tatsache, daß auch das Umlösen über das Xanthogenat, und die Vorbehandlung mit Zinkchlorid, die Cellulose für den Abbau durch das Ferment geeignet machen, darauf hinzuweisen, daß die Unangreifbarkeit der Gerüstcellulose durch Enzym, nicht allein eine Frage der Konstitution des Cellulosemoleküls ist, sondern wenigstens teilweise eine solche der Micellenlagerung. Ist diese kompakt genug, so prallt die Wirksamkeit des Fermentes ab.

Zurzeit wird versucht, mit den Teilenzymen der Schneckenlichenase die umgefällte Watte zu Zwischenprodukten, Di-ev. Polysacchariden abzubauen, um zu entscheiden, ob dieselben Zucker wie aus Reservecellulose erhalten werden.

Der Umweg über die Reservecellulose scheint auch etwas Gewinn für die Konstitutionsfrage der Cellulose im allgemeinen zu bringen.

Zum Schluß sei noch ein Wort zu der Frage gestattet, ob die genauere Kenntnis des Lichenins die Hoffnung wecken darf, dieses Kohlenhydrat in praktischer Hinsicht mehr wie bisher auszunutzen.

Die Verwertungsmöglichkeit des Lichenins im menschlichen und tierischen Organismus ist schon lange bekannt. Bereits vor 130 Jahren berichtete Murray (1790), daß die *Cetraria Islandica* in der Krain als ideales Futter für Schweine gelte. Zu Beginn dieses Jahrhunderts hat Pousson aus den Kohlenhydraten des Isländisch Moos Brot backen lassen und festgestellt, daß etwa 50 % davon verdaulich sind. O. Hesse fand bei vergleichenden Untersuchungen über den Nährwert verschiedener kohlenhydratreicher Produkte, daß Isländisch Moos einen etwa 3,5fach höheren Nährwert als die Kartoffel besitzt. Trotzdem wird Lichenin für die menschliche Ernährung voraussichtlich auch in Zukunft keine große Rolle spielen, denn seine Isolierung aus der Flechte ist zu teuer, seine Reinigung von Begleitern zu umständlich. Etwas bessere Aussichten eröffnen sich für andere Verwertungszwecke; schon bisher wurde das Lichenin da und dort zur Appretur von Baumwolle benutzt; als eine sehr beständige Celluloseart eignet es sich wie kaum ein anderes Kohlenhydrat, die Cellulosefaser zu verstärken. Neue Versuche, die in dieser Richtung angestellt wurden, gaben befriedigende Resultate. Das Acetyllichenin wäre zur Herstellung von Filmen geeignet. Aber dieser Verwendungsmöglichkeit stehen die hohen Extraktionskosten hindernd im Wege. Trotzdem ist es Pflicht, auch die Technik auf dieses interessante Kohlenhydrat erneut aufmerksam zu machen.

[A. 228.]

¹⁾ Manchmal reicht auch ein zweimaliges Umlösen aus Kupferoxydammoniak für die vollständige Verzuckerung aus.