

Aus der Forschungsabteilung für makromolekulare Chemie
des Chemischen Laboratoriums der Universität Freiburg/Br.

Über die Konstitution von Salepmannan

246. Mitteilung über makromolekulare Verbindungen¹⁾

Von **E. Husemann**

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 18. März 1940)

I. Allgemeiner Teil

1. Zusammenhang zwischen Löslichkeit und Konstitution bei Polysacchariden

In Orchideenknollen (tubera salep) ist zu etwa 30% ein Polysaccharid enthalten, das nach bisherigen Untersuchungen²⁾ als einzigen Zucker Mannose enthält. Diese in der Literatur als „Salepmannan“ bezeichnete Substanz ist zum Unterschied von den schwer löslichen Steinnußmannanen in Wasser leicht löslich. Gerade diese Eigenschaft ließ ihre Konstitutionsaufklärung wünschenswert erscheinen im Zusammenhang mit früheren Arbeiten über Polysaccharide, bei denen sich ergeben hatte, daß die physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungen, insbesondere die Löslichkeitsverhältnisse, weniger von der Art der am Aufbau beteiligten Zucker abhängen als vom Gesamtbauprinzip der Substanz. So ließ sich am Beispiel von Cellulose³⁾, Stärke⁴⁾ und Glykogen⁵⁾, die alle drei nur aus Glucose

¹⁾ 245. Mitt. vorstehend.

²⁾ Gans u. Tollens, Ber. dtsh. chem. Ges. **21**, 2150 (1888); Pringsheim u. Liss, Liebigs Ann. Chem. **460**, 32 (1927).

³⁾ Sponsler u. Dore, Colloid Symposium Monograph **4**, 174 (1926).

⁴⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. **527**, 195 (1937).

⁵⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. **530**, 1 (1937).

bestehen, zeigen, daß in der faserigen schwer löslichen Cellulose die einzelnen Zucker in unverzweigter Kette aneinandergereiht sind, während das pulvrige Aussehen und die leichtere Löslichkeit von Stärke und Glykogen auf dem Vorhandensein stark verzweigter Moleküle beruhen. Diese Vorstellungen wurden bei der Untersuchung des Arabogalaktans aus Lärchenholz¹⁾ bestätigt. Es ergab sich, daß die leichte Wasserlöslichkeit dieses Polysaccharides auf einer dem Glykogen ähnlichen Struktur beruht. Bei der Aufklärung derartiger Zusammenhänge muß allerdings in jedem Fall geprüft werden, ob wirklich reine Polysaccharide ohne „Fremdgruppen“ vorliegen; so verdankt z. B. das celluloseähnlich gebaute Fichtenmannan¹⁾ seine Wasserlöslichkeit sehr wahrscheinlich dem hohen Gehalt an Methoxylgruppen. Man muß annehmen, daß durch derartige Fremdgruppen die Kohäsionskräfte zwischen den einzelnen Kettenmolekülen vermindert werden und diese dann leichter durch Lösungsmittel voneinander getrennt werden können.

2. Frühere Untersuchungen über das Salepmannan

Nachdem von Gans und Tollens sowie Pringsheim und Liss²⁾ im Salepmannan als einziger Zucker Mannose nachgewiesen wurde, beschäftigten sich Pringsheim und Genin³⁾ insbesondere mit dem fermentativen Abbau des Polysaccharides durch Gerstenmalz. Sie isolierten eine Mannobiose, deren Konstitution jedoch nicht aufgeklärt wurde. Klages und Niemann⁴⁾ erhielten bei der Hydrolyse von Methylmannan 2,3,6-Trimethylmannose und schlossen daraus, daß die Verknüpfung der Zucker in 1—4-Stellung erfolgt. Der negative Drehwert von -44° läßt vermuten, daß β -glucosidische Bindung vorliegt. Bei der hydrolytischen Spaltung des Methyläthers, wie sie von Haworth und Machemer⁵⁾ zur Molekulargewichtsbestimmung von Cellulose ausgearbeitet wurde, isolierten Klages und Niemann⁴⁾

¹⁾ E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 155, 45 (1940).

²⁾ Vgl. Anm. 2 auf S. 241.

³⁾ H. Pringsheim u. A. Genin, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 140, 301 (1924).

⁴⁾ E. Klages u. R. Niemann, Liebigs Ann. Chem. 523, 224 (1936).

⁵⁾ W. N. Haworth u. H. Machemer, J. chem. Soc. London 1932, 1270.

1,7% Tetramethylmannose und berechneten aus diesem Endgruppengehalt einen Polymerisationsgrad von 70—80. Aus Viscositätsmessungen ergaben sich nach dem Staudingerschen Viscositätsgesetz¹⁾

$$(1) \quad \frac{\eta_{sp}}{c} = K_m \cdot P^2)$$

Werte von 30—60 unter Verwendung der von Staudinger und Husemann²⁾ an Stärken gefundenen K_m -Konstante von $1 \cdot 10^{-4}$; die Wahl des K_m -Wertes erfolgte auf Grund der Annahme, daß die Mannanmoleküle ebenso wie die der Stärke verzweigt seien. Kryoskopische Messungen am Methyläther ergaben einen Polymerisationsgrad von 20; allerdings ist diese Angabe ein Mindestwert, da keinerlei Fraktionierungen vorgenommen wurden. Abgesehen davon werden bei kryoskopischen Messungen an Polysacchariden und ihren Derivaten häufig anormal hohe Depressionen gefunden³⁾, so daß die nach dieser Methode gefundenen Werte einer Nachprüfung bedürfen.

Aus der Arbeit von Klages und Niemann lassen sich keine Schlüsse auf die Größe und Gestalt der Mannanmoleküle ziehen, da beide zur Molekulargewichtsbestimmung verwendeten Methoden, Endgruppenbestimmungen⁴⁾ und kryoskopische Messungen, nur unter bestimmten Voraussetzungen richtige Werte ergeben; außerdem wurde nicht beachtet, daß das Salepmannan bei der Isolierung fermentativ gespalten wird (vgl. S. 248), so daß stark abgebaute Produkte zu den Untersuchungen verwendet wurden.

3. Ziel und Ergebnisse der Untersuchung des Salepmannan

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Salepmannan auf möglichst schonende Art zu isolieren und die

¹⁾ H. Staudinger, Die hochmolekularen organischen Verbindungen. Springer, 1932, S. 41.

²⁾ η_{sp} = spez. Viscosität $\eta_{rel} - 1$, c = Konz. in g/Liter, K_m = Konstante, P = Polymerisationsgrad.

³⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 527, 195 (1937).

⁴⁾ Vgl. z. B. K. Hess und Mitarbeiter, Liebigs Ann. Chem. 448, 99 (1926); H. Staudinger u. H. Eilers, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 819 (1936).

⁵⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 145 (1937); E. Husemann, Papierfabrikant 36, 559 (1938).

Größe und Gestalt seiner Moleküle zu bestimmen, um wie bei früher untersuchten Polysacchariden¹⁾ die Zusammenhänge zwischen der Konstitution und den physikalischen Eigenschaften, insbesondere der Löslichkeit, aufzuklären.

Außerdem sollte die Frage untersucht werden, ob das native Salepmannan aus Molekülen einheitlicher Größe besteht wie die Xylane²⁾ oder polymolekular ist.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung zusammenfassend geschildert; die präparativen Angaben und die Meßresultate sind im speziellen Teil enthalten.

a) Der makromolekulare Aufbau der Salepmannane. Zur Beantwortung der Frage, ob in den Lösungen von Mannanen Einzelmoleküle oder Micellen vorliegen, wurde eine durch enzymatischen Abbau erhaltene polymerhomologe Reihe von Mannanen in die Nitrate übergeführt und die Molekulargewichte sämtlicher Substanzen durch osmotische Messungen bestimmt.

Tabelle 1
Polymeranaloge Umsetzungen an Salepmannanen

Polymerisationsgrade der	
Mannane	Mannannitrate
1340	1220
1040	930
800	720
164	167

Wie aus der Tab. 1 zu ersehen ist, stimmen die Polymerisationsgrade vor und nach der Nitrierung nahezu überein, d. h. die Umsetzungen sind polymeranalog verlaufen³⁾. Damit ist der Beweis erbracht, daß die Salepmannane ebenso wie Cellulosederivate⁴⁾, Stärken und Glykogene⁵⁾ makromolekular

¹⁾ Vgl. S. 241, Anm. 3, 4 und 5.

²⁾ E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 155, 13 (1940).

³⁾ H. Staudinger u. O. Schweitzer, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 3132 (1929).

⁴⁾ Vgl. z. B. H. Staudinger u. G. Daumiller, Liebigs Ann. Chem. 529, 219 (1937).

⁵⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 527, 195 (1937); 530, 1 (1937).

gebaut sind. Der Beweis ist in diesem Fall besonders eindeutig, da ebenso wie bei Stärken und Glykogenen sämtliche Molekulargewichte auf osmotischem Wege bestimmt werden konnten, während bei der Cellulose Viscositätsmessungen herangezogen werden müssen.

b) Die Gültigkeit des Viscositätsgesetzes bei Salepmannanen und Nitraten. Aus Viscositätsmessungen und den osmotisch bestimmten Polymerisationsgraden wurden die K_m -Konstanten des Staudingerschen Viscositätsgesetzes (1) berechnet.

Tabelle 2
 K_m -Konstanten von Salepmannanen

Substanz	\bar{P}	Lösungs- mittel	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$	Lösungs- mittel	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$
Mannan I	1340	Schweizers Reagens	0,60	4,5	Wasser	2,1	15,7
Mannan II	1040	„	0,45	4,3	„	1,5	14,4
Mannan III	800	„	0,33	4,1	„	1,1	13,8
Mannan IV	164	„	0,10	6,1	„	0,25	15,3

Tabelle 3
 K_m -Konstanten von Salepmannannitraten

P	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$
1550 ¹⁾	1,40	9,0
1220	1,10	9,0
1110 ¹⁾	0,96	8,7
930	0,87	9,3
720	0,60	8,4
200 ¹⁾	0,18	8,9
167	0,15	9,0
83 ¹⁾	0,064	7,7
46 ¹⁾	0,038	8,3

Die in den Tab. 2 und 3 zusammengestellten Werte zeigen, daß in einem Bereich der Polymerisationsgrade von 46 bis 1550 das Viscositätsgesetz gilt²⁾. Alle untersuchten Mannane müssen also gleich gebaut sein.

¹⁾ Die Präparate sind fraktioniert.

²⁾ Eine Reihe von synthetischen Hochpolymeren zeigt zum Unterschied von diesen Polysacchariden erhebliche Abweichungen; vgl. Diss. Warth, Freiburg/Br., 1938; H. Staudinger u. J. Schneiders, Liebigs Ann. Chem. 541, 151 (1939).

Auffallend ist die hohe Konstante der Salepmannane in Wasser. Da aus den osmotischen Messungen die Bildung von Assoziationsprodukten auszuschließen ist und Ioneneffekte ebenfalls nicht vorliegen können, muß eine besonders starke Solvatation angenommen werden, die etwa derjenigen von Cellulosen in Phosphorsäure entspricht¹⁾.

c) Die Gestalt der Mannanmoleküle. Die Größe der K_m -Konstanten ist ein Maß für die Moleküllänge. Um Aufschluß über die Gestalt der Salepmannanmoleküle zu bekommen, wurden deshalb die hier erhaltenen Werte mit den bei Cellulosen und Fichtenmannan gemessenen Konstanten verglichen. (Vgl. Tab. 4.)

Tabelle 4

Vergleich der K_m -Konstanten von Salepmannan, Fichtenmannan und Cellulose

Substanz	Lösungsmittel	$K_m \cdot 10^4$
Salepmannan . . .	Schweizers Reagens	4,4
Fichtenmannan . .	„ „	4,4
Cellulose	„ „	5,0
Salepmannan . . .	Wasser	15,3
Fichtenmannan . .	„	7,3
Salepmannannitrat	Aceton	8,8
Cellulosenitrat . .	„	10—11

Aus der annähernden Übereinstimmung der Konstanten läßt sich schließen, daß alle drei Substanzen gleiche Molekülformen besitzen müssen. Da für die Cellulose eine langgestreckte, unverzweigte Struktur nachgewiesen wurde²⁾, müssen auch die Mannane ähnlich gebaut sein.

d) Die Polymolekularität³⁾ von Salepmannan. Die Untersuchung des Salepmannans auf die Frage, ob es aus Molekülen einheitlicher Größe besteht oder polymolekular ist, erfolgte durch fraktionierte Fällung des unabgebauten Mannannitrates nachdem es gelungen war, das in den Salepknollen

¹⁾ A. af Ekenstam, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 549 (1936).

²⁾ Sponsler u. Dore, Colloid Symposium Monograph 4, 174 (1926).

³⁾ H. Staudinger, Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 3019 (1926); G. V. Schulz, Z. Elektrochem. 44, 102 (1938).

befindliche mannanspaltende Ferment zu inaktivieren und so das Polysaccharid nativ zu gewinnen. Die Fraktionierung lieferte das Resultat, daß das Salepmannan sehr uneinheitlich ist. Wie aus den in Abb. 1 nach G. V. Schulz¹⁾ aufgetragenen Verteilungsfunktionen hervorgeht, entspricht die Uneinheitlichkeit des Mannans etwa derjenigen von synthetischen Polymerisations- bzw. Polykondensationsprodukten; eine schwach abgebaute Nitrocellulose¹⁾ ist viel einheitlicher. Dieser Befund legt die Annahme nahe, daß bei Reservopolysacchariden wie dem Salepmannan ein Gleichgewicht zwischen enzymatischem Auf- und Abbau besteht, während Gerüstsubstanzen, die keiner Spaltung unterworfen sind, Moleküle einheitlicher Länge besitzen. Für diese Vermutung sprechen auch qualitative Fraktionierungen an Stärken²⁾ und Glykogenen.

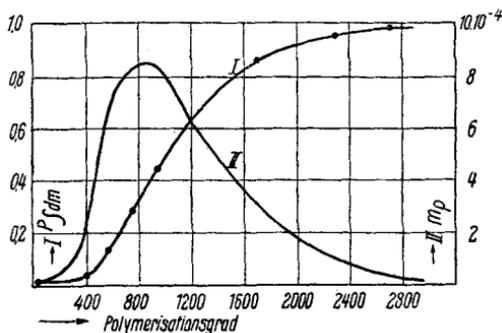


Abb. 1. Verteilungsfunktion von Salepmannannitrat
(I. Integrale Verteilungsfunktion, II. Massenverteilungsfunktion)

e) Die Wasserlöslichkeit des Salepmannans. Da nachgewiesen wurde, daß die Salepmannane langgestreckte unverzweigte Moleküle besitzen, kann ihre Wasserlöslichkeit nicht wie bei Glykogen und Arabo-Galaktanen auf Kettenverzweigungen beruhen, sondern muß eine andere Ursache haben. Ein Anhaltspunkt ergab sich aus der Beobachtung, daß die Mannane ihre Löslichkeit in Wasser verlieren, wenn sie mit Laugen und Säuren behandelt wurden. Eine genauere Untersuchung

¹⁾ G. V. Schulz, Z. physikal. Chem. Abt. B 30, 379 (1935); 32, 27 (1936); u. A. Dinglinger, 43, 47 (1939).

²⁾ E. L. Hirst u. G. T. Young, J. chem. Soc. London 1939, 1470.

dieses Vorganges zeigte, daß eine Abspaltung von Essigsäure stattfindet, und zwar ist im Durchschnitt jedes 11. Mannosemolekül mit einem Molekül Essigsäure verestert. Man kann annehmen, daß diese Fremdgruppe die Kohäsionskräfte zwischen den einzelnen Ketten vermindert und dadurch die Löslichkeit erhöht. Einen Beweis für diese Annahme würde allerdings erst die Gewinnung löslichen Mannans durch schwache Acetylierung liefern. Diese Synthese ist bisher nicht gelungen, da es sehr schwierig ist, die Essigsäuremoleküle in regelmäßigen Abständen einzuführen.

II. Spezieller Teil

1. Die Herstellung von Salepmannanen und ihren Nitraten

Bei der Isolierung des Mannans nach der von Pringsheim und Genin¹⁾ angegebenen Methode durch Extraktion der gepulverten Salepknollen mit Wasser und Ausfällen in Methanol zeigte sich, daß bei mehreren Ansätzen, die sich nur in der Einwirkungsdauer des Wassers unterschieden, Produkte erhalten wurden, die sich erheblich in den spezifischen Viscositäten ihrer Lösungen unterscheiden. Es muß also während des HerauslöSENS ein Abbau vor sich gehen. Da angestrebt werden sollte, ein möglichst unabgebautes Produkt zu erhalten, wurde versucht, den Grund des Abbaus aufzufinden und nach Möglichkeit auszuschalten.

Da die Reaktion der Lösung neutral bleibt, kam eine hydrolytische Spaltung nicht in Frage; oxydativer Abbau konnte ebenfalls nicht vorliegen, da auch beim Arbeiten unter völligem Luftausschluß die Viscosität der Lösung ständig abnahm. Zur Prüfung auf fermentative Spaltung wurde die Lösung kurze Zeit auf 100° erhitzt. Es zeigte sich in der Tat, daß dadurch der Abbauvorgang völlig unterbrochen wird. Es wird also zusammen mit dem Mannan ein mannanspaltendes Ferment aus den Salepknollen herausgelöst, das das Polysaccharid abbaut.

¹⁾ H. Pringsheim u. A. Genin, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 140, 301 (1924).

Die Inaktivierung des Fermentes ohne gleichzeitige Schädigung des Polysaccharides gelang durch 1-stündiges Kochen des Saleppulvers mit Alkohol unter Rückfluß. Das Mannan wird durch diese Behandlung nicht abgebaut; denn ein nach 8-stündigem Erhitzen erhaltenes Produkt besitzt die gleiche spezifische Viscosität wie nach einer Kochdauer von $\frac{1}{2}$ Stunde. Auch isolierte Mannane werden durch die gleiche Behandlung nicht abgebaut.

Die Gewinnung von Mannan I ging nach diesen Vorversuchen folgendermaßen vor sich. 25 g Saleppulver wurde unter Rückfluß 1 Stunde mit Alkohol gekocht, nach dem Abkühlen mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 35° im Vakuum getrocknet. Das so zur Inaktivierung des Fermentes vorbehandelte Material wurde unter Ausschluß von Licht 15 Stunden mit 5 Liter destilliertem Wasser geschüttelt, vom Ungelösten durch Zentrifugieren befreit und die schwach trübe Lösung unter starkem Rühren in 15 Liter Methanol einfließen lassen. Das stark gequollene Koagulat ließ sich nach mehrstündigem Absitzen durch Koliertücher filtrieren. Durch starkes Abpressen des Methanol-Wassergemisches und Verreiben vor der anschließenden Ätherbehandlung wurde das Mannan in feinfaseriger, reaktionsfähiger Form erhalten. Um ein nachträgliches „Verhornen“ der Oberfläche zu vermeiden¹⁾, muß der Äther bei Zimmertemperatur verdunsten, erst dann kann die endgültige Trocknung im Vakuum bei $35\text{--}40^{\circ}$ erfolgen. Die Ausbeute beträgt 8,5 g, das sind 34% des Ausgangsmaterials.

Eine Reihe von abgebauten Mannanen wurde durch abgestufte Einwirkung des Fermentes erhalten. Zur Herstellung von Mannan II wurden 25 g unvorbehandeltes Saleppulver 15 Stunden mit 5 Liter Wasser geschüttelt und 24 Stunden bei 27° belassen. Bei Mannan III dauerte die fermentative Spaltung 72 Stunden, bei Mannan IV 9 Tage. Die Isolierung ging in der bei Mannan I beschriebenen Art vor sich. Eine Reinigung der Produkte erfolgte durch erneutes Auflösen in Wasser, Zentrifugieren und Eingießen in Methanol. Die spezi-

¹⁾ F. Klages u. R. Niemann, Liebigs Ann. Chem. 523, 231 (1936).

fischen Viscositäten von Mannan I und dem von Klages und Niemann untersuchten Produkt verhalten sich wie 350:1, die beiden Autoren haben demnach ein sehr stark abgebautes Produkt in ihrer Arbeit verwendet.

Bei allen Ansätzen wurden trotz starken Abbaus nahezu gleiche Mannanmengen erhalten. Es ergibt sich daraus, daß die fermentative Spaltung nicht vom Molekülende schrittweise erfolgen kann, da die Mannosen bzw. Mannobiosen bei der Isolierung verloren gehen würden, sondern daß sie innerhalb der Ketten erfolgen muß.

Die Analysen der Mannane sind in der folgenden Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4
Analytische Daten¹⁾ und Drehwerte der Salepmannane

Substanz	% C	% H	$[\alpha]_D$ in 6%iger NaOH in °
Mannan I	44,57	6,49	-44
Mannan II	44,16	6,18	-43
Mannan III	44,18	6,29	-44
Mannan IV	44,35	6,40	-43

Die Nitrierung der Mannane erfolgte in der von A. af Ekenstam²⁾ beschriebenen Art durch Einwirkung von 100 ccm Nitriersäure (HNO_3 , H_3PO_4 und P_2O_5) auf 1 g hochvakuumtrockne Substanz während 15 Stunden. Die Nitrate wurden nach dem Waschen und Stabilisieren mit Methanol in Aceton gelöst und durch Eingießen in Wasser umgefällt.

Stickstoffgehalte

Nitrat I: 12,40%, II: 12,32%, III: 12,47%, IV: 12,28%.

2. Osmotische Messungen an Salepmannanen und Nitraten

Die Molekulargewichte der Salepmannane und ihrer Nitrate wurden durch osmotische Messungen in den von G. V. Schulz³⁾ konstruierten Osmometern bestimmt. Als Membranen

¹⁾ Die Analysen dieser Arbeit wurden von S. Kautz, Freiburg/Br. ausgeführt.

²⁾ A. af Ekenstam, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 549 (1936).

³⁾ G. V. Schulz, Z. physikal. Chem. Abt. A 176, 317 (1936).

dienten die Ultracellafilter „feinst“ der Membranfiltergesellschaft Göttingen. Bei Substanzen mit Polymerisationsgraden unter 200 wurden die Filter „allerfeinst“ mit einer Durchflußzeit von 20000 Minuten verwendet¹⁾.

Die Resultate sind in den Tab. 5 und 6 zusammengestellt.

Tabelle 5

Osmotische Messungen an Salepmannanen in Wasser

Nr. des Produktes	c	$p \cdot 10^3$	$\frac{p}{c} \cdot 10^3$	$\frac{R T c}{p}$	s	Mol.-Gew.	Polym.-Grad
I	5,0	0,95	0,19	130 000	0,084	225 000	1340
	7,5	1,80	0,24	103 000	0,072	224 000	
	10	3,00	0,30	82 000	0,062	217 000	
	Mittel: 222 000						
II	2,5	0,45	0,18	136 600	0,105	185 000	1040
	5,0	1,20	0,24	102 000	0,082	173 000	
	7,5	2,25	0,30	82 000	0,068	168 000	
	10	3,60	0,36	68 400	0,059	164 000	
Mittel: 173 000							
III	2,5	0,60	0,24	102 000	0,098	135 000	800
	5,0	1,50	0,30	82 000	0,076	132 000	
	7,5	2,63	0,35	70 000	0,064	134 000	
	10	4,20	0,42	59 000	0,056	134 000	
Mittel: 133 800							
IV	1,0	0,92	0,92	26 800	—	27 300 aus lim $p/c =$ $0,90 \cdot 10^{-3}$	164
	2,5	2,30	0,92	26 800	—		
	5,0	4,65	0,93	26 400	—		
	7,5	7,50	1,00	24 600	—		

Tabelle 6

Osmotische Messungen an unfraktionierten Mannannitrat in Aceton

I	2,5	0,34	0,13 ₆	180 000	0,18	328 000	1220
	5,0	0,90	0,18	136 000	0,12	340 000	
	10	3,00	0,30	82 000	0,076	340 000	
Mittel: 336 000							
II	2,5	0,39	0,15 ₆	159 000	0,165	272 000	930
	5,0	1,08	0,21 ₆	114 000	0,115	268 000	
	7,5	2,20	0,29 ₄	84 000	0,086	237 000	
	10	3,60	0,36	68 400	0,070	238 000	
Mittel: 256 000							

¹⁾ Über die Prüfung der Membranen auf Dichtigkeit vgl. E. Husemann, J. prakt. Chem. [2] 155, 56 (1940).

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Nr. des Produktes	c	$p \cdot 10^3$	$\frac{p}{c} \cdot 10^3$	$\frac{R T c}{p}$	s	Mol.-Gew.	Polym.-Grad
III	1,5	0,27	0,17 ₅	140 000	0,195	198 000	720
	2,5	0,51	0,20	123 000	0,150	212 000	
	5,0	1,34	0,27	91 000	0,105	192 000	
	7,5	2,46	0,33	74 000	0,082	193 000	
Mittel: 199 000							
IV	1,0	0,62	0,62	39 700	0,14	46 000	167
	2,5	1,80	0,72	34 200	0,092	44 300	
	5,0	4,00	0,80	30 700	0,067	46 200	
	7,5	6,50	0,87	28 300	0,055	48 100	
	10	10,0	1,00	24 600	0,046	45 500	
Mittel: 46 000							

Da die p/c -Werte so stark ansteigen, daß eine Extrapolation sehr ungenaue Werte liefern würde, wurden die

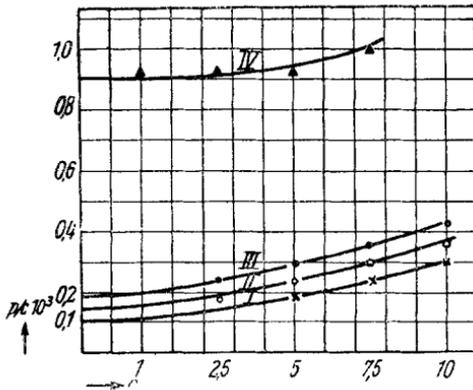


Abb. 2. Osmotische Messungen an Salepmannanen in Wasser

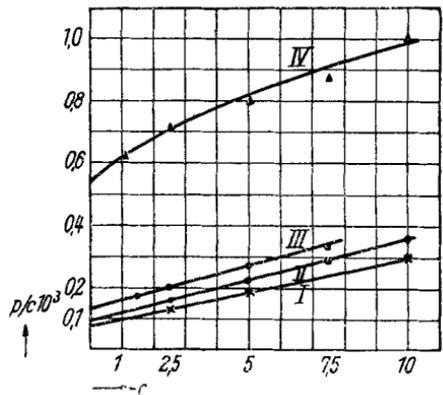


Abb. 3. Osmotische Messungen an Mannannitrat in Aceton

Molekulargewichte nach der von G. V. Schulz¹⁾ angegebenen Gleichung

$$(2) \quad M = \frac{R T c}{p(1 - c s)}$$

(M = Molekulargewicht, R = Gaskonstante, T = abs. Temperatur, c = Konz. in g/Liter, p = osmotischer Druck in Atm. und s = spez. Kovolumen) berechnet.

¹⁾ Vgl. z. B. G. V. Schulz, Z. physikal. Chem. Abt. A 176, 317 (1936).

Wie in früher untersuchten polymerhomologen Reihen liegen die s -Werte der Mannane und Mannannitrate, wenn sie im logarithmischen Netz gegen die entsprechenden osmotischen Drucke aufgetragen werden, auf einer Geraden, wie aus den Abb. 4 und 5 hervorgeht.

Eine Ausnahme macht das Mannan IV. Wenn man bei dieser Substanz aus den der s -Kurve in Abb. 4 entnommenen s -Werten bei verschiedenen Konzentrationen die Molekulargewichte berechnet, so erhält man keine konstanten Werte.

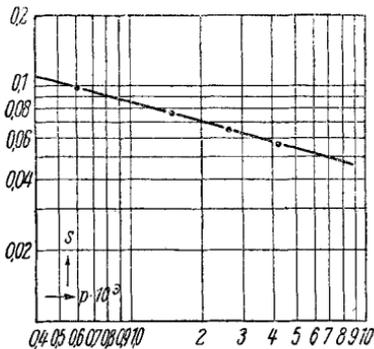


Abb. 4. s -Kurve von Salepmannanen in Wasser

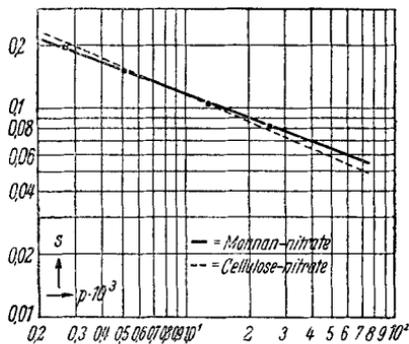


Abb. 5. s -Kurve von Mannannitraten in Aceton

Ein Grund für dieses abweichende Verhalten ist bisher nicht bekannt. Da jedoch die p/c -Werte nur sehr wenig mit der Konzentration ansteigen, wurde der limes-Wert der Berechnung zugrunde gelegt. Aus den Tabellen ergibt sich, daß das un-abgebaute Salepmannan I einen Durchschnittspolymerisationsgrad von 1340 besitzt und ferner, daß die Nitrierungen polymeranalog verlaufen sind (vgl. Tab. 1). Aus der Übereinstimmung der s -Kurve der Mannan-nitrate mit der in der Abb. 5 gestrichelt eingezeichneten Kurve der Nitrocellulosen¹⁾ läßt sich schließen, daß in beiden Fällen ähnliche Solvationsverhältnisse vorliegen.

3. Bestimmung der K_m -Konstanten

An den Salepmannanen und ihren Nitraten wurden Viscositätsmessungen in Ostwald-Viscosimetern²⁾ ausgeführt, um

¹⁾ G. V. Schulz, Z. physikal. Chem. Abt. A 176, 317 (1936).

²⁾ Über die Dimensionierung von Viscosimetern vgl. G. V. Schulz, Z. Elektrochem. 43, 479 (1937).

die K_m -Konstanten des Staudingerschen Viscositätsgesetzes zu bestimmen. Die Messungen in Schweizers Reagens erfolgten in den von Staudinger und Mitarbeitern¹⁾ konstruierten Viscosimetern, die es gestatten, unter Ausschluß von Licht und Luftsauerstoff zu arbeiten. Die Ergebnisse sind in den Tab. 7 und 8 zusammengestellt. Auf die ungewöhnlich hohen Konstanten in Wasser wurde bereits oben hingewiesen. Da Kontrollmessungen in 0,1 n-Calciumchloridlösung gleiche Werte lieferten, können keine Ioneneffekte vorliegen, wie sie z. B. bei Polyacrylsäuren²⁾ beobachtet wurden.

Tabelle 7
Viscositätsmessungen an Salepmannanen

Substanz	Polym.-Grad	Lösungsmittel	c	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$
Mannan I	1340	Wasser	0,08	1,17	2,1	15,7
	1340	Schweizers Reagens + NH_4HCO_3	0,2	1,12	0,60	4,5
Mannan II	1040	Wasser	0,1	1,15	1,5	14,4
	1040	Schweizers Reagens + NH_4HCO_3	0,4	1,18	0,45	4,3
Mannan III	800	Wasser	0,1	1,11	1,1	13,8
	800	Schweizers Reagens + NH_4HCO_3	0,4	1,13	0,33	4,1
Mannan IV	164	Wasser	0,4	1,10	0,25	15,3
	164	Schweizers Reagens + NH_4HCO_3	1,0	1,10	0,10	6,1

Tabelle 8
Viscositätsmessungen an Mannannitrat in Aceton

Substanz	Polym.-Grad	c	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$
Nitrat I	1220	0,1	1,11	1,1	9,0
Nitrat II	930	0,1	1,087	0,87	9,4
Nitrat III	720	0,2	1,12	0,60	8,3
Nitrat IV	167	0,4	1,06	0,15	9,0

¹⁾ H. Staudinger u. O. Schweitzer, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 3132 (1930).

²⁾ H. Staudinger u. E. Trommsdorf, Liebigs Ann. Chem. **502**, 201 (1933); W. Kern, Z. physikal. Chem. Abt. A **181**, 249 (1938).

4. Osmotische und viscosimetrische Messungen an fraktionierten Mannannitrat

Da keinerlei Fraktionierungen vorgenommen wurden, sind sämtliche untersuchten Substanzen polymolekular. Um zu entscheiden, ob diese Uneinheitlichkeit einen wesentlichen Einfluß auf die Größe der K_m -Konstanten ausübt und ferner um den gemessenen Bereich zu vergrößern, ging man folgendermaßen vor. 5 g des Nitrates I wurden in 250 ccm Aceton gelöst und unter Schütteln tropfenweise mit Wasser versetzt bis zur bleibenden Trübung. Nach 24-stündigem Stehen bei 27° ließ sich die klare Lösung durch Dekantieren von Bodenkörper trennen. Die so erhaltene 1. Fraktion wurde in Aceton gelöst und durch Eingießen in Wasser ausgefällt (Nitrat 1). Von den in gleicher Art erhaltenen Fraktionen wurde die Fraktion III als Nitrat 2 zu den Messungen benutzt.

Durch eine ähnliche Fraktionierung des Nitrates IV wurden die Nitrate 3, 4 und 5 erhalten.

Stickstoffgehalte

Nitrat 1: 12,31%; 2: 12,57%; 3: 12,42%; 4: 12,64%; 5: 12,39%

In der Tab. 9 sind die osmotischen Daten zusammengestellt. Aus den durch Viscositätsmessungen erhaltenen η_{sp}/c -Werten und den osmotisch bestimmten Polymerisationsgraden wurden die K_m -Konstanten der Nitrate in Aceton berechnet (vgl. Tab. 10). Die Werte stimmen zwischen den Polymerisationsgraden 46 und 1570 innerhalb der Fehlergrenzen überein und zeigen auch keine erheblichen Abweichungen von denen der unfraktionierten Nitrate.

Tabelle 9

Osmotische Messungen an fraktionierten Mannannitrat in Aceton

Nr. der Substanz	c	$p \cdot 10^3$	$\frac{p}{c} \cdot 10^3$	$\frac{RTc}{p}$	s	Mol.-Gewicht	Polym.-Grad
1	2,5	0,30	0,12	205 000	0,190	400 000	1550
	5,0	0,76	0,15	164 000	0,125	438 000	
	7,5	1,61	0,21 ₅	114 000	0,098	430 000	
	10	2,80	0,28	88 000	0,078	440 000	

Mittel: 427 000

Tabelle 9 (Fortsetzung)

Nr. der Substanz	c	$p \cdot 10^3$	$\frac{p}{c} \cdot 10^3$	$\frac{R T c}{p}$	s	Mol.-Gewicht	Polym.-Grad
2	2,5	0,33	0,13	189 000	0,180	340 000	1110
	5,0	1,00	0,20	123 000	0,118	300 000	
	7,5	2,03	0,27	91 000	0,090	283 000	
	10	3,20	0,32	77 000	0,074	296 000	
Mittel: 305 000							
3	1,0	0,54	0,54	45 600	0,145	53 400	200
	2,5	1,50	0,61	40 300	0,103	54 300	
	5,0	3,36	0,67	36 800	0,072	57 400	
	10	8,50	0,85	29 000	0,050	57 900	
Mittel: 55 200							
4	1,0	1,29	1,29	19 000	0,105	21 500	83
	2,5	3,25	1,30	18 900	0,075	23 400	
	5,0	7,00	1,40	17 500	0,054	24 000	
Mittel: 22 900							
5	1,0	2,0	2,0	12 300	0,090	12 900	46
	2,0	4,6	2,3	10 700	0,065	12 300	
	3,0	7,0	2,34	10 500	0,055	12 600	
Mittel: 12 600							

Tabelle 10

Viscositätsmessungen an fraktionierten Mannannitraten in Aceton

Substanz	c	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	Polym.-Grad osmotisch	$K_m \cdot 10^4$
Nitrat 1	0,1	1,140	1,4	1550	9,0
Nitrat 2	0,1	1,096	0,96	1110	8,7
Nitrat 3	0,5	1,089	0,178	200	8,9
Nitrat 4	1,0	1,064	0,064	83	7,7
Nitrat 5	1,0	1,038	0,038	46	8,3
Mittel: 8,5					

5. Untersuchung der Polymolekularität von Salepmannan

Die qualitative Fraktionierung des Nitrates I zeigte bereits, daß dieses Produkt polymolekular ist. Um den Grad der Uneinheitlichkeit exakt zu bestimmen, wurde in der beschriebenen Art (vgl. S. 255) eine quantitative Fraktionierung vorgenommen und die Polymerisationsgrade der einzelnen Nitrate durch Viscositätsmessungen bestimmt (vgl. Tab. 11).

Tabelle 11
Fraktionierung von Mannannitrat I

Fraktion	Menge in g	%	$\int dm \cdot 10^3$	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	\bar{P}
1	0,035	1,4	0,7	0,02	24
2	0,07	2,8	2,8	0,34	410
3	0,43	17,2	12,8	0,48	570
4	0,30	12,0	27,4	0,65	775
5	0,535	21,4	44,1	0,80	950
6	0,42	16,8	63,2	1,01	1200
7	0,71	28,4	86,0	1,40	1670
7a*)	0,05	2,0	1,0**)	2,28	2700
7b	0,15	6,0	5,0	1,93	2300

*) Die Fraktion 7 wurde nochmals unterteilt.

***) Die Werte sind in der Kurve I der Abb. 1 von oben eingetragen.

Aus der letzten Spalte der Tab. 11 erkennt man, daß die Polymerisationsgrade zwischen 24 und 2700 liegen; das Mannannitrat I ist also sehr uneinheitlich¹⁾. Da es aus dem unabgebauten Mannan I annähernd polymeranalog hergestellt wurde, muß auch das native Salepmannan polymolekular sein im Gegensatz zu den einheitlichen Xylanen.

6. Untersuchung der Wasserlöslichkeit der Salepmannane

Die Salepmannane verlieren ihre Wasserlöslichkeit, wenn sie mit Säuren oder Laugen behandelt werden. So genügt schon eine $\frac{1}{2}$ -stündige Einwirkung von n/100-Natronlauge in Anwesenheit von Methanol, um die Löslichkeitseigenschaften völlig zu verändern. Ein so behandeltes Mannan quillt in Wasser nicht mehr auf und löst sich auch nicht mehr in Natronlauge. In Schweizers Reagens tritt erst nach Zusatz von Ammoniumbicarbonat Lösung ein. Da diese Reaktion von Säuren sowohl als von Alkalien hervorgerufen wird, lag es nahe, einen Verseifungsvorgang zu vermuten. Es bestanden in diesem Fall zwei Möglichkeiten: 1. das Salepmannan besitzt Carboxylgruppen, die mit einem Alkohol verestert sind und 2. einige Hydroxylgruppen des Mannans sind mit Säureresten verestert. Die

¹⁾ Die Verteilungskurve nach G. V. Schulz wurde bereits auf S. 247 abgebildet.

zweite Möglichkeit erwies sich als zutreffend; es ließ sich zeigen, daß etwa jeder 10. bis 12. Mannoserest mit einem Molekül Essigsäure verestert ist. Die dadurch hervorgerufene Unregelmäßigkeit des Moleküls verringert die Anziehungskräfte zwischen den Hydroxylgruppen der Ketten, so daß bereits die Wassermoleküle imstande sind, die Mannanketten voneinander zu trennen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestätigt, daß die Mannane nach Zusatz von Alkali zur wäßrigen Lösung trotz der Verseifung nicht ausfallen; erst wenn durch Eingießen in Methanol die Moleküle zusammengelagert sind, ist es unmöglich, sie mit Wasser oder Laugen wieder in Lösung zu bringen. Der Nachweis für das Vorliegen eines Essigsäureesters wurde folgendermaßen erbracht: Je 0,05 g Mannan I wurden in einem 100 ccm fassenden Philippsbecher, der mit

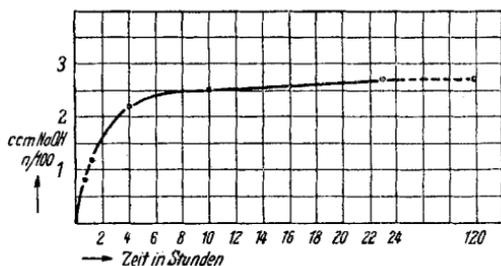


Abb. 6. Verseifungsgeschwindigkeit von Salepmannan.

einem doppelt durchbohrten Stopfen samt Gaseinleitungsrohr versehen war, nach der Verdrängung der Luft durch CO_2 -freien Stickstoff mit 10 ccm Methanol (unter N_2 über CaO destilliert) und 10 ccm n/100-Natronlauge versetzt und fest verschlossen. Nach $\frac{1}{2}$, 1, 4, 10 und 23 Stunden wurde die Verseifung unterbrochen durch Hinzufügung von 10 ccm n/100-Salzsäure. Nach kurzem Aufkochen erfolgte die Rücktitration mit Natronlauge bis zur Rosafärbung von Phenolphthalein. In Abb. 6 ist der Verlauf der Verseifung graphisch dargestellt. Nach etwa 15 Stunden ist der Endwert erreicht. Der Laugenverbrauch entspricht einem Äquivalent Säure auf 10 Mannosereste. Um zu entscheiden, ob eine Säure oder ein Alkohol abgespalten worden war, behandelte man das verseifte Mannan mit verd. Essigsäure, um ein eventuell gebildetes Natriumsalz zu spalten, und titrierte nach sorgfältigem Auswaschen nochmals in der

gleichen Weise mit Natronlauge. In diesem Fall wurde keine weitere Lauge verbraucht, d. h. das Salepmannan enthält keine Carboxylgruppen; es ist also eine Säure abgespalten worden, und zwar muß eine organische Säure vorliegen, da Schwefel, Phosphor und Stickstoff nur in Spuren aufgefunden werden konnten. Zur Isolierung der Säure führte man die Verseifung an 10 g Salepmannan mit 2%-iger Natronlauge unter Zusatz von Methanol aus. Nach 24 Stunden trennte man das verseifte Mannan durch Zentrifugieren ab, destillierte unter Durchleiten von Stickstoff den Methanol ab und führte nach Ansäuern mit Schwefelsäure eine Wasserdampfdestillation durch. Je 300 ccm des Destillates wurden mit n/10-Natronlauge titriert. Die vereinigten Destillate dampfte man i. V. bei 30° ein. Das abzentrifugierte Mannan wurde einer nochmaligen Verseifung unterworfen. Die Destillate erforderten nur noch geringe Laugenmengen zur Neutralisation. Insgesamt wurden von 10 g lufttrockener Substanz (10% Wasser) 60 ccm n/10-Natronlauge verbraucht, das entspricht einem Säureäquivalent auf 10 Mannosen. Die Übereinstimmung dieses Wertes mit den quantitativen Titrations zeigt, daß die gesamte Säure wasserdampflich ist. Das Na-Salz bildet ein weißes Pulver. Die Verbrennung lieferte folgende Werte: 28,6% C, 3,89% H, 28,2% Na. Das Äquivalentgewicht, das durch Abdestillation der Säure nach Zusatz von Schwefelsäure bestimmt wurde, beträgt 86. Die Daten stimmen annähernd mit den für Natriumacetat erhaltenen überein (29,3% C, 3,66% H, 28,1% Na; Äquivalentgewicht = 82). Außerdem erhielt man nach der Methode von Krüger und Tschirsch¹⁾ mit Uranylformiat das tetraederförmig krystallisierende Natriumuranylacetat. Zur eindeutigen Identifizierung wurde ein Teil der Säure in das p-Toluidid übergeführt. Schmelzp. = 146°, Mischschmelzpunkt mit Aceto-p-toluidid = 147°.

Die Mannane II, III und IV wurden in der bei Mannan I angegebenen Art verseift. Sie enthalten ebenfalls ein Äquivalent Säure auf 10 bzw. 11 Mannosen. Die Analysen, die in der folgenden Tab. 12 zusammengestellt sind, stimmen mit denen der unverseiften Produkte überein.

¹⁾ Vgl. in Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. II, S. 382.

Tabelle 12
Analysen der verseiften Salepmannane

Substanz	% C	% H	% Säure (COOH)	Zahl der Mannosen, auf die eine Säure kommt
Mannan I	44,15	6,18	2,8	10,0
Mannan II	44,33	6,49	2,4	11,5
Mannan III	44,24	6,25	2,4	11,5
Mannan IV	44,41	6,37	2,8	10,0

Aus diesem Grunde ist es als unwahrscheinlich anzusehen, daß durch die Behandlung mit Natronlauge noch eine weitere Veränderung der Substanzen stattfindet. Die Kettenlänge bleibt ebenfalls nahezu erhalten, wie ein Vergleich der η_{sp}/c -Werte vor und nach der Verseifung zeigt (vgl. Tab. 13).

Tabelle 13

Vergleich der spez. Viscositäten von Salepmannanen in Schweizer's Reagens + Ammoniumbicarbonat vor und nach der Verseifung

Substanz	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ unverseift	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ verseift
Mannan I	0,60	0,55
Mannan II	0,45	0,40
Mannan III	0,33	0,30
Mannan IV	0,10	0,10

Nach allen bisherigen Versuchen muß man also annehmen, daß der geringe Gehalt von etwa 3,5% Essigsäure die Wasserlöslichkeit der Salepmannane hervorruft. Bei anderen Pflanzenschleimen¹⁾ scheinen Schwefelsäure und eventuell auch Kieselsäure einen ähnlichen Einfluß auszuüben.

Für die großzügige Förderung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Staudinger auch an dieser Stelle verbindlichst. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Reichsforschungsrat schulde ich Dank für die Gewährung von Mitteln, die die Ausführung der Untersuchung ermöglichten.

¹⁾ Haas u. Hill, Biochem. J. 15, 469 (1921).