Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 68 (1958)

Artikel: Zur Charakerisierung der Siebröhrenkallose

Autor: Kessler, Gian

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-47908

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.09.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zur Charakterisierung der Siebröhrenkallose

Von *Gian Kessler*

(Aus dem Institut für Allgemeine Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich)

Mit 6 Abbildungen und 13 Tabellen

Eingegangen am 28. August 1957

Inhaltsverzeichnis Seite

I. Einleitung 5
1. Definition des Begriffes Kallose 5
2. Chemische und physikalische Eigenschaften der Kallose (Literaturübersicht) 6
3. Ziel der Untersuchungen 9
II. Methoden der Kallosegewinnung 9
1. Versuchspflanze 9
2. Möglichkeiten der Kallosegewinnung 10
3. Methode I 12
4. Methode II 15
5. Methode III 19
III. Physikalische und morphologische Eigenschaften der Kallose 20
1. Sorption und Quellung 20
2. Löslichkeit 21
3. Brechungsindex 23
4. Dichte 23
5. Röntgendiffraktion 25
6. Morphologie und Feinbau 26
IV. Chemische Untersuchungen an der Kallose 27
1. Einleitung 27
2. Allgemeine Methoden 28
3. Reaktionen zur Konstitutionsaufklärung 29
V. Schlußfolgerungen 34
1. Molekulares Modell 34
2. Klassifizierung der Kallose 40
VI. Zusammenfassung 41
VII. Literaturverzeichnis 42

I. Einleitung

1. Definition des Begriffes Kallose

Alternde und inaktivierte Siebröhren sind normalerweise dadurch gekennzeichnet, daß ihren Siebplatten beidseitig eine hyaline Masse aufgelagert ist, welche den normalen Stoffaustausch zwischen den Leitele-

menten verhindert. Hanstein (23) bezeichnet diese stark lichtbrechenden Beläge als Kalli. Mangin (30), der sich vor allem mit dem Chemismus der Zellwandsubstanz beschäftigte, führte 1890 den Begriff Kallose ein. Gemäß seiner Definition ist Kallose die chemische Bezeichnung für die Kallussubstanz.

Kallose besitzt eine ausgeprägte Affinität für die blauen Farbstoffe aus der Reihe der Triphenylaminomethan-Gruppe und kann damit histologisch leicht nachgewiesen werden. Wasserlösliches Anilinblau, ein Produkt bestehend aus den Natriumsalzen der Triphenylrosanilin- und der Triphenylpararosanilin-Sulfonsäure sowie der entsprechenden Disulfonsäuren, nimmt dabei eine Vorrangstellung ein. Andere Farbstoffe, die sich für eine spezifische Färbung gut eignen, sind Korallinsoda und Resoblau. Neben diesen klassischen Färbemethoden wird neuerdings das sehr empfindliche Fluoreszenz-Verfahren zum Kallosenachweis verwendet. Arbeiten von Arens (1), Arnold (2), Currier und Strugger (13) zeigen, daß der Membranstoff nach Behandlung mit Anilinblau und Wasserblau im Fluoreszenzmikroskop stark gelb aufleuchtet. Die Farbstoffe besitzen selbst keine Fluoreszenz, weder im festen Zustand noch in wäßriger Lösung; nach der Absorption durch die Kallose vermögen sie jedoch bei UV-Bestrahlung des Präparates den Membranstoff zu Sekundärfluoreszenz anzuregen.

Seit der Veröffentlichung von Hanstein ist Kallose mit Hilfe der Färbetechnik auch außerhalb der Siebröhren in Pilzmembranen, Pollenschläuchen, Milchröhren, Zystolithen und Tracheïden nachgewiesen worden. Eine zusammenfassende Darstellung gibt der Sammelbericht von Eschrich (18). Ob diese verschiedenen anilinblaupositiven Kallosemodifikationen chemisch identisch sind, wie das von Mangin angenommen wird, ist noch unabgeklärt. Der Begriff Kallose kennzeichnet daher nicht eine chemisch definierte Substanz, wie dies beispielsweise für den Begriff Zellulose zutrifft, sondern umfaßt eine Gruppe von Membranstoffen mit dem gemeinsamen Merkmal spezifischer Affinität für die blauen Triphenylaminomethan-Farbstoffe.

2. Chemische und physikalische Eigenschaften der Kallose (Besprechung der Literatur)

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Kallose sind bis heute nur ungenügend abgeklärt worden. Dies ist vor allem dem Umstand zuzuschreiben, daß eine Reindarstellung auf große Schwierigkeiten stößt, weil die Kallose in den verschiedenen Geweben immer in Begleitung anderer Skelettsubstanzen, wie Zellulose, Hemizellulosen, Pektinstoffe und Lignin, auftritt und mit ihnen einen nur schwer trennbaren Komplex eingeht. Auch ist der Anteil kalloser Substanz, gemessen an der Gesamtmasse der übrigen Membranstoffe, verschwindend klein. Eine

kritische Sichtung der beschriebenen Einzelbeobachtungen läßt folgende Daten als gesichert erscheinen:

Kallose ist ein hyalines Gel, das in Wasser und verdünnten Säuren unlöslich ist. Hydrolytische Spaltung mit konzentrierten Mineralsäuren liefert als einziges Abbauprodukt Glukose. Von der Zellulose unterscheidet sich der Membranstoff durch seine Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak. Ferner ist Kallose isotrop und wird durch Jodreagenzien nicht oder nur schwach gelb gefärbt. Diese Angaben haben für alle Kallosen Gültigkeit. Zur Beleuchtung der Frage, inwieweit verschiedene Modifikationen unterschiedliches Verhalten zeigen, seien im folgenden die Befunde für Pilzkallose, Siebröhrenkallose und Zystolithenkallose wiedergegeben.

Pilzkallose: Analysen der Kallose in Pilzgeweben sind von Winterstein (48) und Mangin (31) bekannt. Bei der sauren Hydrolyse von Pilzmyzel, in welchem zuvor das Vorhandensein des Membranstoffes auf Grund von Farbreaktionen sichergestellt wurde, erhielt Winterstein Glukose als Endprodukt. Er enthält sich jedoch der Behauptung, Kallose verarbeitet zu haben. Mangin wiederholte den Versuch am Myzel von *Bornetina corium*, einem Wurzelparasiten von *Vitis*. Die aus dem Pilz gewonnene Kallosefraktion ist in Alkalien unlöslich. Nach Vorbehandlung mit Brom läßt sich die gereinigte Ausgangssubstanz jedoch in verdünnter Lauge aufnehmen. Salzsäure fällt aus der Lösung eine viskose Masse, welche bei der Hydrolyse mit 5-%-Schwefelsäure Glukose liefert. Mangin bezeichnet demzufolge Pilzkallose als ein aus Glukose aufgebautes Polysaccharid.

Siebröhrenkallose: In der Veröffentlichung «Bau und Funktion der Siebröhren der Angiospermen» zeigt Schmidt (43), wie er mit Hilfe verschiedenster Reaktionen den Membranstoff chemisch zu fassen trachtete, doch geht aus seinen Aussagen nur hervor, was Siebröhrenkallose nicht ist. Der Inhalt seiner Arbeit ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Schmidts Angaben vermögen die Siebröhrenkallose nicht eindeutig zu umschreiben, reichen aber aus, einige Unterschiede gegenüber der Pilzkallose aufzudecken. Jene kann durch 1 *n* Schwefelsäure gelöst werden, während die Siebröhrenkallose bei der Behandlung mit Säuren solcher Konzentration unverändert bleibt. Ferner zeigen die beiden Modifikationen bei Jodeinwirkung ungleiches färberisches Verhalten.

Zystolithenkallose: Eine qualitative Untersuchung der Zystolithenkallose wurde von Eschrich (17) durchgeführt. Die aus Blättern von *Ficus triangularis* und *Ficus elastica* gewonnenen Zystolithen besitzen einen mittleren Kalloseanteil von 4,5%, der in 0,5 *n* Schwefelsäure bei 120° C in Lösung geht und hydrolytisch gespalten werden kann. Die papierchromatographische Analyse des Hydrolysates liefert als einzige Komponente Glukose.

Tabelle 1

Resultate von Schmidt

Zellulose: Blaufärbung durch Chlorzinkjod, löslich in Schweizer-Reagens, unlöslich in Javelle-Wasser.	*Kallose:* Gelbfärbung durch Chlorzinkjod, unlöslich in Schweizer-Reagens, löslich in Javelle-Wasser.
Hemizellulosen: Hydrolyse durch Erwärmen mit 5-%-Schwefelsäure in einigen Stunden	Unverändert durch mehrstündiges Einwirken heißer 5-%-Schwefelsäure
Glukoproteide: Löslich in Essigsäure	Unlöslich in Essigsäure
Stärke: Abbau durch Amylasen, Blaufärbung durch Jod	Amylaseneinwirkung negativ, Gelbfärbung durch Jod
Eiweiße: Abbau durch Proteasengemisch (Papain, Trypsin, Pepsin)	Proteaseneinwirkung negativ

An isolierten Zystolithen, welche nicht unter sterilen Bedingungen aufbewahrt wurden, konnte Eschrich das Ausfließen einer klebrigen Masse aus dem Zellulosegerüst beobachten. Der austretende Schleim ergibt mit Resorcinblau charakteristische Kallosereaktion. Mit Alkohol läßt er sich zu einem viskosen Material ausfällen, in Wasser dagegen löst sich das schleimige Produkt schnell und vollständig auf. Eschrich glaubt das Ausfließen der Kallose aus dem Zellulosegerüst auf einen partiellen Abbau derselben durch Mikroorganismen zurückführen zu können. Diese Feststellungen erlauben eine deutliche Unterscheidung der Zystolithenkallose von den zuvor besprochenen Modifikationen. Sie läßt sich schon in 2%-Schwefelsäure hydrolysieren, während die andern Ausbildungsformen als säurebeständiger charakterisiert wurden.

Die bis jetzt bekannten Ergebnisse der chemischen Kalloseaufklärung sind in Tabelle 2 einander gegenübergestellt.

Tabelle 2

Eigenschaften verschiedener Kallosemodifikationen

	Pilzkallose	Siebröhrenkallose	Zystolithenkallose
Schweizer-Reagens	unlöslich	unlöslich	unlöslich
Grundbaustein	Glukose	—	Glukose
Jodfärbung	negativ	gelb	gelb
Schwefelsäurekonzentration für Hydrolyse	5 %	20 %	2 %
Mikrobieller Abbau	—	—	positiv
Natronlaugekonzentration für Lösung	unlöslich	—	3 %

3. Ziel der Untersuchungen

Die Erweiterung der Kenntnisse über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Kallose ist vom theoretischen Standpunkt aus wünschenswert. Dabei drängt sich besonders eine neue Untersuchung der Siebröhrenkallose auf, da sie den Prototyp der Kallussubstanz darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Methoden für die Isolierung von Siebröhrenkallose ausgearbeitet. Die Reindarstellung von 140 mg Kallose bot anschließend die Möglichkeit einer physikalischen und chemischen Charakterisierung dieses Membranstoffes.

II. Methoden der Kallosegewinnung

1. Versuchspflanze

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Kallose dienten einjährige Triebe von *Vitis vinifera*, Kreuzung *Riesling* × *Sylvaner*. Die Sorte zeichnet sich durch gute Membranstoffbildung aus. Weiter ist ihr Siebgewebe sehr weitlumig gebaut und der Anteil plasmatischen Materials in den Siebröhren gering, was eine Aufarbeitung der Kallose stark erleichtert.

Es ist jedoch zu beachten, daß Kallose kein regelmäßiger anatomischer Bestandteil der Siebröhre darstellt (16). Vielmehr sind die Membranstoffbeläge starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen, welche in enger Korrelation mit der Entwicklung des Phloemgewebes stehen. Frühzeitig kann Kallose rund um jeden Verbindungsstrang in den peripheren Schichten der jungen Siebfelder nachgewiesen werden. Später dringen die Kalloseportionen den Siebporen entlang nach innen vor und bilden einen den Siebkanal zylindrisch auskleidenden Mantel. Die hohlzylindrischen Kalloseportionen werden anschließend durch lateral sich ausbreitende Kalloseauflagerungen auf den Oberflächenschichten der Siebfelder überdeckt, wobei eine partielle Imprägnierung des Zellulosegerüstes der Siebstege mit diesem Membranstoff erfolgt. In der Zeit, da das Phloem volle Aktivität entwickelt, verzeichnen die Kallosepolster keinen weiteren Zuwachs. Die Schwankungen der Membranstoffeinlagerungen halten sich während dieser Periode innerhalb enger Grenzen. Erst am Ende der Vegetationsperiode, wenn der Saftstrom vorübergehend zum Stillstand kommt, oder schon beim Rückgang des Umsatzes zwischen den Zellen des Gewebes, entwickeln sich die Kallusbeläge zu großen Kappen und überdecken die Siebfelder beidseitig als Halbkugeln. Diese bleiben dann während der Winterruhe unverändert erhalten (dormancy callus). Infolge der zweijährigen Funktionsdauer des Phloems von *Vitis* erfolgt im Frühjahr eine Reaktivierung des Gewebes. Gleichzeitig erfahren die Kalli einen raschen Abbau bis zur Wiederherstellung der plasmatischen Verbindung zwischen den Leitelementen. Ein neuer, persistierender Kalloseüberzug wird schließlich im Verlaufe der Inaktivierung der Siebplatte nach Abschluß der zweiten Vegetationsperiode angelegt.

Zur Erzielung einer optimalen Kalloseausbeute wurden einjährige, zur Zeit der Winterruhe geschnittene Triebe als Ausgangsmaterial verwendet. Das Holz wurde in frischem Zustand von der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil, übernommen und bis zu seiner Verwendung in feuchter Torferde bei 2° C gelagert. Die monatliche Kontrolle ergab bei diesen Bedingungen keine nachteiligen Veränderungen der Kallusbeläge.

2. Möglichkeiten der Kallosegewinnung

Der erste Schritt bei der Analyse eines Polysaccharides ist die Isolierung und die Reinigung des Ausgangsproduktes. Bei Polysaccharidgemischen, wie die Zellwand eines darstellt, basiert die Trennung der Bestandteile gewöhnlich auf einer fraktionierten Lösung der Einzelkomponenten und deren selektiver Fällung aus der gewonnenen Lösung. Eine Isolierung nach diesem Verfahren kann für die Kallose nicht in Betracht gezogen werden. Für ihre Lösung stehen zwar eine beschränkte Anzahl Lösungsmittel zur Verfügung, die jedoch gleichzeitig eine Reihe anderer Verbindungen aus dem chemischen Komplex der Zellwand herauslösen, von denen sich die Kallose nur abtrennen läßt, wenn ihre Konstitution bekannt ist. Ferner kann das durch Extraktion gewonnene Material nicht für physikalische und morphologische Studien verwendet werden, weil Textur und physikalische Eigenschaften des Membranstoffes bei der chemischen Aufarbeitung Änderungen erfahren.

Die Kallose läßt sich indessen umgekehrt durch selektives Weglösen der Nachbarsubstanzen anreichern. Zellulose, Hemizellulosen, Lignin und Pektinstoffe bilden den Hauptbestandteil der Siebröhrenwände. Ihre Entfernung aus dem Gewebe führt zu einer solchen Schwächung des Zellverbandes, daß der Zusammenhang des Gewebes verlorengeht und ein Zerfall in einzelne Zellen stattfindet. Bei genügender Mazeration der Wände können schließlich die Kallosepolster freigelegt werden.

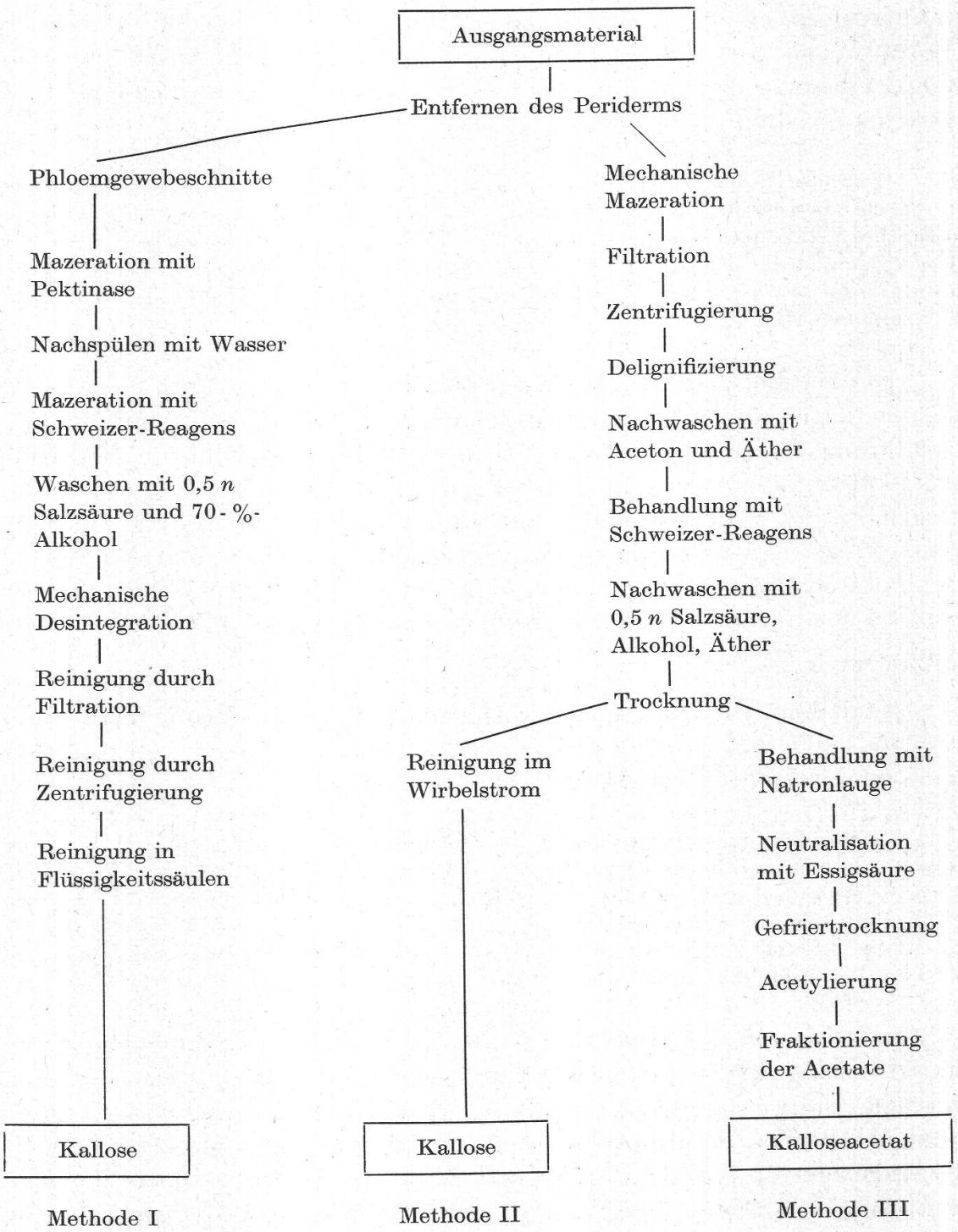
Als weitere Variante kann ein Abtrennen der Beläge vom übrigen Zellmaterial auf mechanischem Wege versucht werden. Dieses Verfahren bietet den Vorteil größter Schonung der Kallose, weil durch den Ausschluß von Chemikalien während des Aufarbeitungsprozeßes keine Veränderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften befürchtet werden müssen. Falls eine Verwirklichung der chemischen oder mechanischen Mazeration möglich ist, verbleibt zur Reindarstellung der Kallose nur noch das Problem ihrer Absonderung von den prozentual viel reichlicher vertretenen Zelltrümmern.

Aus der Literatur sind eine große Anzahl von Verfahren für eine Fraktionierung von Gemischen verschieden großer Teilchen bekannt. Ihre Eignung für die Reingewinnung der Kallose läßt sich jedoch infolge der Komplexität des Phloemmazerates nicht ohne weiteres voraussehen. Folgende vier Varianten sollen deshalb untersucht werden:

Reinigung der Kallose
1. durch selektive Filtrierung
2. durch Zentrifugierung
3. in Flüssigkeitssäulen
4. im Wirbelstrom.

Tabelle 3

Methoden der Kallosegewinnung



Ausgehend von diesen Möglichkeiten wurden als Ergebnis einer Reihe von Vorversuchen, auf die in dieser Veröffentlichung nicht näher eingetreten werden soll, die in Tabelle 3 wiedergegebenen Aufarbeitungsmethoden ausgearbeitet.

3. Methode I

Die vom Periderm befreiten Internodienstücke wurden in ein Schlittenmikrotom eingespannt und das an der Oberfläche liegende Phloem in Form tangentialer Schnitte vom Holzkörper abgetrennt. Anschließend erfolgte eine erste Mazeration der Schnitte durch Einlegen in eine geklärte Pektinaselösung.

Pektinase (Ferment AG, Basel) ist ein Schimmelpilzpolygalakturonase-Präparat, das in kleinen Mengen Pektinesterase enthält. Das Fermentgemisch vermag die Pektinsubstanz der Zellwand anzugreifen und teilweise in wasserlösliche Verbindungen abzubauen. Die Pektinesterase übernimmt bei diesem Prozeß die Verseifung der Estergruppen des Protopektins, während die Polygalakturonase die glykosidischen Bindungen des Moleküls zu spalten vermag.

Das Handelsprodukt wurde mit fünf Teilen Wasser verdünnt, und die suspendierten festen Partikel wurden durch Zentrifugierung von der Enzymlösung abgetrennt. 72stündiges Einwirken der Enzymlösung bewirkte eine vollständige Auflösung des Phloems in seine Einzelelemente. Da aber Pektinase den zellulosischen Wandanteil nicht angreift, waren die Siebplatten von den anstoßenden Wandstücken nicht abtrennbar. So blieben auch die Kallusbeläge mit den freigelegten Siebröhren in Verbindung, weil sie von der ursprünglichen Zellulosewand der Siebplatte durchzogen sind.

Nach dem vollständigen Auswaschen der Pektinaselösung mit Wasser erfolgte ein Überführen des Materials in Schweizer-Reagens, hergestellt nach dem Verfahren von Bengtsson (8).

312,86 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ werden in 5 l warmem Wasser (40° C) gelöst und mit 55 ml Ammoniak vom spezifischen Gewicht 0,91 gefällt. Der erhaltene Niederschlag wird durch 3maliges Aufschwemmen in einem Becherglas gewaschen. Anschließend wird das Sediment durch einen G4-Filtertiegel trocken gesaugt und in 1,6 l konzentriertem Ammoniak gelöst. Die Lösung wird während dreier Tage öfters geschüttelt, wobei nach dieser Zeit noch ein Bodensatz von ungelöstem $Cu(OH)_2$ zurückbleibt.

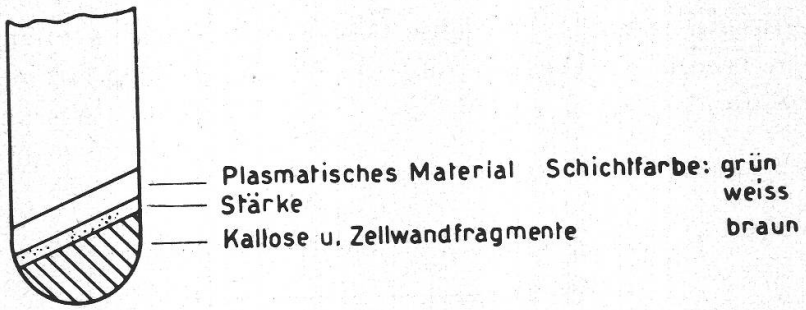
Die Behandlung mit Schweizer-Reagens während 20 Stunden bewirkte eine Ablösung der Siebplatten von den anstoßenden Wandteilen und eine partielle Freilegung der Kalli infolge Zerstörung des Zellulosegerüstes. Nach Abtrennen der Reaktionslösung vom ungelösten Material wurden die eingelagerten Kupfersalze mit 0,5 *n* Salzsäure ausgewaschen, das Mazerat mit 70-%-Alkohol behandelt und für mehrere Stunden am Vibrator

belassen. Durch mechanische Bearbeitung des mazerierten Gewebes vermochte man die Kalli quantitativ freizulegen.

Die kombinierte chemisch-mechanische Behandlung des Phloems ergab ein ganz inhomogenes Material. Neben Teilchen mit Ausmaßen von wenigen Mikron enthielt das Gemisch von bloßem Auge sichtbare Trümmer. Eine Ausmessung der Kalli zeigte, daß sie zu den kleinsten auftretenden Elementen gehörten. Aber auch von den Zellwandfragmenten besaßen viele Abmessungen gleicher Größenordnung wie die Kallosepolster. Reindarstellung des Membranstoffes durch Filtrierung war deshalb nicht möglich. Dennoch konnte mit dieser Methode rasch und ohne wesentlichen Materialverlust eine erste Anreicherung bewirkt werden. Als Filtermaterial wurde kurzfaserige Glaswolle verwendet. Die zerkleinerten Fasern erlaubten eine dichte Packung des Filters und bewirkten eine gute Abtrennung der groben Wandstücke schon beim einmaligen Durchgang des Maze-

Abbildung 1

Sedimentierungsfolge des Phloemmazerates



rates durch die Schicht. Ein Bodenbelag langfädiger Glaswolle verhinderte das Auswaschen der kurzen Filterhaare.

Die Entfernung der Komponenten mit kleinem Durchmesser gelang mit Hilfe der Zentrifugierungstechnik. Als Trennflüssigkeit diente destilliertes Wasser. Bei einer Drehzahl von 6000/Min. (Modell Gerber) ließen sich drei Schichten gewinnen (Abb. 1). Die beiden oberen Schichten enthielten ausschließlich protoplasmatisches Material und konnten auf Grund der differenzierten Färbung leicht von der basalen Schicht, bestehend aus Kallosebelägen und Zellwandfragmenten, abgetrennt werden. Nach diesem Arbeitsgang betrug der Kalloseanteil 2 bis 4 %.

Die Trennung von Kallose und Zellwandfragmenten wurde schließlich in Flüssigkeitssäulen mit konstantem Dichtegradienten versucht. Von den in Frage kommenden Medien vermochte wässerige Kadmiumchloridlösung am besten zu befriedigen. Kadmiumchloridlösungen zeichnen sich durch geringe Viskosität bei hoher Salzkonzentration aus, sind wasserklar und haben bei einem spezifischen Gewicht von 1,65 ihren Sättigungspunkt

noch nicht erreicht, weshalb kein Auskristallisieren des Salzes während des Arbeitsganges zu befürchten ist. Überdies verhält sich das Medium neutral gegenüber dem Membranstoff.

Die verwendete Apparatur bestand aus einem kalibrierten Glasrohr (Durchmesser 1 cm, Länge der Flüssigkeitssäule 60 cm), in welches aliquote Mengen Kadmiumchloridlösung von der Dichte 1,4/1,3/1,2/1,1 und anschließend zwei aliquote Teile Wasser eingefüllt wurden. Das Ansetzen der Säulen erfolgte 24 Stunden vor Versuchsbeginn. Das Kallose-Zellwandgemisch wurde im Mikroturrax zu einer wäßrigen Suspension verarbeitet und den Flüssigkeitssäulen aufgesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Auswertung der Versuche. Dazu wurden die Flüssigkeitssäulen durch Öffnen des Hahns gleichmäßig in sechs Zentrifugengläser abgefüllt, und die Sedimente der Fraktionen wurden auf ihren Kallose- und Zellwandgehalt hin ausgewertet. Die Bestimmung der prozentualen Anteile erfolgte anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen von Ausstrichpräparaten durch Auszählen der Teilchen beider Komponenten.

Resultat: Nach 24stündiger Laufzeit finden wir eine Verteilung der Kallosepolster entsprechend ihrer Größe über die ganze Säulenlänge. Die Gewebetrümmer dagegen zeigen eine Häufung im basalen sowie im oberen Abschnitt, so daß der mittlere Bereich relativ arm an Verunreinigungen ist. Für die einzelnen Fraktionen erhält man die in Tabelle 4 wiedergegebenen Werte.

Tabelle 4

Prozentualer Kalloseanteil in den 6 Fraktionen

Glas	Kalloseanteil in %
6	0— 5
5	5—10
4	0— 5
3	50—60
2	35—45
1	40—50

Kritische Betrachtung der Methode I: Der Prozeß eines selektiven Abbaus des Phloems unter gleichzeitiger Freilegung der Kallusbeläge hat sich als durchführbar erwiesen. Der Membranstoff zeigt am Ende des Arbeitsganges außer einer leichten Quellung, hervorgerufen durch die Einwirkung des alkalischen Schweizer-Reagens, keine nachteiligen Veränderungen. Reinigung durch Filtrierung und Zentrifugierung vermag den Kalloseanteil des Mazerates auf 2 bis 4% zu erhöhen. Durch Anwendung von Flüssigkeitssäulen kann der Kallosegehalt einzelner Fraktionen bis auf 60% gesteigert werden. Hingegen gelingt eine vollständige Reindar-

stellung mit diesem Verfahren nicht, da die Größe der Kallusbeläge eine Streuung von mehreren 100 % aufweist und die Kalli demzufolge mit stark verschiedenen Geschwindigkeiten absinken. Eine ähnliche Verteilung ergibt sich für die Zellwandfragmente. Vollständige Trennung der beiden Anteile läßt sich nur erreichen, wenn es gelingt, die Zellwandstücke bis auf die Größe der kleinen Kallosekügelchen zu zerkleinern.

4. Methode II

Nach Ablösung des Periderms erfolgte eine mechanische Verarbeitung des Phloems zu einer feinen Suspension, wofür die in Abb. 2 wiedergegebene Apparatur verwendet wurde. Sie besteht aus einer rechteckigen Glaswanne und einer Schleifmaschine, die sich in horizontaler Richtung ver-

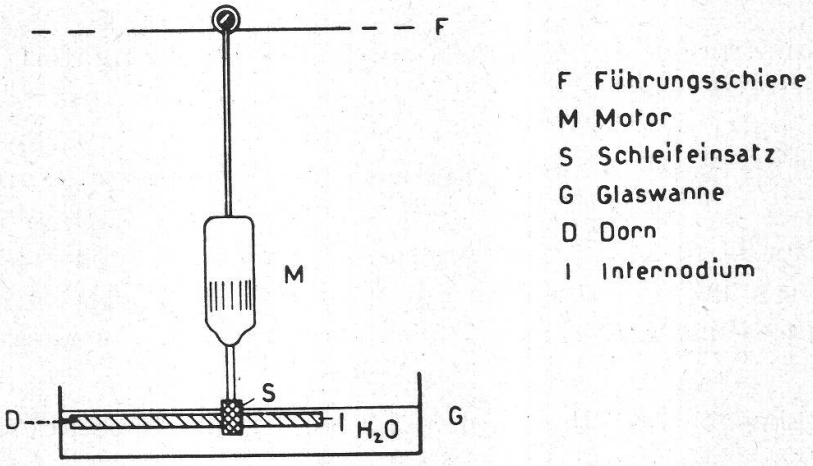


Abbildung 2

Apparatur zur mechanischen Aufarbeitung der Kallose

schieben läßt. Auf gleicher Höhe wie der Schleifeinsatz (Edelkorund, Härte N, Korn 36/46) ist an einer der seitlichen Wandungen des Gefäßes ein Dorn angebracht. Zur Erzielung eines optimalen Homogenates erweist es sich als vorteilhaft, den Schleifprozeß unter Wasser durchzuführen. Bei einer Trockenbehandlung werden nur größere Gewebekomplexe abgelöst, unter Wasser läßt sich jedoch das Phloem zu einem feinen Schlamm abfräsen bei gleichzeitigem Aufbrechen aller Zellen. Damit werden auch die Kalli quantitativ freigelegt.

Die Internodien wurden auf den Dorn aufgesteckt, und das Siebgewebe wurde mit der Schleifmaschine bearbeitet. Gleichzeitig erfolgte ein langsames Drehen des Holzstückes um seine Längsachse, wodurch sich das ganze Phloem erfassen ließ. Das Hervortreten des gelben Xylems war ein Zeichen für die vollständige Abtragung der Phloemschicht. Das so

gewonnene Mazerat wurde anschließend nach dem in Methode I beschriebenen Verfahren der Filtration und Zentrifugierung vorgereinigt. Eine Kontrolle zeigte, daß bei der mechanischen Mazeration das Wandmaterial der Siebfelder nicht von der Kallose abgetrennt werden konnte, da es in den Belägen eingeschlossen bleibt. Diese Fremdstoffe ließen sich nur auf chemischem Wege entfernen. Dazu wurde das Gemisch in einer ersten Stufe nach dem Verfahren von Wise (51) entlignifiziert:

5 g vorgereinigtes Material wurden in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben eingebracht und mit 160 ml Wasser bis zur vollständigen Dispersion geschüttelt. Sodann wurden 10 Tropfen Eisessig und 1,5 g Natriumchlorit zugegeben, und das Gefäß wurde zu ⅔ in ein Wasserbad (75° C) eingetaucht. In Abständen von 60 Min. erfolgten drei weitere gleiche Zusätze von Eisessig und Natriumchlorit. Nach Abtrennung des Rückstandes von der Reaktionsflüssigkeit wurde mit Eiswasser-Aceton nachgewaschen und das Präparat i. V. getrocknet.

Zur Entfernung der Zellulose wurde das Trockenmaterial mit 1,2 g Kupferhydroxyd vermischt und durch Zugabe einiger Tropfen Ammoniak (spez. Gew. 0,91) zu einer Paste verarbeitet. Die zellulosischen Bestandteile zeigten bei dieser Behandlung starke Quellung. Später wurde der Ammoniakzusatz auf 100 ml erhöht und das Material in der frisch zubereiteten Schweizer-Lösung während 20 Stunden belassen. Nach Abtrennen der flüssigen Phase ließ sich aus dem mit 0,5 *n* Salzsäure, Aceton und Äther gewaschenen Rückstand durch Vakuumtrocknung ein weißes Pulver gewinnen.

Die Kallosebeläge sind nach der chemischen Behandlung frei von Fremdstoffen. Eine restlose Auflösung der Zellwandfragmente läßt sich mit diesem Verfahren allerdings nicht erreichen. Auch enthält das Gemisch noch einen störenden Anteil an Kalziumoxalatkristallen. Es wurde nun versucht, im Wirbelstrom diese beiden Komponenten von der Kallose abzutrennen.

Die Arbeitsweise ist folgende: Das Trockenmaterial wird in der zehnfachen Menge Wasser aufgenommen und das Homogenat in kleinen Portionen auf Uhrgläser (Durchmesser 7,5 cm) gegeben. Durch kreisende Bewegung des Glases wird in der Flüssigkeit ein Wirbel erzeugt, worin die drei Komponenten des Mazerates unterschiedliches Verhalten zeigen. Während die stark korrodierten Zellwandflocken im Wirbel mitlaufen, läßt sich eine allmähliche Sedimentierung der Kallosebeläge und der Kalziumoxalatkristalle beobachten. Bei rascher Dekantierung der Flüssigkeit bleibt das Sediment im Uhrglas zurück und kann durch mehrmalige Zugabe von Wasser quantitativ von den Zellwandanteilen getrennt werden. Sorgfältig dosierte Vibration des Glases führt sodann zu einem Aufsteigen der Kalli, welche man kontinuierlich mit einer Glaspipette absaugt. Mit dieser Methode wurden 140 mg reine Kallose gewonnen.

Kritische Betrachtung der Methode II: Eine mechanische Bearbeitung des Phloems vermag die Kalli freizulegen (Abbildung 3). Das Verfahren bietet gegenüber der in Methode I angewandten chemischen Mazeration den Vorteil größerer Einfachheit und größerer Leistungsfähigkeit. Als einziger Nachteil des mechanischen Prozesses zeigt sich, daß die Kallose nicht vollständig von den Nachbarstoffen abgetrennt werden kann. Durch eine chemische Nachbehandlung des Mazerates lassen sich jedoch die störenden Fremdsubstanzen entfernen. Abbildung 5 zeigt einen gereinigten

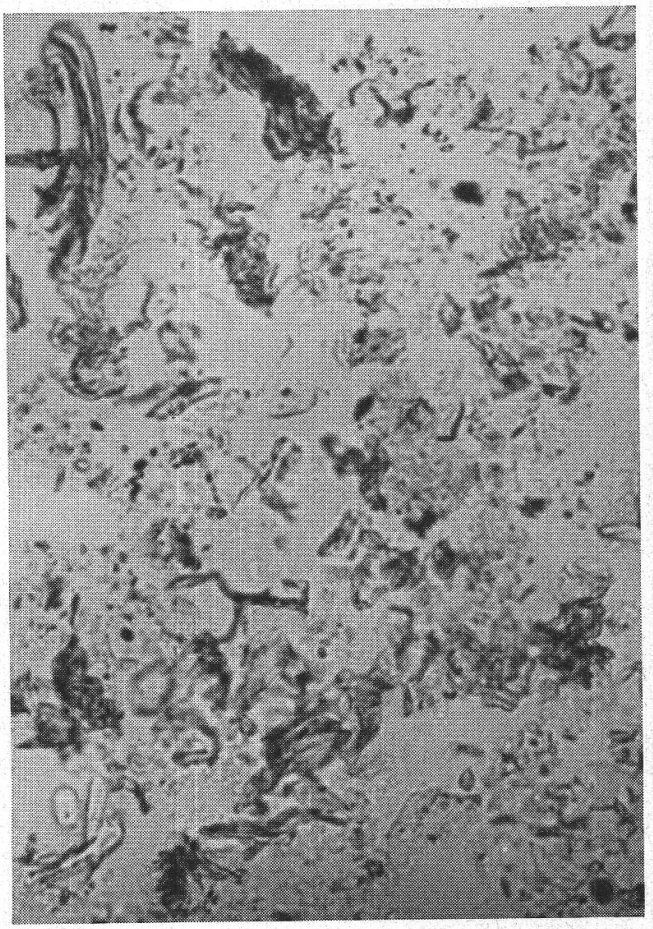


Abbildung 3
Mazerationspräparat, gewonnen nach Methode II
Vergrößerung zirka 100×

Kallosekörper. Die Zellulosestege der Siebfelder sind durch Einwirkung des Schweizer-Reagens aufgelöst worden. Die den Siebfeldern beidseitig aufgelagerten Kallosepolster werden nur noch durch die Porenzylinder aus Kallose zusammengehalten. Eine optimale Wirkung der Kupferoxydammoniak-Lösung wird dann erreicht, wenn das Trockenmaterial zuerst mit dem Kupferhydroxyd und wenig Ammoniak vermischt wird. Die Zellulosesubstanz zeigt dabei starke Quellung und geht bei der nachfolgenden Zugabe von mehr Ammoniak unter Bildung einer Additionsverbindung mit dem Schweizer-Reagens leicht in Lösung. Mit Hilfe des Wirbelstromverfahrens läßt sich Kallose rein darstellen (Abbildung 4). Als einzige Verun-

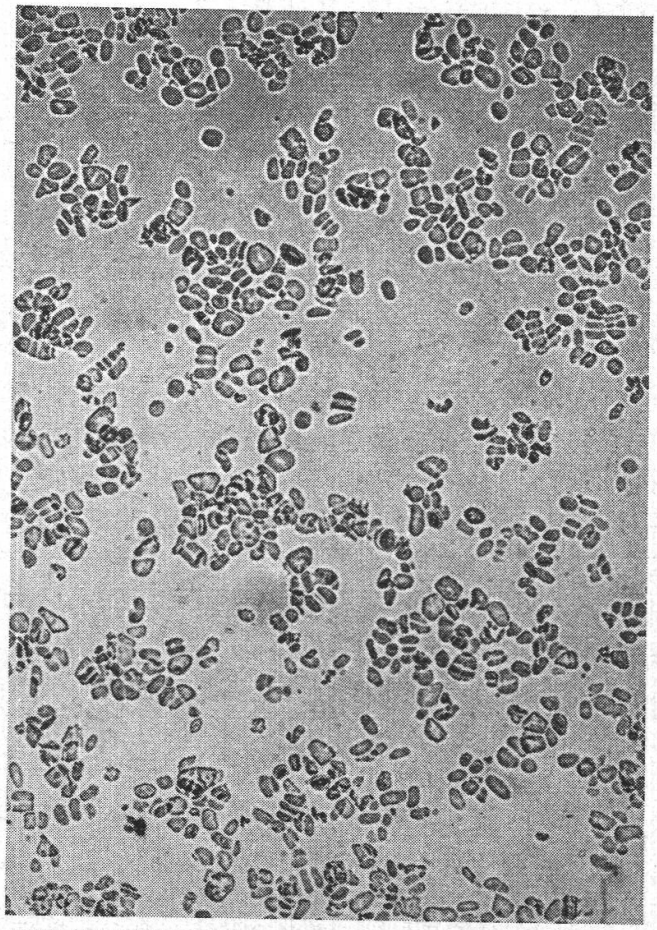


Abbildung 4
Im Wirbelstrom gereinigtes Kallosepräparat
Vergrößerung zirka 100 ×

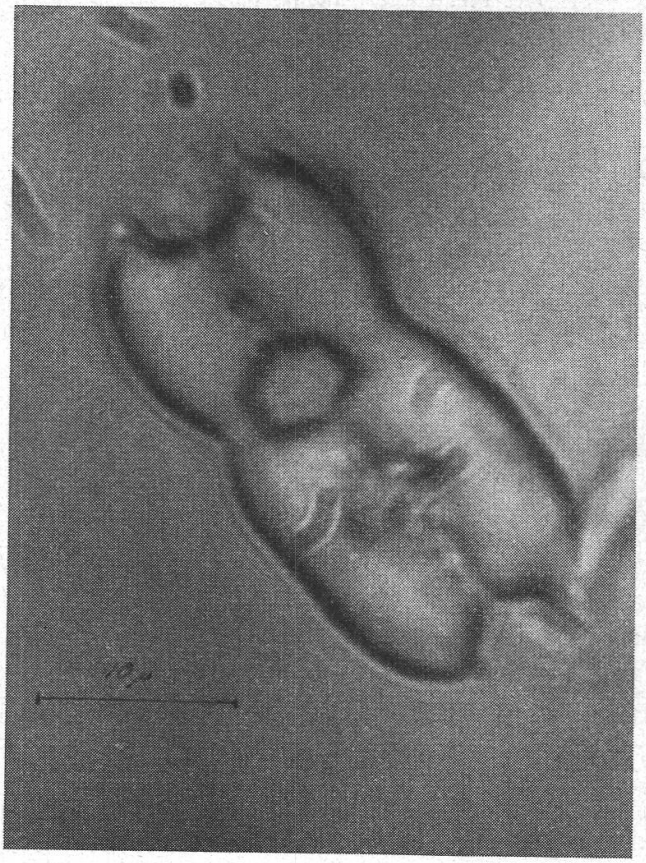


Abbildung 5
Chemisch nachbehandelter Kallosekörper
Elektronenmikr. Aufn.
Vergrößerung 2000 ×

reinigungen treten nur noch wenige Kalziumoxalatkristalle auf. Die Anwesenheit solcher Kristalle ist auf der lichtmikroskopischen Aufnahme nicht erkennbar. Werden jedoch von getrockneten Kallosepräparaten in der Röntgenkammer Debye-Scherrer-Aufnahmen hergestellt (siehe Abschnitt III/5), so zeigen die Diagramme neben einigen breiten Ringen, welche der Kallose zuzuordnen sind, wenige scharf gezeichnete Punkte, die sich als Punktinterferenzen von Kalziumoxalat-monohydrat identifizieren lassen. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung (Abbildung 6)

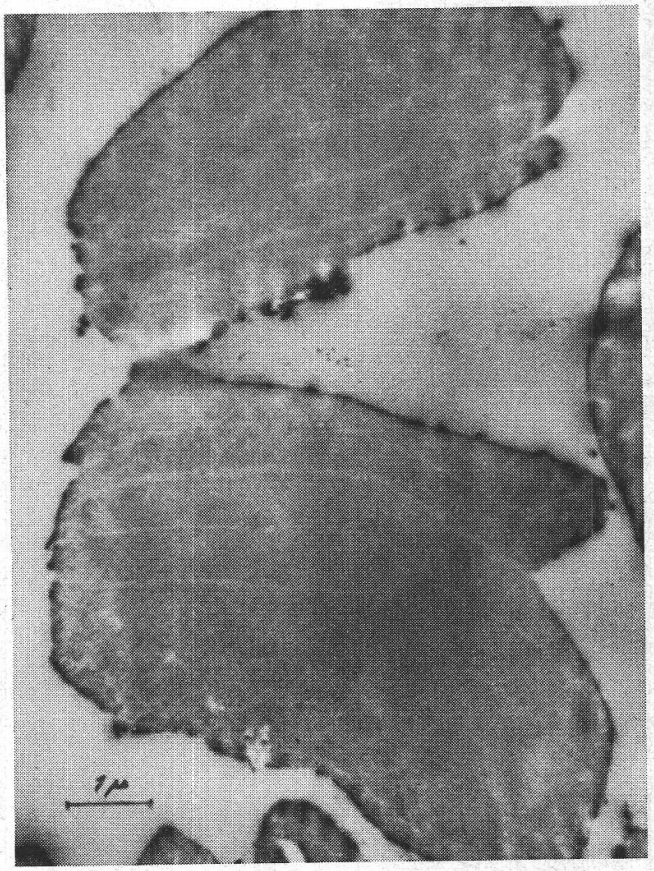


Abbildung 6
Querschnitt durch einen Kallosekörper
Elektronenmikr. Aufn.
Vergrößerung 9000×

ergibt, daß die Kallose bei der Aufarbeitung nach Methode II keine wahrnehmbaren strukturellen Veränderungen erfährt. Damit erweist sich das Material für die nachfolgenden physikalischen und chemischen Untersuchungen als brauchbar.

5. Methode III

Als dritte Variante wurde der Versuch unternommen, Kallose chemisch zu isolieren und zu reinigen. Die Entwicklung des Verfahrens basiert weitgehend auf den in Abschnitt IV/3 angeführten Ergebnissen der grundlegenden Reaktionen am Membranstoff.

10 g Trockenmaterial, aufgearbeitet nach dem in Methode II geschilderten Arbeitsprozeß, wurden zur Entfernung ungelöster Hemizellulosen

in 5-%-Natronlauge übergeführt und darin für 20 Stunden belassen. Nach Abtrennen der flüssigen Phase ließ sich aus dem mit Essigsäure neutralisierten und mit Wasser nachgewaschenen Rückstand durch Gefriertrocknung ein schwammiges Material gewinnen.

In einer nächsten Stufe wurde das Präparat nach dem Verfahren von Carson und Maclay (9) acetyliert. Die partiell substituierte Kallose geht dabei rascher in Lösung als das gleichzeitig gebildete Zellulosederivat.

Das vorbehandelte Rohmaterial wurde in kleinen Portionen in 60 ml Formamid (50° C) eingetragen. Durch Rühren des Gemisches während 60 Minuten dispergierte das Material zu einer viskosen Masse. Sodann wurden 150 ml Pyridin unter starkem Umrühren über eine Zeitdauer von 30 Minuten zugegeben, und das Gemisch wurde auf 0° C gekühlt. In stündlichen Portionen von 20 ml wurden 60 ml Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach Erhöhung der Temperatur auf 30° C wurde das Reaktionsgemisch fünf Stunden am Rührwerk belassen und über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten. Die flüssige Phase wurde vom ungelösten zellulosischen Material abgetrennt und in ein Eis-Wasser-Gemisch (1,5 l) gegossen, wobei die Kalloseester als Flocken ausfielen. Der Niederschlag wurde mit 0,1-%-Salzsäure und viermal mit Wasser gewaschen, nochmals in 1 l destilliertem Wasser suspendiert und darin 24 Stunden bei 20° C belassen. Schließlich erfolgte Filtration und Trocknung des Präparates i. V. über Phosphorpentoxyd. Ausbeute: 30 mg.

Kritische Betrachtung der Methode III: Mit dieser Methode erhält man als Endprodukt Kalloseacetat. Damit besteht ein wesentlicher Unterschied zu den beiden oben erwähnten Methoden, nach welchen wir native Kallose isolierten. Wohl läßt sich Kalloseacetat durch Verseifung in Kallose überführen; das Material kann aber nur noch für chemische Untersuchungen Verwendung finden, da während des Arbeitsprozesses die ursprünglichen physikalischen und morphologischen Eigenschaften des Membranstoffes verändert werden. Die Wahl der Methode wird damit ausschließlich von der Art der nachfolgenden Untersuchungen bestimmt. Zur Gewinnung von Ausgangsmaterial für chemische Reaktionen ist der Methode III infolge ihrer großen Leistungsfähigkeit der Vorzug zu geben. Es zeigt sich aber, daß auch bei dieser Methode die Beschaffung ansehnlicher Kallosemengen mit einem großen Arbeitsaufwand verbunden ist.

III. Einige physikalische und morphologische Eigenschaften der Kallose

1. Sorption und Quellung

Trockene Kallose ist eine außerordentlich hygroskopische Substanz. Normale Trocknung in Luft bei 105° C reicht nicht aus, um ihren gesamten

Wassergehalt zu entfernen. Eine Gewichtskonstanz des Präparates wird erst erzielt, wenn während längerer Zeit i. V. bei einer Temperatur von 60° C getrocknet wird, wobei das Phosphorpentoxyd mehrmals erneuert werden muß. Bei diesem Prozeß sintern die mikroskopischen Kallosekügelchen zu einer durchsichtigen, glasigen Masse zusammen, die an Pflanzengummi erinnert. Die Kohäsionskräfte zwischen den einzelnen Kallosebelägen sind bei vollständiger Trocknung so groß, daß das Ganze die Konsistenz eines harten Harzes annimmt.

In getrocknetem Zustand zeigt Kallose eine ausgesprochene Tendenz zur Wasseradsorption. Aus Luft, die durch Kalziumchloridanhydrid geleitet wurde und damit einen sehr kleinen Feuchtigkeitsgehalt aufweist, vermag sie innerhalb zwei bis drei Minuten 10 % ihres Eigengewichtes an Wasser aufzunehmen. Später tritt ein merklicher Abfall der Sorptionsfähigkeit ein, und die Feuchtigkeit des umgebenden Mediums muß wesentlich gesteigert werden, um eine weitere Adsorption zu bewirken. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß das Wasser von der Kallose auf verschiedene Arten eingelagert wird. In einer ersten Phase findet eine chemische Bindung der eindiffundierenden Flüssigkeit statt unter Bildung echter Hydrate. Bei der Trocknung läßt sich deshalb dieses Hydratwasser nur unter großem Energieaufwand aus dem Kallosegerüst entfernen. Nach erfolgter Hydratbildung wird das Wasser lediglich in die submikroskopischen Hohlräume des Gelgerüstes aufgenommen und bewirkt dadurch eine Quellung. Das Volumen der Membranstoffbeläge nimmt allseitig gleichmäßig zu, bis schließlich ein Endzustand erreicht wird, bei dem eine weitere Expansion des Kallosekörpers durch das Auftreten innerer Spannungen verhindert wird. Nach den Befunden von Hermans (25) steht die Fähigkeit der Wasseraufnahme in enger Korrelation mit dem Anteil amorpher Substanz in einem Objekt. Vergleichende Untersuchungen an Zellulosefasern und Kallosebelägen ergeben für letztere ein viel stärkeres Sorptionsvermögen. Diese Tatsache spricht für eine extrem amorphe Struktur der Kallose.

2. Löslichkeit

Das Verhalten der Kallose gegenüber einer Anzahl Lösungsmittel wurde untersucht. Die Beobachtungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Obwohl der Membranstoff in beschränktem Maße in vielen Lösungsmitteln quillt (Wasser, verd. Säuren, verd. Alkalien usw.), löst er sich in diesen nicht auf. Die Kräfte zwischen dem Solvens und den Kallosemolekülen vermögen die starken Kohäsionskräfte, die an gewissen Stellen des Kallosegerüstes wirksam sind, nicht zu überwinden. Es ist anzunehmen, daß die Kohäsion zwischen den Einzelmolekülen auf Wasserstoffbindungen beruht. Eine Dispersion kann deshalb nicht stattfinden ohne zusätzliche Energiezufuhr aus einer chemischen Reaktion.

Tabelle 5

Verhalten der Kallose gegenüber einer Reihe von Lösungsmitteln

	Solvens	Konzentration %	Zeit Std.	Quellung	Lösung	Verhalten bei höherer Konzentration
Organische Lösungsmittel	Alkohol, Äther, Aceton, Tetrachlorkohlenstoff, Formamid, Benzol usw.	100	∞	—	—	
Organische Säuren	Ameisensäure	100	96	+	+	
	Essigsäure	100	∞	—	—	
	Oxalsäure	konz.	12	—	—	
Anorganische Säuren	Salzsäure	0–40	12	+	—	Lösung
	Schwefelsäure	0–30	12	+	—	Lösung
	Salpetersäure	konz.	12	+	—	
	Chromsäure	konz.	12	+	+	
Karbonate	Natriumkarbonat Kaliumkarbonat	konz.	∞	—	—	
Salzlösungen	Manganchlorid	konz.	96	(+)	—	
	Zinnchlorid	0–30	12	+	—	Lösung
	Zinkchlorid	0–30	12	+	—	Lösung
	Kalziumrhodanid	konz.	12	+	—	Lösung
	Kaliumiodid	25	12	+	+	
	K-Hg-Iodid		0,1	+	+	
	Kadmiumchlorid	konz.	96	—	—	
Andere Lösungsmittel	Wasser		∞	(+)	—	
	Cuoxam		∞	(+)	—	
	Javellewasser	0–10	1	+	—	Lösung

Bis heute sind zwei Verfahren bekannt, mit denen Kallose in Lösung gebracht werden kann. Bei der indirekten Methode wird Kallose primär durch Substitution von Hydroxylgruppen in ein Derivat übergeführt, das anschließend in einem geeigneten Lösungsmittel dispergiert werden kann. Solche Substitutionsreaktionen stellen die im Abschnitt IV/3 beschriebenen Acetylierungs- und Methylierungsverfahren dar. Die Einführung von Acetyl- bzw. Methoxylgruppen in das Molekül führen zu einer Abnahme des hydrophilen Charakters. Mit fortschreitender Substitution ist Kallose schließlich in lipophilen Medien löslich.

Beim zweiten Verfahren wird der Membranstoff mit konzentrierten Mineralsäuren, konzentrierten Salzlösungen und starken Alkalien behandelt. Dabei zeigt die Kallose unbegrenzte Quellung und gleitende Übergänge in den gelösten Zustand. Trotzdem die Dispersion in einer einzelnen Operation durchgeführt werden kann, ist auch in diesem Falle eine chemische Reaktion miteingeschlossen. Entweder findet ebenfalls eine Sub-

stitution der Hydroxylgruppen statt, oder der Prozeß schließt die Bildung einer Additionsverbindung ein, die anschließend in Lösung gebracht wird.

Für Zellulose ist das Bestehen solcher Additionsverbindungen aus Arbeiten von Ekenstam (15), Katz und Derksen (28) bekannt. Sie vermochten röntgenographisch nachzuweisen, daß beim Quellen mit Salzlösungen, konzentrierten Mineralsäuren und Natronlauge neue Spektren entstehen, die neuen chemischen Verbindungen zuzuordnen sind. Die gebildeten Additionsverbindungen bleiben dabei auch in der Lösung erhalten. Obwohl für Kallose noch keine diesbezüglichen Untersuchungen vorliegen, ist anzunehmen, daß bei ihrer Lösung analoge Reaktionen beteiligt sind.

3. Brechungsindex

Die Bestimmung des Brechungsindex wurde mit Hilfe der Immersionsmethode an kallosehaltigen Phloemschnitten durchgeführt. Nach Entwässerung der Objekte durch Einlegen in Alkohollösungen steigender Konzentration erfolgte deren Überführung in Benzol. Diese Vergleichsflüssigkeit besitzt einen deutlich kleineren Brechungsindex (1,5) als die Kallose. In Nelkenöl (1,53) ist der Membranstoff nicht mehr sichtbar, während bei Verwendung von Anilin (1,58) als Imbibitionsmittel die Beckesche Linie beim Heben des Mikroskoptubus aus den Kalli herauswandert. Zur Feststellung des effektiven Brechungsindex wurde ein Anilin-Benzol-Gemisch verwendet. Versuchsreihen mit zunehmender und abnehmender optischer Dichte der Immersionsflüssigkeit ergaben für Kallose einen Brechungsindex von $1{,}532 \pm 0{,}002$. Dieser Wert stimmt mit dem kleinen Brechungsindex der anisotropen Zellulose ($n\alpha = 1{,}532$) überein und liegt wenig unter dem großen Brechungsindex der Kartoffelstärkekörner ($n\alpha = 1{,}523$, $n\gamma = 1{,}535$).

4. Dichte

Dichtebestimmungen nach dem klassischen Verfahren durch Ermittlung des Volumens und des Gewichtes konnten infolge der Kleinheit der Kallosekörper – die Beläge besitzen einen Durchmesser von etwa 10 Mikron und eine Länge von 30 bis 40 Mikron – nicht ausgeführt werden. Es wurde darum versucht, den effektiven Wert durch Ausschweben der Kalli in einer Flüssigkeit adäquater Dichte zu bestimmen. Als Medium diente wiederum wäßrige Kadmiumchloridlösung. Das nach Methode II gewonnene vorgereinigte Mazerat wurde i. V. getrocknet und zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach Aufnahme des Materials in 10 ml Kadmiumchloridlösung bekannter Dichte erfolgte ein Überführen der Suspension in die Mettler-Zentrifuge. Die Ergebnisse für Medien von der Dichte 1,60 bis 1,62 sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Ergebnisse der Dichtebestimmung

Drehzahl (pro Min.)	Zeit (Min.)	Dichte	
9000	30	1,60	Quantitative Sedimentierung der Kallose
9000	30	1,61	Sedimentierung der großen Kallosebeläge, Suspendierung der kleineren Körper
9000	30	1,62	Quantitatives Aufsteigen der Kallose

Zu diesen Resultaten ist folgendes zu sagen: Kallose ist ein poröses Gel mit Hohlräumen submikroskopischer Dimensionen. Das Resultat einer Dichtebestimmung an einem solchen Körper hängt weitgehend davon ab, bis zu welchem Grade eine Einbettungsflüssigkeit in das System eindiffundieren kann. Werden die Hohlräume nicht ausgefüllt, so fallen die Werte zu klein aus. Vermag andererseits das Imbibitionsmittel in den Körper einzudringen, findet normalerweise eine Verdichtung desselben im Gelgerüst statt (12); zudem tritt sofort Quellung ein. Der Begriff der Dichte, wie er bei der Charakterisierung kompakter Körper makroskopischen Ausmaßes verwendet wird, hat deshalb für Messungen an Membranstoffen keine absolute Gültigkeit.

Ausgehend von dieser Tatsache schlägt Hermans (25) vor, bei Dichtebestimmungen an Objekten mit submikroskopischer Lockerstruktur nur Einbettungsmittel zu verwenden, die nicht in die Feinstruktur des Körpers einzudringen vermögen, sondern ihn lediglich umhüllen. Die erhaltenen Werte geben dann Aufschluß über die Kompaktheit des untersuchten Materials, Werte, die vor allem in technischer Hinsicht von Bedeutung sind.

Für Kallose liegen erst Messungen in wässerigen Medien vor. Ihre Dichte beträgt darin etwa 1,62; sie entspricht also jener von Stärkekörnern (unter Wasser 1,61 bis 1,63) und Zellulose (Ramiefaser, Baumwolle: 1,61, beide unter Wasser).

Die Dichte von Zellstoffen kann auch von ihren Brechungsindices abgeleitet werden. Entsprechend der empirischen Regel von Gladstone und Dale stellt der Quotient $\left(\frac{n-1}{d}\right)$ einen konstanten Wert dar, von dem bei Multiplikation mit dem Molekulargewicht M (162 für Anhydroglukose) die Molekularrefraktion MR der Substanz erhalten werden kann. Von Hermans (25) wurde MR für Glukosane zu 58,26 bestimmt. Ausgehend von diesem Wert und einem Brechungsindex von 1,532 läßt sich für Kallose eine theoretische Dichte von 1,48 berechnen.

5. Röntgendiffraktion

Die röntgenographische Untersuchung erfolgte an glasigen Kallosepräparaten (siehe Trocknung der Kallose, IV/2). Aus dem Glas wurden zylindrische Körper herausgeschnitten und von denselben in der Röntgenkammer Aufnahmen auf einem ebenen Film mit Cu-K-Strahlung (Ni-Filter) hergestellt, wobei der Film-Präparat-Abstand 100 bzw. 30 mm betrug. Dabei ergaben sich einige breite Ringe neben wenigen scharf gezeichneten Punkten (20). Vermittels einer normalen Debye-Scherrer-Aufnahme auf zylindrischem Film konnte nachgewiesen werden, daß die Punktinterferenzen von Kalziumoxalat-monohydrat stammen. Die Auswertung der breiten Ringe ergab die in Tabelle 7 angeführten Werte.

Tabelle 7

Auswertung der Röntgeninterferenzen

Intensität	Ringbreite Å	Intensitätsmaximum Å
Stark	16,3–14,2	etwa 15,5
Sehr schwach		12,3
Mittel	5,3– 3,9	4,8
Mittel—schwach		4,2
Sehr schwach		2,84

Die breite Bande bei etwa 15 Å deutet darauf hin, daß in der Kallose eine wichtige Strukturidentitätsperiode etwa 15 Å beträgt. Debye-Scherrer-Aufnahmen auf zylindrischem Film von Laminaribiose, Laminaritriose und Laminaritetraose zeigen ein abweichendes Linienspektrum, trotzdem alle drei Zucker als Bausteine der Kallose identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt IV/3). Die amikroskopische Periodizität scheint daher in der Kallose anderer Art zu sein als im Kristallgitter dieser Oligozucker.

Das Kallosediagramm wird überlagert durch eine starke diffuse Schwärzung. Nach Sisson (44) geben die nichtkristallinen Regionen des Gels Ursache zur Bildung einer gestreuten Strahlung, die beim Auftreffen auf die Filmebene den diffusen Untergrund bewirkt. Leider vermögen die Röntgenuntersuchungen nur wenig zum Studium der amorphen Bezirke beizutragen. Dies ist um so bedauernswerter, als dem amorphen Bereich vom biologischen Standpunkt aus große Bedeutung zukommt. Die mechanischen Eigenschaften werden in erster Linie durch die Micellarstruktur bestimmt, während alle physiologischen Vorgänge (Permeabilität, Metabolismus usw.) hauptsächlich im intermicellaren System stattfinden.

Aus den optischen Daten kann geschlossen werden, daß im Kallosegerüst keine bevorzugte Strukturachse vorliegt. Da die Kallose ein deut-

---

Die Röntgenaufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Epprecht, Röntgenographisches Institut der ETH, Zürich, hergestellt.

liches Ringdiagramm liefert, spricht auch die Röntgenanalyse für eine regellose Anordnung der Micelle. Allerdings ist zu beachten, daß die Aufnahmen nicht von einzelnen Membranstoffkügelchen, sondern von einem Kalloseagglomerat hergestellt wurden. Ein Ringdiagramm könnte in diesem Falle auch entstehen, wenn die räumliche Anordnung der Kristallite eine solche höherer Ordnung wäre. Das optische Verhalten schließt jedoch das Bestehen einer bevorzugten Richtung aus.

6. Morphologie und Feinbau

Wie im Abschnitt II/1 gezeigt wurde, zeichnet sich das Phloem zur Zeit der Winterruhe durch die Anwesenheit großer Kallusbeläge aus. Die Membranstoffablagerungen überdecken die Siebfelder beidseitig als Halbkugeln, wobei oft die Masse der transitorischen Kallose der individuellen Siebfelder zusammenfließen und die Zellulosestege zwischen den einzelnen Feldern überdecken. Der Kallus zeigt dabei eine Schichtung parallel zur Oberfläche der Siebfelder. Im Lichtmikroskop läßt sich das Vorhandensein solcher Schichten nur nach spezieller Vorbehandlung des Materials, z. B. durch Einlegen in Tetrachlorkohlenstoff-Alkohol-Gemischen, erkennen; im Elektronenmikroskop ist die Schichtstruktur auch ohne Vorbehandlung gut sichtbar.

Aufarbeitung der Kallose für eine elektronenmikroskopische Untersuchung: Kallosepolster, isoliert und gereinigt nach Methode II, wurden durch Einlegen in Alkohollösungen steigender Konzentration entwässert und in Gelatinekapseln in Butyl-metakrylat mit 1 % Beschleuniger (Dibutylphthalat) eingeschlossen. Das Einbettungsmittel polymerisierte bei 45° C über Nacht. Nach Ablösen der Gelatine in kaltem Wasser wurden die Blöcke mit einem Glasmesser im Sjöstrand-Ultramikrotom zu Schnitten von 300 Å Dicke verarbeitet. Die Schnitte wurden in 20-%-Äthanol gestreckt, auf Trägernetze mit Formvar-Folien aufgefangen und im Elektronenmikroskop ohne vorherige Weglösung des Metakrylates untersucht.

Abbildung 6 zeigt einen Kallusquerschnitt. Durch die vorangegangene Mazeration sind die übrigen Bestandteile des Siebfeldes weggelöst worden. Die Verbindung zwischen den beiden Halbkugeln wird nur noch durch einzelne Kalluspfropfen hergestellt, welche ehemals die Siebporen ausfüllten. An der Oberfläche des Membranstoffkörpers läßt sich eine feine, dunkelgefärbte Membran erkennen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich dabei um Reste der kallosebildenden Grenzlamelle des Protoplasten handelt. Durch Quellung wird die Membran lokal aufgerissen, und die Kalloseschichten blättern entlang den hellen Trennungslinien auf.

Die Kallose wird in der Literatur bisweilen in die Gruppe der Schleime eingereiht (21, 30). Dies ist nur insofern berechtigt, als einzelne Pflanzenschleime wie Kallose in Schweizer-Reagens unlöslich sind. Im übrigen besitzt aber der Membranstoff einen ganz anderen chemischen Charakter. Auch haben elektronenmikroskopische Untersuchungen von Mühletaler (35) gezeigt, daß viele Pflanzenschleime eine Struktur aufweisen

(Zelluloseschleime). Siebröhrenkallose ist jedoch eine völlig homogene Substanz. Bauelemente submikroskopischer Größenordnung sind nicht zu erkennen. Amorph erweist sich auch die von Mühletaler und Linskens (36) elektronenmikroskopisch analysierte Pollenschlauchkallose. Es ist darum anzunehmen, daß das Kallosegel kein micellares Gel mit submikroskopischen Bausteinen, sondern ein Gel mit einem amikroskopischen, dreidimensionalen Molekulargerüst vorstellt.

IV. Chemische Untersuchungen an der Kallose

1. Einleitung

Polysaccharide sind komplexe Verbindungen, die durch Kondensation von Monosacchariden und ihren Derivaten (Methylzucker, Zuckerphosphate usw.) entstehen. Um das chemische Verhalten solcher polymerer Körper zu verstehen, ist es wichtig, Aufschluß über folgende Fragen zu erhalten:

1. Grundbausteine, aus denen das Makromolekül besteht.
2. Prozentualer Anteil der verschiedenen Grundbausteine.
3. Bauprinzip des Makromoleküls.
4. Länge des Makromoleküls.

Die zu diesem Zwecke an der Kallose durchgeführten Grundreaktionen seien nachstehend aufgezählt und deren Bedeutung kurz erläutert:

1. Vollständige Hydrolyse mit Mineralsäuren: Abbau der Kallose in ihre Grundbausteine.
2. Partielle Hydrolyse mit Mineralsäuren, Acetolyse: Abbau der Kallose in Bauelemente oligomeren Charakters.
3. Enzymatische Hydrolyse: Abbau der Kallose in Mono- und Oligosaccharide. Infolge der spezifischen Wirkung des Enzyms kann zugleich auf die Art der glykosidischen Bindung (α oder β) geschlossen werden.
4. Methylierung: Die Methylierung entspricht einer Substitution der freien OH-Gruppen der individuellen Kettenglieder durch Methoxylgruppen. Nicht ergriffen werden von dieser Reaktion die an der glykosidischen Bindung beteiligten Hydroxylgruppen. Sie werden durch eine Hydrolyse der Methylkallose freigelegt, und durch Bestimmung ihrer Lage im Ring der einzelnen Kettenglieder lassen sich die an der glykosidischen Bindung beteiligten Kohlenstoffatome ermitteln.

Die Aufnahme im Elektronenmikroskop wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Mühletaler, Laboratorium für Elektronenmikroskopie am Institut für Allgemeine Botanik der ETH, Zürich, hergestellt.

5. Periodat-Oxydation: Diese Reaktion gibt, gleich wie die Methylierung, Aufschluß über die an der Polymerisation beteiligten Kohlenstoffatome der einzelnen Bauelemente. Im Falle der Kallose kann die Periodat-Oxydation noch zur Bestimmung der mittleren Kettenlänge des Makromoleküls herangezogen werden.

2. Allgemeine Methoden

A. Trocknen der Kallosepräparate

Für alle Versuche wurden die nach Methode II gewonnenen Kallosepräparate bei 60° C über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Einwägen des Materials erfolgte in speziell hergestellten Wägeröhrchen mit Schliff.

B. Papierchromatographie

Qualitative Trennung: Die Fraktionierung von Zuckergemischen erfolgte mit den in Tabelle 8 wiedergegebenen Trennlösungen. Für die qualitativen Untersuchungen diente ausschließlich Papier Whatman Nr. 1. Die Auftrennung größerer Zuckermengen wurde auf Papier Whatman Nr. 3MM vorgenommen.

Tabelle 8

Zusammenstellung der verwendeten Lösungsmittel

Lösungsmittel	Zusammensetzung	%-Anteile
I	*n*-Butanol-Eisessig-Wasser	4:1:5
II	Äthylacetat-Essigsäure-Ameisensäure	18:3:1
III	*n*-Butanol-Äthanol-Wasser	4:1:5
IV	*n*-Butanol-Pyridin-Benzol-Wasser	5:3:1:5
V	Äthylacetat-Pyridin-Wasser	10:4:3
VI	Methyl-äthyl-keton	

ad I. Partielle Veresterung der Essigsäure mit Butanol durch zweistündiges Kochen des Gemisches am Rückflußkühler und Aufnahme des dabei ausgefallenen Wassers mit wenig Essigsäure vermag die Qualität des Gemisches wesentlich zu erhöhen.

ad VI. Wassergesättigtes Methyläthylketon wird mit einem gleichen Teil wasserfreiem Keton vereinigt und dem Gemisch 1 % konz. Ammoniak beigegeben. Das Lösungsmittel eignet sich vorzüglich für die Trennung methylierter Zucker.

Als Sprühreagenzien wurden verwendet: Anilin-Oxalsäure als Universalentwickler von Oligosacchariden, Aldo- und Ketohexosen, Pentosen und Uronsäuren; Triphenyltetrazoliumchlorid zur Entwicklung von reduzierenden Zuckern; Resorcin-Salzsäure als reines Ketosereagens; ammoniakalisches Silbernitrat für den Nachweis von Uronsäuren.

Quantitative Auswertung von Chromatogrammen: Als grobes Maß für die Zuckermengen dienten ihre Fleckengrößen in Chromatogrammen.

Obwohl mit einem Fehler von über 10 % behaftet, liefert dieses Vorgehen in vielen Fällen aufschlußreiche Ergebnisse.

Mikro-Bestimmungen wurden nach der Methode von Pridham (42) vorgenommen. Aldopentosen, Aldohexosen und Hexuronsäuren geben nach dem Besprühen mit einer *p*-Anisidin-Salzsäure-Lösung in der Hitze einen Farbkomplex. Die Farbflecke werden ausgeschnitten, der Zucker-*p*-Anisidin-Komplex mit wäßrigem Methanol, welches 1 % Zinnchlorid enthält, aus dem Papier ausgewaschen und die Absorption der Farblösung in einem Spektrophotometer bei einer spezifischen Wellenlänge (Aldohexosen = 400 mμ, Aldopentosen und Hexuronsäuren = 510 mμ) gemessen. Die Absorptionen des Zucker-*p*-Anisidin-Komplex sind über einen Bereich von 5 bis 50 γ direkt proportional dem Zuckergewicht.

3. Reaktionen zur Konstitutionsaufklärung

Hydrolyse der Kallose. 5,45 mg Kallose wurden mit 1 ml 4 *n* Schwefelsäure in einer Ampulle während 210 Minuten bei 100° C hydrolysiert. Anschließend wurde das Hydrolysat mit Bariumkarbonat neutralisiert, durch Zentrifugierung geklärt und i. V. zu einem Sirup eingedickt. Die Analyse der Spaltprodukte lieferte mit Hilfe der papierchromatographischen Technik (I, II, IV) einen einzigen Flecken, der sich als *D*-Glukose identifizieren ließ.

In einem zweiten Ansatz wurden die Versuchsbedingungen dahin abgeändert, daß 3,85 mg Kallose nur noch während 150 Minuten hydrolisiert wurden. Dadurch traten im Hydrolysat neben Glukose auch kleine Mengen Laminaribiose auf.

Anmerkung: Später wurde das Hydrolysat zur quantitativen Entfernung aller vorhandenen Ionen zusätzlich an Ionenaustauschsäulen (Amberlite IR 100, IR 4B) gereinigt. Das Eluat enthielt nun neben Laminaribiose und Glukose als weitere Komponente Mannose, deren Anteil kolorimetrisch zu 3,4 % bestimmt wurde. Kleine Mannosemengen konnten ferner bei der Neutralisation eines Hydrolysates mit Dowex-3-Harz beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß die nachgewiesene Mannose keinen Kallosebestandteil darstellt. Vielmehr handelt es sich um ein Epimerisationsprodukt der Glukose, wobei das alkalische Milieu des Ionenaustauschers die Umwandlung katalytisch förderte.

Acetolyse der Kallose (14,52). 10 mg Kallose wurden in eine auf 0° C gekühlte Mischung von Essigsäureanhydrid (0,72 ml), Essigsäure (0,42 ml) und konz. Schwefelsäure (0,1 ml) eingetragen und während 90 Stunden bei Zimmertemperatur am Vibrator belassen. Die klare gelbe Lösung wurde anschließend durch ein Glasfilter G3 gesogen, das Filtrat langsam unter starkem Umrühren in 20 ml Eiswasser gegossen und die Lösung mit Natriumbikarbonat auf Kongorot neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 2° C stehen gelassen, der entstandene Nieder-

schlag durch Filtration von der Reaktionsflüssigkeit abgetrennt und mit Wasser mehrmals nachgewaschen. Das Trocknen des Acetates erfolgte i. V. über Phosphorpentoxyd.

Deacetylierung der Acetolyseprodukte (51). Das Acetolysepräparat wurde in 10 ml trockenem Methanol eingeführt und auf 0° C gekühlt. Sodann wurden der Lösung 10 Tropfen 0,42 *n* Bariummethoxyd beigefügt, und das Ganze wurde während 48 Stunden in der Kälte belassen. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren von der Lösung abgetrennt, in Wasser gelöst und das vorhandene Ionen-Material an Amberlite-Säulen (IR 100, IR 4B) adsorbiert. Die papierchromatographische Analyse (I, IV, V) der freien Zucker zeigte Glukose und Laminaribiose als Abbauprodukte der Kallose.

Methylierung der Kallose. 78 mg Kallose wurden zwölfmal mit Dimethylsulfat (5 ml) und 40-%-Natriumhydroxyd (7 ml) unter Stickstoff bei Zimmertemperatur methyliert. Nach der vierten Methylierung erfolgte eine Zugabe von Aceton zum Reaktionsgemisch zur Verhinderung einer Ausfällung der partiell methylierten Kallose. Das Methylierungsprodukt wurde mit Chloroform isoliert, mit wasserfreiem Natriumsulfat behandelt und durch Zugabe von Petroläther als weißes Pulver gefällt. Die Trocknung des Niederschlages erfolgte i. V. über Phosphorpentoxyd und Paraffin. Ausbeute: 18 mg

$$[\alpha]_D^{20} = +\ 37{,}5^\circ \text{ (Chloroform)}$$

Anmerkung: Nach der sechsten Methylierung erfolgte eine Isolierung der untermethylierten Kallose zur Bestimmung des vorläufigen Methoxylgehaltes. Das mit Chloroform isolierte und von Natriumsalzen gereinigte Produkt wurde zu diesem Zwecke in einem Überschuß von Chloroform gelöst und auf eine Glasplatte ausgegossen. Nach der Trocknung ließ sich die Methylkallose als feiner Film von der Unterlage abziehen. Methoxylgehalt: 35 %.

Auf eine Bestimmung des Methoxylgehaltes des Schlußproduktes mußte in Anbetracht der geringen Ausbeute verzichtet werden.

Hydrolyse der Methylkallose. Die methylierte Kallose war in verdünnter Salzsäure unlöslich. Deshalb wurde das Präparat mit 1-%-methanolischer Salzsäure bei 100° C erhitzt bis zu konstant bleibender optischer Drehung der Lösung im Polarimeter. Anschließend erfolgte ein Ersetzen der methanolischen Salzsäure durch 1-%-wäßrige Salzsäure, und die Methylglykoside konnten durch dreistündiges Kochen auf dem Wasserbad in die entsprechenden Methylzucker übergeführt werden. Die Neutralisation der Reaktionslösung erfolgte mit Silberkarbonat. Das kolloidal gelöste Silber ließ sich durch Einleiten von Schwefelwasserstoff als Silbersulfid aus der Lösung fällen. Sodann wurde mit Amberlite IR 4B neutralisiert und das Hydrolysat zu einem gelblichen Sirup eingedampft. Die letzten Silberreste wurden durch mehrmalige Aufnahme des Sirups in

Aceton und anschließende Abdestillation des Lösungsmittels quantitativ gefällt und durch Filtration entfernt.

Trennung der methylierten Zucker und Charakterisierung der Fraktionen. Das sirupartige Hydrolysat wurde auf dickes, mit Alkohol-Benzol gereinigtes Papier Whatman 3MM aufgetragen und mit Trennlösung III in drei Fraktionen aufgetrennt. Das Eluieren der einzelnen Fraktionen aus dem Papier erfolgte mit heißem Methanol.

Fraktion I: Der Sirup wurde papierchromatographisch als 2:4:6-Tri-O-methyl-D-glukose identifiziert (III, VI). Diese Hauptfraktion, welche ungefähr 90% des Hydrolysates umfaßte, wurde in wenigen Tropfen trockenem Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von trockenem Äther und mehrtägiges Stehenlassen in der Kälte konnte schließlich ein feinnadeliges kristallines Produkt erhalten werden, das nach zweimaliger Rekristallisation aus Äther einen Schmelzpunkt von 112° bis 115° aufwies. Kristalle synthetisch hergestellter 2:4:6-Tri-O-methyl-D-glukose schmolzen bei 114° bis 117° C. Das Gemisch der beiden Produkte zeigte keine Schmelzpunkterniedrigung.

In der Röntgenkammer wurden sodann von der aus der Methylkallose gewonnenen Trimethylglukose und vom synthetisch hergestellten Material Debye-Scherrer-Aufnahmen auf zylindrischem Film hergestellt. Der Vergleich der Interferenzlinien zeigte Identität der beiden Produkte.

Fraktion II: Der Sirup (ca. 10% des Hydrolysates) wurde papierchromatographisch analysiert (III) und als ein Gemisch von 2:6- und 4:6-Di-O-methyl-D-glukose identifiziert. Infolge der Kleinheit der Fraktion war es nicht möglich, die Einzelkomponenten weiter zu charakterisieren.

Fraktion III: Das Chromatogramm der äußerst kleinen Fraktion zeigte die Anwesenheit von zwei Komponenten, welche nicht eindeutig identifiziert werden konnten (I, III, IV). Die schneller laufende Substanz wies einen Rf-Wert auf, der um 2% kleiner als derjenige von 2:3:4-Tri-O-methyl-D-glukuronsäure ausfiel. Die andere Komponente zeigte gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Xylose. Hufeisenform und Rosafärbung der Flecke bei der Entwicklung mit Anilin-Oxalsäure ließen auf Uronsäurederivate verschiedenen Methylierungsgrades schließen.

Uronsäurebestimmung an der Kallose. 6,9 mg Kallose wurden mit 0,5 ml 2 *n* methanolischer Salzsäure in eine Ampulle eingeführt und während 72 Stunden auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert. Dieser Prozeß führte zu einer vollständigen Depolymerisation der Kallose. In einer zweiten Methanolyse (30 Minuten, 0,5 ml 1-%-methanolische Salzsäure) erfolgte eine vollständige Überführung der Abbauprodukte in die ent-

sprechenden Methylglykoside unter gleichzeitiger Veresterung der anwesenden Säuregruppen. Sodann wurde dem Reaktionsgemisch nach Entfernung der methanolischen Salzsäure 3 ml Wasser zugegeben und der Uronsäuregehalt des Präparates nach der Methode von Kaye und Kent (29) bestimmt.

Zu diesem Zwecke wurde die Lösung mit 2 ml frisch zubereiteter Hydroxylaminlösung (hergestellt aus 2 *m* Hydroxylamin-Salzsäure und einem gleichen Volumen 3,5 *m* Natronlauge) versetzt. Nach vier Minuten erfolgte eine Zugabe von 1 ml Salzsäure (3,34 *m*) und 1 ml Ferrichlorid (0,37 *m*, in 0,1 *m* Salzsäure). Die daraus resultierende orange-braune Farblösung wurde zur Entfernung der gebildeten Gase während 30 Sekunden am Vakuum geschüttelt und deren Absorption bei 505 mμ in einem Unicam-Spektrophotometer bestimmt. Die Auswertung erfolgte vermittels einer gleichzeitig aufgenommenen Testkurve für Glukuron (korrigiert für die Aldehydgruppe). Sie lieferte für das Kallosepräparat 0,74 Mol Glukuron, was einem Uronsäuregehalt von 1,9 % entspricht.

Messung der optischen Drehung der Kallose. Die Messung der optischen Drehung der Kallose wurde infolge Fehlens eines geeigneteren Lösungsmittels in reiner Ameisensäure vorgenommen. 9,69 mg Kallose wurden in eine Ampulle eingetragen, mit 0,5 ml frisch destillierter Ameisensäure überdeckt und die Ampulle während 48 Stunden am Vibrator belassen. Nach dieser Zeit waren 8,03 mg Kallose in Lösung gegangen.

Drehwert der säurelöslichen Fraktion: $[\alpha]_D^{20} = +31^\circ$

Laminarin in reiner Ameisensäure: $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$

Oxydation der Kallose. Die Oxydation der Kallose erfolgte mit Kaliummetaperiodat (22). 5,41 mg Kallose wurden in eine Ampulle eingebracht und mit 1 ml Wasser überdeckt. Durch Schütteln während 20 Stunden wurde das Kallosepräparat vollständig suspendiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 5 ml 1,2 *m* wäßrigem Kalium-metaperiodat. Die Ampulle wurde sodann unter ständigem Schütteln in der Dunkelheit bei 20° C inkubiert. Der Verlauf der Oxydation ließ sich spektrophotometrisch nach dem Verfahren von Ferrier (18a) kontrollieren. Dazu wurden dem Reaktionsgemisch in Intervallen 0,6 ml Suspension mit einer speziell gebauten Mikropipette (engl. = microsyringe) entnommen, die Kallose abzentrifugiert und von der geklärten Lösung die Absorption im Unicam-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 223 mμ bestimmt.

Zu Vergleichszwecken wurden gleichzeitig 6,44 mg Stärke in 1 ml Wasser suspendiert und mit 5 ml Kalium-metaperiodat-Lösung unter gleichen Reaktionsbedingungen oxydiert.

Tabelle 9

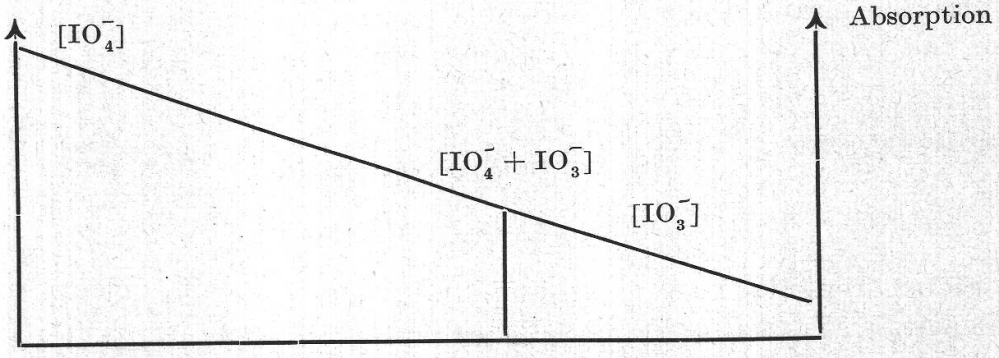
Periodatverbrauch, in Mol pro Anhydroglukose-Einheit

Material	Temperatur	Oxydationszeit (Std.)		
		144	215	307
Kallose	20°	0,0295	0,0322	0,0518
Stärke	20°	0,993	1,02	1,05

Anmerkung: Das unveröffentlichte Verfahren der spektrophotometrischen Kontrolle des Oxydationsverlaufes wurde an der Abteilung für Chemie, Universität Edinburgh, von J. R. Ferrier entwickelt.

Abbildung 7

Schematische Darstellung von IO_4^- und IO_3^- Absorption bei 223 mμ



Periodat- und Iodatlösungen zeigen bei 223 mμ eine spezifische Absorption, deren Wert linear von der Konzentration der Lösung abhängig ist. Wird in einer Lösung Periodat teilweise durch Iodat ersetzt, so zeigt das Gemisch eine Abnahme des Absorptionswertes, die proportional der Konzentrationsverminderung des Periodates ist.

Im Verlauf der Oxydation der Kallose wird das im Reaktionsgemisch vorhandene Periodat teilweise zu Iodat reduziert. Aus der Absorptionsabnahme der Reaktionslösung kann damit der Periodatverbrauch quantitativ bestimmt werden.

Enzymatischer Abbau der Kallose. 3 mg Kallose wurden in einen Kolben (5 ml) eingebracht und mit 0,5 ml Wasser zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Nach Zugabe von 1 ml 0,1 *n* Acetat-Pufferlösung (*p*H 5) und 10 mg Emulsinpräparat wurde das Reaktionsgemisch bei 36° C inkubiert. In Intervallen von 24 Stunden erfolgte eine Probeentnahme zur papierchromatographischen Analyse (IV, V) der entstandenen Abbauprodukte.

Resultat:	Inkubationszeit	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
	Abbauprodukte	Glukose/ Laminaribiose	Glukose	Glukose

Anmerkung: Das verwendete Emulsinpräparat wurde in den Laboratorien der Abteilung für Chemie, Universität Edinburgh, hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Testversuche an Stärke zeigten mit Hilfe der kolorimetrischen Methode von Somogyi (45) und Nelson (37) nur eine schwache α-Aktivität des Enzympräparates.

Analyse der nach Methode III gewonnenen Kalloseacetate

Filmbildung: Zur Prüfung der Filmbildung wurde ein Teil des Acetates in einem Überschuß von Chloroform gelöst und die Lösung auf eine trockene Glasplatte ausgegossen. Nach der Trocknung des Präparates ließ sich das Kalloseacetat als dünne Folie von der Unterlage abheben.

Hydrolyse der Acetate: 15 mg Acetatmaterial wurden während vier Stunden in einer Ampulle mit reiner Ameisensäure auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Entfernung der Ameisensäure wurden die Formylester in 2 *n* Schwefelsäure aufgenommen. Ein Teil des Materials fiel dabei als Flocken aus. Die säureunlösliche Fraktion wurde abgetrennt und nicht mehr weiterverarbeitet. Die in Lösung gegangenen Ester wurden während 45 Minuten auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert und das Reaktionsgemisch mit Bariumkarbonat neutralisiert. Mit Hilfe der papierchromatographischen Technik (I, IV, V) konnten Glukose, Laminaribiose und Laminaritriose als Abbauprodukte nachgewiesen werden.

V. Schlußfolgerungen

1. Molekulares Modell

Siebröhrenkallose ist ein Kohlehydrat, bestehend aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. Durch vollständige Hydrolyse mit Mineralsäuren kann sie quantitativ zu Glukose abgebaut werden. Andere Monosaccharide sind an ihrem Aufbau nicht beteiligt. Damit stellen die vorliegenden Resultate eine Bestätigung der Aussagen von Mangin (31) und Eschrich (18) dar, daß die verschiedenen Kallosemodifikationen reine Glukosane sind.

Bei der Anwendung schwächerer Säurekonzentrationen oder durch Verkürzung der Hydrolysezeit tritt Laminaribiose als intermediäres Abbauprodukt auf. Diese Substanz wurde zum erstenmal von Barry (4) bei der partiellen Hydrolyse des Polysaccharides Laminarin gewonnen und durch Arbeiten von Connel, Hirst und Percival (11), Bächli und Percival (3) als reduzierende Diglukose identifiziert, in welcher die Glukosereste durch β-1:3-Bindung miteinander vereinigt sind. Das Disaccharid stellt kein Reversionsprodukt dar, das unter den angewandten Hydrolysebedingungen durch Vereinigung zweier Glukose-Einheiten entstanden sein könnte, denn bei verlängerter Säureeinwirkung weist das Hydrolysat infolge vollständiger Spaltung der intermediär auftretenden Laminaribiose nur noch Glukose auf.

Durch Acetylierung und partielle Hydrolyse (Acetolyse) läßt sich Kallose in ein Gemisch von Acetaten niedereren Molekulargewichtes überführen, aus denen durch Deacetylierung Glukose, Laminaribiose und Laminaritriose gewonnen werden können. Das Triglukosid Laminaritriose,

welches den gleichen Bindungstypus wie Laminaribiose besitzt, kann demzufolge als weitere konstitutionelle Einheit der Kallose in Betracht gezogen werden.

Die Hydrolyse methylierter Kallose liefert als Hauptprodukt 2:4:6-Tri-O-methyl-D-glukose. Das weist darauf hin, daß in der Kallose das C-Atom 1 einer Anhydroglukose mit dem C-Atom 3 einer zweiten Anhydroglukoseeinheit verbunden ist. Im Hydrolysat findet sich neben 2:4:6-Trimethylglukose auch ein Gemisch von 2:4- und 2:6-Dimethylglukose (ca. 10%). Infolge der ausgesprochen leichten Demethylierung der 2:4:6-Trimethylglukose ist es jedoch zweifelhaft, ob diesen beiden Komponenten irgendwelche strukturelle Bedeutung zukommt. Hydrolytische Spaltung von methyliertem Laminarin, einem unverzweigten β-1:3-Glukosan, liefert nach Barry (5, 6) ebenfalls 10% Dimethylglukose. Unter Anwendung gleicher Hydrolysebedingungen gibt auch reine 2:4:6-Trimethylglukose ein Gemisch von Dimethylglukosen in einer Ausbeute von 8%.

Die 1:3-Bindung in der Kallose bestätigt sich ferner aus dem Verhalten des Polysaccharides gegenüber Kalium-metaperiodat. Periodat (38) reagiert mit der Gruppe –CHOH–CHOH–, indem die Kohlenstoffbindung gespalten wird unter gleichzeitiger Oxydierung der Hydroxylgruppen zu Aldehyden. Alle Polysaccharide, deren Bindung der Glukose-Einheiten vom Typus 1:2, 1:4 oder 1:6 ist, enthalten 1,2-Dihydroxyverbindungen. Wenn jedoch das Kohlenstoffatom 3 an der Verkettung der Glukosereste beteiligt ist, steht kein Paar benachbarter –CHOH–Gruppen zur Verfügung, und solch ein Polysaccharid kann von Periodat nicht angegriffen werden. Kallose geht nun mit dem Oxydationsmittel Periodat keine Reaktion ein. Ihre Glukose-Einheiten müssen daher in Stellung 1 und 3 miteinander verbunden sein.

Für einen β-glukosidischen Charakter der Bindung spricht neben dem Auftreten von Laminaribiose und Laminaritriose als Abbauprodukte auch die Tatsache, daß Kallose mit Emulsin hydrolysiert werden kann. Testversuche mit Stärke zeigen zwar eine leichte α-Aktivität des verwendeten Fermentpräparates. Nach Schmidt (43) wird aber Kallose von α-spezifischen Enzymen nicht angegriffen. Das nur schwach positive Drehvermögen der Kallose kann als weiterer Hinweis für das Vorherrschen der β-glukosidischen Bindung angeführt werden. Kallose und Laminarin besitzen eine spezifische Drehung gleicher Größenordnung.

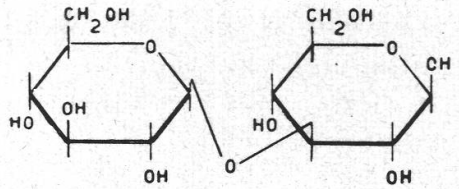
Kallose: $[\alpha]_D^{20} = +31^\circ$ (Ameisensäure)

Laminarin: $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ (Ameisensäure)

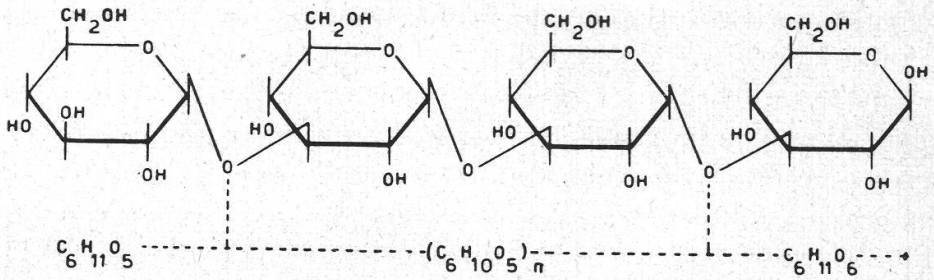
Auf Grund dieser Ergebnisse kann für Kallose die in Tabelle 10 wiedergegebene Konstitutionsformel postuliert werden. Das Kettenmolekül besteht aus Anhydroglukose-Einheiten, welche durch die C-Atome 1 und

3 β-glukosidisch miteinander verbunden sind. Jede Anhydroglukose-Einheit in der Kallose besitzt drei unsubstituierte Hydroxylgruppen. Zwei dieser Gruppen sind sekundäre Alkoholgruppen an den C-Atomen 2 und 4 in der Glukose, während die dritte primär ist und sich in Stellung 6 befindet. Die beiden Endglieder unterscheiden sich von allen übrigen Kettengliedern durch den Besitz von vier anstatt drei Hydroxylgruppen. Der Ring auf der rechten Seite der Figur ist überdies durch seinen Aldehyd-Charakter ausgezeichnet und muß reduzierende Eigenschaften besitzen.

Durch erschöpfende Methylierung der Kallose können die vier freien Hydroxylgruppen der nicht reduzierenden Endgruppe in die entspre-



LAMINARIBIOSE



KALLOSE

Tabelle 10
Konstitutionsformel der Kallose

chenden Methyläther übergeführt werden und müssen bei der hydrolytischen Spaltung als Tetramethylglukose nachweisbar sein. Das Chromatogramm des Hydrolysates methylierter Kallose zeigt jedoch keine solche Komponente. Ihr Fehlen ist ein möglicher Hinweis, daß die Glukose-Einheiten nicht in gestreckter Kettenform vorliegen, sondern daß das Kallosemolekül durch Vereinigung der Endgruppen einen in sich geschlossenen Ring darstellt. Die Abwesenheit von Tetramethylglukose kann aber auch aus dem angewandten Methylierungsverfahren abgeleitet werden. Nach Hess und Neumann (26) gibt Zellulose, welche in Stickstoffatmosphäre methyliert wurde, bei der Hydrolyse ebenfalls keine Tetramethylglukose. Wird aber die Reaktion in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt, so

erscheint Tetramethylglukose unter den hydrolytischen Spaltprodukten. Die Annahme einer Ringstruktur für die Kallose ist demzufolge nicht zwingend. Gegen einen zyklischen Bau des Moleküls sprechen ferner die Ergebnisse der Periodatoxydation. Da die Anhydroglukose-Reste quantitativ durch 1 bis 3 Bindungen miteinander verkettet sind und damit vom Oxydationsmittel nicht angegriffen werden können, läßt sich ein Periodatverbrauch nur beim Vorhandensein von Endgruppen nachweisen, weil sie die einzigen Glieder darstellen, in denen 1,2-Dihydroxy- oder α-Hydroxyaldehyd-Verbindungen vorhanden sind. Die Periodataufnahme von Kallose ist, verglichen mit derjenigen von Stärke, sehr klein. Dennoch findet ein deutlich meßbarer Verbrauch des Oxydations-

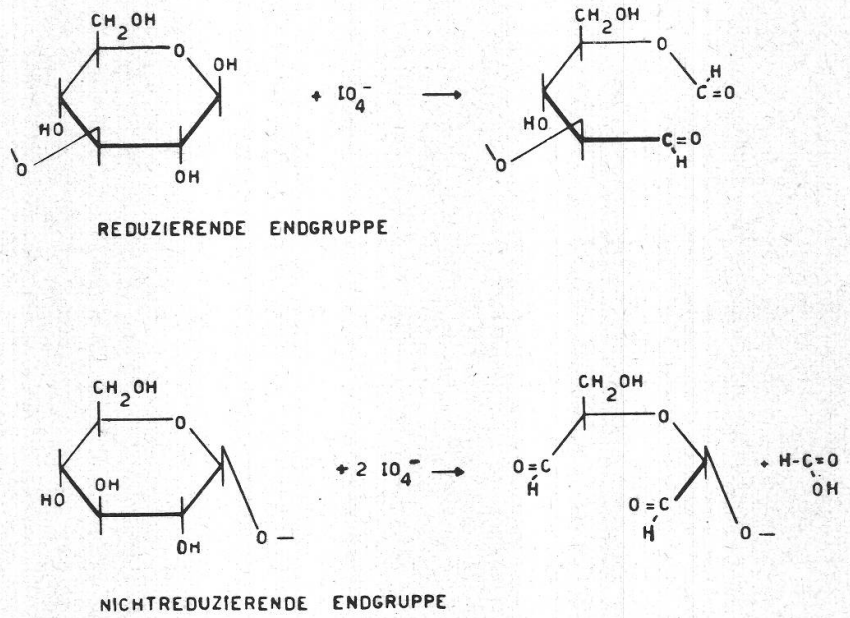


Tabelle 11
Oxydationsverlauf der Endgruppen

mittels statt. In der Zeit, in welcher der Periodatkonsum der Stärke den theoretischen Wert von 1,03 Mol pro Anhydroglukose erreicht, zeigt die Kallose eine Aufnahme von nur 0,032 Mol, wobei dieser Verbrauch ausschließlich den Endgruppen zuzuschreiben ist.

Bei der Postulierung eines geraden Kettenmoleküls kann der ermittelte Wert zugleich ein Maß für den Anteil an Terminalgruppen darstellen und damit Aufschluß geben über den Polymerisationsgrad des Kallosemoleküls. Tabelle 11 veranschaulicht den Oxydationsverlauf der beiden Endgruppen. Die nichtreduzierende Gruppe vermag zwei Einheiten Periodat aufzunehmen, das reduzierende Ende setzt sich mit einer Einheit Periodat um. Demzufolge müssen im Kettenmolekül ungefähr 90 Anhydroglukosereste zwischen den Endgruppen eingeschaltet sein, um den gemessenen Verbrauch von 0,032 Mol zu rechtfertigen (berechnet pro Mol

Tabelle 12

Strukturelle Daten von Glukosanen

Glukosan	Monosaccharid	Disaccharid	Bindungstypus	Form des Kettenmoleküls	Polymerisationsgrad	Löslichkeit in heißem Wasser	Röntgenanalyse	Iodfärbung	$[\alpha]_D^{20}$	Literatur
Kallose	Glukose	Laminaribiose	β—1:3	gerade	≥ 90	—	andeutungsweise krist.	gelb	+31° (HCOOH)	
Laminarin	Glukose	Laminaribiose	β—1:3	gerade	ca. 20	+			+16° (HCOOH)	4/5/6 11/40
Lichenin	Glukose		β—1:3 β—1:4	gerade	ca. 300	+			+6° (2 *n* NaOH)	10/27 34
Hefeglukan	Glukose		β—1:3 β—1:2							7/24 47
Zellulose	Glukose	Zellobiose	β—1:4	gerade	> 2000	—	sehr gut krist.			41/46
Amylose	Glukose	Maltose	α—1:4	gerade	≤ 300	+	gut krist.	blau	+201°	32/41
Amylopektin	Glukose	Maltose	α—1:4 α—1:6 α—1:3	verzweigt	≥ 1300	+	amorph	rotviolett	+201°	41

Anhydroglukose). Allerdings ist zu beachten, daß die Zeit, welche für die Aufnahme der theoretischen Periodatmenge benötigt wird, für jedes Polysaccharid empirisch bestimmt werden muß. Im vorliegenden Versuch wurde infolge Fehlens anderer Unterlagen die gleiche Oxydationszeit wie für Stärke angenommen. Deshalb kommt dem für die Kallose ermittelten Polymerisationsgrad keine absolute Bedeutung zu, er stellt vielmehr einen Näherungswert dar und muß durch andere Methoden der Polymerisationsgradbestimmung bestätigt werden.

Das Modell einer verzweigten Kettenstruktur, wie es von Meyer (33) für Amylopektin postuliert wird, fällt für Kallose außer Betracht. Bei der Anwendung gleicher Methylierungsbedingungen wie im Kalloseversuch enthält das Hydrolysat von Amylopektin einen deutlichen Anteil an Tetramethylglukose. Amylopektin-Triacetat zeichnet sich weiterhin durch die Bildung schwacher, spröder Filme aus, ein Charakteristikum, welches nach Whistler und Hilbert (48) der verzweigten Molekularkonfiguration des Polysaccharides zugeschrieben werden kann. Acetylierte Kallose läßt sich dagegen zu hochwertigen faltbaren Filmen verarbeiten und zeigt somit das gleiche Verhalten wie Zellulose- und Amylose-Triacetat, deren unverzweigte, langgestreckte Kettenmoleküle für das ausgesprochen gute Filmbildungsvermögen verantwortlich sind.

Die papierchromatographische Untersuchung der Hydrolyseprodukte methylierter Kallose zeigt die Anwesenheit einer Uronsäurefraktion an, deren Anteil zu 1,9 % bestimmt wurde. Die Frage, wie diese Säuregruppen in das Kallosemolekül einbezogen sind, läßt sich aus den durchgeführten Reaktionen nicht abklären. Es besteht die Möglichkeit, daß sich die Uronsäure als Terminalgruppe am Aufbau des Kettenmoleküls beteiligt. Die Karboxylgruppen können jedoch auch als Konstituenten betrachtet werden, die in unregelmäßigen Abständen in das Kettenmolekül eingebaut sind.

In Tabelle 12 sind die wichtigsten strukturellen Daten einer Anzahl bekannter Glukosane zusammengestellt. Aus dieser Übersicht geht deutlich hervor, daß Kallose nach dem gleichen Bauprinzip wie Laminarin aufgebaut ist. Die beiden Polysaccharide weisen die gleichen Grundbausteine auf, besitzen gleichen Bindungstypus und stimmen auch in der Form des Kettenmoleküls überein. Ein Unterschied besteht lediglich im Polymerisationsgrad. Während die mittlere Kettenlänge des Laminarins von Connel, Hirst und Percival (11) durch Methylierung und Bestimmung des Tetramethylglukoseanteils zu 20 Glukose-Einheiten ermittelt wurde, sind am Aufbau der Kallose mindestens 90 Anhydroglukose-Reste beteiligt. Wird der Polymerisationsgrad auf Grund der Endgruppenmethode berechnet, so ergeben sich infolge Fehlens einer Tetramethylglukose-Fraktion noch wesentlich höhere Werte.

Trotz der strukturellen Verwandtschaft sind die beiden Zellwandsubstanzen durch ganz verschiedene physikalische Eigenschaften charakteri-

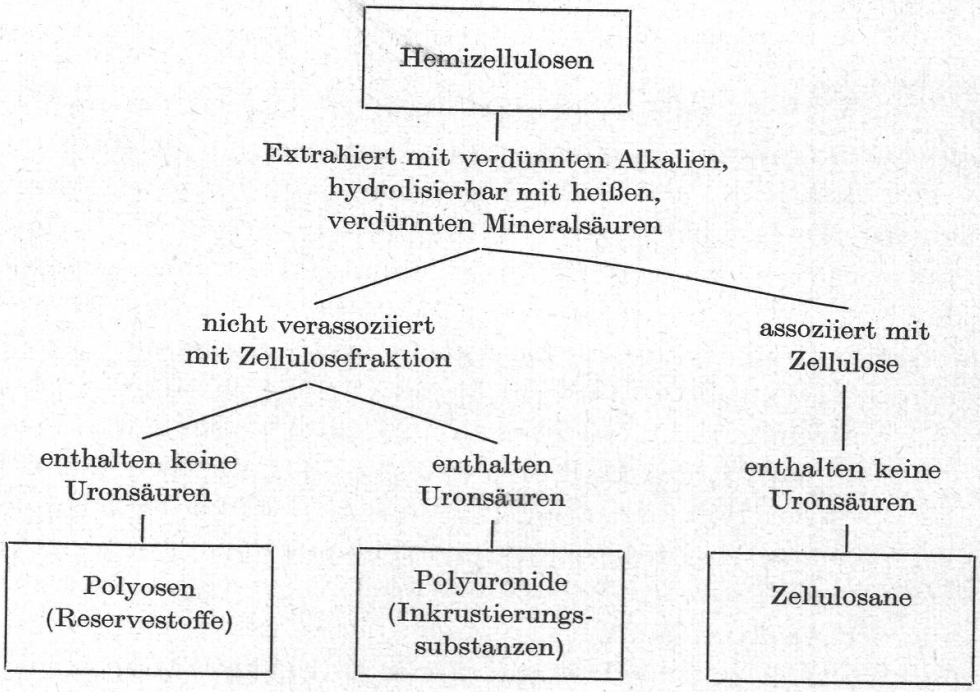
siert. Die spezifischen Merkmale der Kallose, vor allem ihr inertes Verhalten gegenüber allen Lösungsmitteln, lassen sich nicht aus der chemischen Natur des Kallosemoleküls erklären, sondern sind wahrscheinlich durch die spezifische Konformation der Kalloseketten im nativen Zustand bedingt. In vielen Fällen kann die räumliche Konfiguration, welche ein Polysaccharid in der Zellwand annimmt, von den physikalischen Daten des Materials (spezifische Absorptionsbanden im IR und UV, Röntgendiffraktion usw.) abgeleitet werden. Die vorliegenden Ergebnisse reichen jedoch nicht aus, um Kallose in dieser Beziehung zu analysieren.

2. Klassifizierung der Kallose

Kallose muß auf Grund ihrer Löslichkeit in 15-%-Natronlauge in die Gruppe der Hemizellulosen eingereiht werden. Norman (39) bezeichnet jene Zellwandsaccharide als Hemizellulosen, welche aus dem pflanzlichen Gewebe durch Behandlung mit verdünnten Alkalien heiß oder kalt extrahiert werden können. Sie sind in Wasser unlöslich und werden durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren zu Zucker- oder Uronsäure-Einheiten hydrolysiert. Eine feinere Unterteilung der zu den Hemizellulosen gezählten Stoffe stößt auf große Schwierigkeiten, da infolge der ausgesprochenen Komplexität dieser polymeren Verbindungen bis heute noch kein einheitliches Schema vorgeschlagen werden konnte. Die Differenzierung nach Norman ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13

Unterteilung der Hemizellulosen



Kallose ist ein Polysaccharid, das in der Zellwand als selbständiger Membranstoff auftritt. Ihre Zuordnung zu den Zellulosanen fällt damit außer Betracht. Am ehesten kann Kallose noch den Polyosen zugeteilt werden. Das Polysaccharid enthält wohl einen sehr kleinen Anteil an Uronsäuren, es zeigt aber dadurch noch keine sichtbaren sauren Eigenschaften. Dies ist ersichtlich an der Färbbarkeit des Membranstoffes mit basischen und sauren Farbstoffen. Kallose besitzt z. B. gleiche Affinität für Sprittblau (Triphenylpararosanilin-Chlorhydrat) und Wasserblau (Natrium-Salz der Triphenylpararosanilin-Disulfonsäure). Die Färbung beruht nicht auf einer chemischen Reaktion, vielmehr entspricht sie einer offenbar räumlich bedingten Adsorption des Farbmoleküls durch das Gelgerüst. Mit Wasser, Alkohol und einer Reihe weiterer Lösungsmittel können Farbstoffe beider Gruppen ohne Schwierigkeiten aus der Kallose wieder ausgewaschen werden. Die Einordnung in die Reihe der Polyosen ist auch insofern gerechtfertigt, weil die Kallose, einem Reservestoff vergleichbar, unter Umständen wieder in den Stoffwechsel einbezogen wird, was für die Zellwandstoffe der höheren Pflanzen sonst im allgemeinen nicht zutrifft (19). Der Versuch, Kallose als Reservestoff zu bezeichnen (49), ist jedoch genau so unbefriedigend wie die übrigen Theorien, welche bisher über die Funktion des Membranstoffes aufgestellt worden sind.

VI. Zusammenfassung

1. Die Isolierung der Siebröhrenkallose aus dem Phloem von *Vitis vinifera* und deren Aufarbeitung wurde nach drei Methoden durchgeführt. Kallose kann sowohl durch chemische Extraktion als auch durch chemische und mechanische Mazeration des Nachbargewebes rein dargestellt werden.

2. Kallose ist in organischen Lösungsmitteln, Wasser, verdünnten Säuren und 10-%-Natronlauge unlöslich. Die Membranstoffbeläge weisen in diesen Medien nur leichte Quellung auf. In konzentrierten Säuren und Salzlösungen und 15-%-Natronlauge zeigt Kallose jedoch unbegrenzte Quellung und geht unter Bildung von Additionsverbindungen kontinuierlich in Lösung. Eine Dispersion erfolgt auch dann, wenn durch Substitution der Hydroxylgruppen Kallose in ein Derivat übergeführt wird.

3. Der Membranstoff ist charakterisiert durch eine Dichte von 1,61 bis 1,62 (in wäßrigen Lösungen) und einen Brechungsindex von 1,532 $\pm$ 0,002. Die röntgenographische Analyse ergibt, daß in der Kallose eine wichtige Strukturidentitätsperiode 15 Å beträgt.

4. Im Elektronenmikroskop erscheint der Membranstoff als homogene Substanz. Bauelemente submikroskopischer Größenordnung sind nicht zu erkennen.

5. Als hydrolytische Spaltprodukte der Kallose können Glukose, Laminaribiose und Laminaritriose nachgewiesen werden. Die Hydrolyse methylierter Kallose liefert 2:4:6-Tri-O-methyl-D-glukose in einer Ausbeute von ca. 90%. Ferner enthält das Hydrolysat ca. 10% eines Gemisches von verschiedenen Dimethylglukosen und Spuren von Uronsäuren. Uronsäurebestimmungen zeigen die Anwesenheit von 1,9% Uronsäure im Kallosemolekül. Kalium-metaperiodat vermag das Polysaccharid praktisch nicht zu oxydieren. Mit β-Glykosidasen wird Kallose quantitativ zu Glukose abgebaut. Die Anhydroglukose-Einheiten des gestreckten Kettenmoleküls sind β-1:3-glukosidisch miteinander verbunden.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. A. Frey-Wyssling im Institut für Allg. Botanik der ETH durchgeführt. Die chemische Charakterisierung der Kallose erfolgte im Chemischen Institut der Universität Edinburgh (Schottland) unter Leitung von Prof. Dr. E. L. Hirst und Dr. G. O. Aspinall.

VII. Literaturverzeichnis

1. Arens, K. (1949). Lilloa, **18**, 71.
2. Arnold, A. (1956). Naturwiss., **43**, 233.
3. Bächli, P., Percival, E.G.V. (1952). J. Chem. Soc., 1243.
4. Barry, V. C. (1939). Sci. Proc. R. Dublin Soc., **22**, 59.
5. — (1941). Sci. Proc. R. Dublin Soc., **24**, 423.
6. — (1942). J. Chem. Soc., 578.
7. Bell, D.J., Northcote, D. H. (1950). J. Chem. Soc., 1944.
8. Bengtsson, N. (1925). Meddel. Centralanst. försökväs. jordbruksomrad., Nr. 279.
9. Carson, J. F., Maclay, W.D. (1946). J. Amer. Chem. Soc., **68**, 1015.
10. Carter, S., Record, B.R. (1939). J. Chem. Soc., 664.
11. Connel, J.J., Hirst, E.L., Percival, E.G.V. (1950). J. Chem. Soc., 3494.
12. Cude, H.E., Hullet, G.A. (1920). J. Amer. Chem. Soc., **42**, 391.
13. Currier, H.B., Strugger, S. (1956). Protoplasma, **45**, 552.
14. Dickey, E.E., Wolfrom, M.L. (1949). J. Amer. Chem. Soc., **71**, 825.
15. Ekenstam, A. (1936). Ber., **69**, 549.
16. Esau, K. (1948). Hilgardia, **18**, 217.
17. Eschrich, W. (1954). Planta, **44**, 532.
18. — (1956). Protoplasma, **47**, 488.

18a. Ferrier, J.R., persönliche Mitteilung.

19. Frey-Wyssling, A. (1935). Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin, Springer-Verlag.
20. — Epprecht, W., Kessler, G. (1957). Experientia, **13**, 22.
21. Gardiner, W. (1885). Proc. Cambridge Philos. Soc., **5**, 320.
22. Halshall, T.G., Hirst, E.L., Jones, J.K.N. (1947). J. Chem. Soc., 1399.

23. Hanstein, J. (1864). Die Milchsaftgefäße und die verwandten Organe der Rinde. Berlin, Wiegandt und Hempel.
24. Hassid, W.Z., Joslyn, M.A., McCready, R.M. (1941). J. Amer. Chem. Soc., **63**, 290.
25. Hermans, P.H. (1949). Physics and Chemistry of Cellulose Fibres. Amsterdam, Elsevier-Verlag.
26. Hess, K., Neumann, F. (1937). Ber., **70**, 728.
27. — Lauridsen, L.W. (1940). Ber., **73 B**, 115.
28. Katz, J.R., Derksen, C. (1931). Rec. trav. chim., **50**, 149.
29. Kaye, M.A., Kent, P.W. (1953). J. Chem. Soc., 79.
30. Mangin, L. (1890). C. r. Acad. Sci. Paris, **110**, 644.
31. — (1910). C. r. Acad. Sci. Paris, **151**, 279.
32. Meyer, K.H. (1940). Naturwiss., **28**, 397.
33. — (1947). Nature, **160**, 900.
34. — Gürtler, P. (1947). Helv. Chim. Acta, **30**, 751.
35. Mühletaler, K. (1950). Exper. Cell Res., **1**, 341.
36. — Linskens, H.F. (1956). Experientia, **12**, 253.
37. Nelson, N. (1944). J. biol. Chem., **153**, 375.
38. Noller, C.R. (1955). Chemistry of Organic Compounds. London, Saunders-Verlag.
39. Norman, A.G. (1937). The Biochemistry of Cellulose, the Polyuronides, Lignin &c. Oxford, Clarendon Press.
40. Percival, E.G.V., Ross, A.C. (1951). J. Chem. Soc., 720.
41. Pigman, W.W., Goepp, R.M. (1948). Chemistry of the Carbohydrates. New York, Academic Press.
42. Pridham, J.B. (1956). Anal. Chem., **28**, 1967.
43. Schmidt, E. (1917). Bau und Funktion der Siebröhren der Angiospermen. Jena, Gustav-Fischer-Verlag.
44. Sisson, W. A. (1940). Chem. Rev., **20**, 187.
45. Somogyi, M. (1945). J. biol. Chem., **160**, 61.
46. Staudinger, H., Schulz, G.V. (1935). Ber., **68**, 2320.
47. Trevelyan, W.E., Harrison, J.S. (1952). Biochem. J., **50**, 298.
48. Whistler, R.L., Hilbert, G.E. (1944). Ind. and Eng. Chem., **36**, 796.
49. Wilhelm, K. (1880). Beiträge zur Kenntnis des Siebröhrenapparates dicotyler Pflanzen. Leipzig, Engelmann-Verlag.
50. Winterstein, E. (1893). Ber., **11**, 441.
51. Wise, L.E., Murphy, M., D'Addieco, A.A. (1946). Paper Trade J., **122**, 35.
52. Wolfrom, M.L., Tyree, J.T., Galkowski, T.T., O'Neill, A.N. (1951). J. Amer. Chem. Soc., **73**, 4927.