

Untersuchungen über Agar

Von

C. NEUBERG und C. H. SCHWIETZER

Aus der biologisch-chemischen Forschungsanstalt Berlin

Mit 4 Figuren im Text

(Eingegangen am 31. 8. 1937. Eingesandt zur Sitzung am 14. 10. 1937)

Die chemische Natur des Agars ist trotz mannigfach mit ihm ausgeführter Untersuchungen und trotz seiner vielfältigen Verwendung keineswegs aufgeklärt. Galt er früher einfach als ein komplexes Polysaccharid, an dessen Aufbau neben Galaktose noch Pentosen und Methylpentosen beteiligt sein sollten, so zeigten zunächst die Untersuchungen von C. NEUBERG und H. OHLE¹, daß im Agar unerwarteterweise eine Ester-schwefelsäure vorliegt; ihre sauren Valenzen sind vorwiegend durch Calcium abgesättigt. Dieser überraschende Befund wurde bald darauf von M. SAMEC und V. ISAJEVIĆ² bestätigt. Weiter ergab sich, daß eine Reihe von Pflanzenschleimen³ genau wie der Agar als Kohlenhydrat-schwefelsäuren anzusprechen sind; dies wurde besonders durch die Arbeiten der englischen Forscher B. RUSSEL-WELLS und P. HAAS⁴ klargestellt. Der natürliche Agar enthält rund 1'2% Schwefel⁵, was einem Gehalt von 3'0% SO₃ entspricht.

Systematische Versuche, aus gewöhnlichem Agar Fraktionen mit höherem Schwefelgehalt zu bereiten, hat M. LÜDTKE⁵ ausgeführt. Durch Behandlung mit Wasserstoffsperoxyd in ammoniakalischer Lösung gewann er eine Verbindung mit 3% Schwefel; sie ist wohl unter einer teilweisen Zerlegung des Agarmoleküls oder durch Beseitigung von Begleitstoffen⁶ des Agars entstanden. Als zuckerartige Spaltungsprodukte des Agars konnte dieser Autor nur Galaktose nachweisen, und zwar zu 34%. Nach späteren Untersuchungen von E. TAKAHASHI und K. SHIRAHAMA⁷ läßt sich

¹ C. NEUBERG und H. OHLE, *Biochem. Z.* **125** (1921) 311.

² M. SAMEC und V. ISAJEVIĆ, *Chem. Zbl.* (1922) I, 1113; (1923) III, 970.

³ A. CHARRIN und A. DESGREZ [*C. R. Acad. Sci. Paris.* **126** (1898) 596] haben zuerst die Gegenwart von S in pflanzlichen Schleimstoffen beobachtet.

⁴ B. RUSSEL-WELLS, *Biochem. J.* **16** (1922) 578; P. HAAS und B. RUSSEL-WELLS, *Biochem. J.* **17** (1923) 696.

⁵ M. LÜDTKE, *Biochem. Z.* **212** (1929) 419.

⁶ Es tritt vollkommene Bleichung des ursprünglich gelblichen Materials ein.

⁷ E. TAKAHASHI und K. SHIRAHAMA, *Journ. of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imp. University* **35** (1934) II, 101; *Chem. Zbl.* (1935) II, 2222.

durch Erhitzung des nativen Agars mit Wasser unter Druck bei 140° eine Aufteilung in zwei Fraktionen erzielen, die durch ihre Löslichkeit getrennt werden können. Sie wurden als δ - und λ -Hydrato-Kantensäure bezeichnet; von ihnen enthielt die in kaltem Wasser unlösliche δ -Form 0·27 % Schwefel, die in kaltem Wasser und verdünntem Alkohol lösliche λ -Form 2·09 % Schwefel. Als sichere Kohlenhydrat-komponente geben die japanischen Forscher ebenfalls Galaktose an, deren Menge sie in Übereinstimmung mit LÜDTKE zu 33- bzw. 39 % errechnen. In der löslichen Modifikation (λ) war eine kleine Quantität Pentose zugegen. Uronsäure, die neuerdings in vielen vegetabilischen Produkten gefunden ist, wurde in beiden Fraktionen vermißt; die Naphthoresorcin-reaktion verschwand jedenfalls mit fortschreitender Reinigung.

Die nachstehend beschriebenen Untersuchungen hatten folgende Ziele und Ergebnisse:

1. *Einfache Art der Aufteilung des Agars lediglich durch schonende Behandlung mit kaltem Wasser.* Die dabei⁸ gewonnene lösliche Fraktion A wurde weiter aufgeteilt in die Untergruppen A_1 mit 3·6 % S, A_2 mit 4·8 % S, A_3 mit 6·0 % S und A_4 mit 3·8 % S. Die wasserunlösliche Fraktion B wurde unterteilt in B_1 und B_2 , die beide praktisch schwefelfrei sind.

2. *Hydrolytischer Abbau des nativen Agars unter Bedingungen, bei denen die in organischer Bindung vorhandene Schwefelsäure nicht losgelöst wird.* Dies wurde durch Behandlung mit Bromwasserstoffsäure bei 25° erreicht. Isoliert wurde das lösliche Bariumsalz einer Säure, in der 4·3 % Schwefel zugegen waren (Substanz H).

3. *Enzymatischer Abbau der schwefelreichsten Agarfraktion A_3 allein durch sulfatatische Abspaltung von Schwefelsäure, ohne daß es zur Bildung reduzierender Substanzen kommt.*

4. *Hydrolyse des durch Abbau mittels Bromwasserstoffsäure bereiteten Ester-sulfats (H) durch Sulfatase, wobei gleichzeitig reduzierender Zucker auftrat.*

5. *Künstliche Sulfurylierung des Agars, d. h. Einführung weiterer Schwefelsäure-reste.* Dabei entstand eine Substanz mit 17·9 % Schwefel; sie enthielt also fast dreimal mehr S, als die schwefelreichste Fraktion A_3 mit 6 % Schwefel aufweist. Dieses Sulfurylierungs-

⁸ Beim Erhitzen des Agars mit Wasserdampf im Druckautoklaven finden Veränderungen statt; so erfolgt beispielsweise eine hydrolytische Abspaltung von H_2SO_4 , wie HOFFMANN und GORTNER [Journ. biol. Chem. 65 (1925) 371] festgestellt haben.

produkt zeigte eine deutliche *Heparin-wirkung*. (Siehe experiment. Teil S. 65.)

I.) Durch die im experimentellen Teil genauer beschriebene Art der Fraktionierung wurden 6 Anteile A_{1-4} und B_{1-2} erhalten.

Schüttelt man Agar mit 25 Teilen Wasser, so quillt er stark auf. Das Gemisch wird zentrifugiert. Der Rückstand besteht aus zwei mit dem Auge unterscheidbaren Anteilen. Der eine haftet fest am Boden des Zentrifugenbechers und bildet eine grobe, körnige Masse. Darüber ist eine schleimige Schicht gelagert. Beide Anteile können mechanisch angenähert getrennt werden. Die Fraktionen B_1 und B_2 sind praktisch schwefelfrei.

Behandelt man die *schleimige Fraktion* B_1 mit viel heißem Wasser, so löst sie sich hierin auf. Sie läßt sich durch Alkohol wieder ausfällen und geht in ein schwach graustichiges Pulver über, das schwer in heißem Wasser löslich ist, nahezu keinen Schwefel enthält und äußerst schnell gelatiniert. (Substanz B_1 .) Das Gelatinierungsvermögen hängt also kaum mit der Anwesenheit von Schwefelsäure-resten zusammen (vgl. hierzu M. SAMEC, l. c.).

Der *körnige Anteil* B_2 wird in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht; dabei nimmt er die Konsistenz von Lamellen an, die gelblich gefärbt sind. Die Fraktion ist jetzt in heißem Wasser beträchtlich löslich, und zwar leichter als der gelatinöse Anteil. Die wässrige Lösung läßt sich mit Alkohol fällen, wobei ein rein weißes Produkt B_2 entsteht. Dies ist ebenfalls fast frei von Schwefel. Auch das ausgefallte Produkt löst sich gut wieder in Wasser, und die wässrige Flüssigkeit geliert gleichfalls schnell und kräftig.

Die wässrige Lösung⁹ des mit kaltem Wasser behandelten Agars wurde im FAUST-HEIMSchen Verdunstungskasten bei 35° eingengt, nochmals filtriert und mit Alkohol versetzt. Dabei fällt eine Substanz (A_1) in weißen Flocken aus, die zu Boden sinken und leicht abzentrifugiert werden können. Nach Umfällung aus wässriger Lösung mit Alkohol, erneutem Abzentrifugieren, Waschen mit absolutem Alkohol, Äther und Aceton resultiert ein weißes Pulver. Dasselbe ist auch nach diesen Behandlungen in Wasser glatt löslich. Diese Substanz A_1 ist schwefelreich; sie enthält 3,6% Schwefel. Die Lösung ist nicht gelierungsfähig.

⁹ Daß ein Teil des Agars mit kaltem Wasser in Lösung gebracht werden kann, haben schon vor Jahren W. F. COOPER, B. A. CANTAB und W. H. NUTTAL [Chem. Zbl. (1908) II, 182] angegeben; vgl. hierzu Patent Kl. 30 h. Nr. 272 145 von E. MERCK [Chem. Zbl. (1914) I, 1390].

Die Substanz A_1 läßt sich nun weiter fraktionieren.

a) Gibt man zur wässerigen Lösung Bleiessig, so fällt eine weiße Verbindung als dicker Niederschlag aus, der sich leicht abzentrifugieren läßt und mit Wasser gewaschen wird, worin er unlöslich ist. Die gewaschene Bleiverbindung wird in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat von Bleisulfid ist wasserklar; es wird im Vakuum eingeeengt und mit Alkohol gefällt. Dabei setzt sich eine weiße flockige Substanz A_2 von Säurecharakter ab. Sie läßt sich leicht abzentrifugieren und weist nach dem Trocknen einen Gehalt von 4'8% Schwefel auf. (Substanz A_2 .)

b) Diese neue Verbindung läßt sich durch Behandlung mit salzsaurem Chinidin in zwei Anteile zerlegen. Das Alkaloid bildet mit einem Anteil eine vermutlich salzartige Verbindung. Diese ist eine dicke pastenartige nicht gallertige Masse, die sich aber trotz dieser Konsistenz nach zweitägigem Warten gut absetzt und abzentrifugiert werden kann. Der Niederschlag wird mit kaltem Wasser gewaschen und dann mit verdünnter Salzsäure zerlegt. Beim Schütteln geht alles in Lösung, und auf Zugabe von Alkohol entsteht ein Niederschlag, der durch Zentrifugieren gesammelt und mit Alkohol gewaschen wird. Nach Behandlung mit absolutem Alkohol und Aceton liegt ein weißes Pulver A_3 vor, das in Wasser leicht löslich ist und auf Kongo sauer reagiert (p_H der 1%igen wässerigen Lösung = 2). Die Lösung geliert weder als solche noch nach Neutralisation mit Natronlauge. Die Verbindung enthält rund 6% S. (Substanz A_3 .)

Der mit Chinidinhydrochlorid nicht fällbare Anteil wird eingeeengt, filtriert und mit Alkohol in gleicher Weise behandelt. Es resultiert auch hier eine weiße Verbindung A_4 ; sie enthält 3'8% Schwefel, in wässriger Lösung ist sie gleichfalls nicht gelierungsfähig.

II.) Trägt man Agar (1 Teil) in 13'5 Teile 24%iger Bromwasserstoffsäure ein und läßt über Nacht bei 25° stehen, so erfolgt Verflüssigung. Die gelbbraune Lösung wird vorsichtig mit Bariumcarbonat genau neutralisiert und filtriert. Die klare, schwach gelbe Flüssigkeit wird im FAUST-HEIMschen Apparat auf etwa die Hälfte eingeeengt und mit der 4—5fachen Menge Alkohol versetzt. Es fällt ein Bariumsalz aus, das durch zweimaliges Auflösen in Wasser und zweimalige Wiederausfällung jetzt mit Methylalkohol frei von Bariumbromid erhalten wird. (Bariumbromid löst sich leicht in Äthylalkohol und Methylalkohol.) Die

schließlich mit Aceton gründlich verriebene Substanz bildet ein weißes Pulver, das in Wasser löslich ist. Ausbeute mehr als 10 % des verwendeten Agars. Dieses Hydrolyse-produkt enthält 3'8—4 % Schwefel oder 4'3 % ber. auf freie Säure. (Substanz *H*.) Im Gegensatz zum Agar und seinen vorhin erwähnten Fraktionierungsprodukten reduziert die Verbindung FEHLINGSche Mischung, wenn auch schwach.

An dieser Stelle sei bemerkt, daß durch einfaches Kochen mit Salzsäure, auch in Gegenwart von Salpetersäure (Königswasser), aus den erwähnten Agarfraktionen nicht aller durch Soda-Salpeter-schmelze ermittelter Schwefel als Schwefelsäure erhalten wurde¹⁰.

Mit Sicherheit ist als hydrolytisches Spaltungsprodukt der Kohlenhydratreihe in allen Fällen nur Galaktose ermittelt, und zwar machte ihre Menge überall rund $\frac{1}{3}$ des Materials aus. Es bleibt ungeklärt, welche Bestandteile der Agar außerdem enthält¹¹. Ein von anderen Autoren¹² angegebener Gehalt an Methylpentosen oder Pentosen konnte nicht beobachtet werden¹³.

III.) Neuerdings sind mehrere *Sulfatasen*¹⁴ in der Natur aufgefunden, die auf die einzelnen Typen der Ester-schwefelsäuren eingestellt sind. Die vom Bakterium *fluorescens non liquefaciens* produzierte Sulfatase vermag die vorhin erwähnte schwefelreiche Fraktion *A*₃ des Agars sulfatatisch zu zerlegen. Dabei wurden 33 % des Estersulfat-Schwefels mineralisiert, ohne daß reduzierende Substanz auftrat.

IV.) Die durch Bromwasserstoffsäure erhaltene Verbindung, die schon ein Abbauprodukt darstellt, wurde ebenfalls durch das

¹⁰ Auch F. FAIRBROTHER und H. MASTIN [Chem. Zbl. (1924) I, 1331] haben bei verschiedenen Arten der S-Bestimmungen Unterschiede beobachtet.

¹¹ Nach N. W. PIRIE [Biochem. J. 30 (1936) 369] beteiligt sich wahrscheinlich außer *d*-Galaktose auch *l*-Galaktose am Aufbau von Agar.

¹² Z. B. von H. MATSUI [Chem. Zbl. (1925) I, 1329]. Er hat allerdings mit einem Agar gearbeitet, der aus einem Gemisch von versch. Algen gewonnen war.

¹³ Nach W. L. NELSON und L. H. CRETCHER [Chem. Zbl. (1932) I, 1913] ist der Hauptbestandteil der Alge *Macrocystis pyrifera* der Schwefelsäure-ester eines Fucose-tetrasaccharids; aus der Alge *Irideae laminarioides* erhielt W. Z. HASSID [Chem. Zbl. (1933) II, 3580; (1936) II, 1933] das Natriumsalz einer Galactan-schwefelsäure. Die Zusammensetzung und insbesondere der S-Gehalt der Algen schwankt nach M. R. BUTLER [Chem. Zbl. (1934) II, 3772] mit Fundort und Jahreszeit.

¹⁴ C. NEUBERG und E. HOPMANN, Biochem. Z. 234 (1931) 345; C. NEUBERG und W. M. CAHILL, Enzymologia. 1 (1936) 22. Lit. s. auch bei C. NEUBERG und E. SIMON, „Sulfatasen“. Ergebn. d. Physiolog. 34 (1932) 896. — Bemerkte sei, daß verschiedene Vertreter der *Fluorescens*-Gruppe Sulfatase hervorbringen.

Enzym angegriffen. Ungefähr $\frac{1}{4}$ des organisch gebundenen Schwefels wurde mineralisiert; das Reduktionsvermögen stieg stark durch Behandlung mit dem Ferment und man erhielt 30 % Galaktose. Allerdings ging die enzymatische Spaltung nur langsam vonstatten; die erwähnten Ergebnisse wurden nach 47tägiger Digestion bei 35° festgestellt.

V.) Ferner wurden zwei unterscheidbare, Agarprodukte angreifende Bakterien isoliert, und zwar so, daß die wässerigen Lösungen der beiden erwähnten, sulfatatischem Abbau zugänglichen Substrate an der Luft stehen blieben und von den angesiedelten Mikroben Reinkulturen gezogen wurden. Die bakteriologischen Arbeiten haben dankenswerterweise Frl. E. WEISS und Frl. M. BULLMANN ausgeführt. Die Erreger gehörten allem Anscheine nach der Fluorescens-gruppe an, ohne mit dem typischen *B. non liquefaciens* identisch zu sein. Beide Bakterienarten wirkten sulfatatisch, erzeugten aber keine reduzierende Substanz. Der *Bacillus gelaticus*, der von GRAN gezüchtet ist und nach Angabe des Autors Agar verflüssigt, war uns bislang nicht zugänglich; sein Verhalten soll gelegentlich geprüft werden.

VI.) In den an sich schwefelhaltigen Agar lassen sich durch Sulfurylierung weitere Schwefelsäure-reste einführen. Dies gelingt durch Einwirkung von Chlorsulfonsäure auf eine Suspension des Agars in Pyridin-Chloroform nach einem Verfahren, das C. NEUBERG und L. LIEBERMANN¹⁵, T. SODA¹⁶ sowie R. TAMBA¹⁷ im Dahlemer Institut schon zur Sulfurylierung von Kohlenhydraten verwendet haben. Aus nativem Agar, der 1.2 % Schwefel enthielt, wurde hierbei eine Verbindung gewonnen, die 17.9 % Schwefel aufwies. Die per-sulfurylierte Substanz bildet als freie Säure ein weißes Pulver, das leicht löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol ist. Sie zeigt, wie erwähnt, einen gewissen Heparin-effekt, d. h. verzögernde Wirkung auf den Eintritt der Blutgerinnung.

Zu den letztgenannten Versuchen über die künstliche Sulfurylierung diente grob gekörnter Agar von MERCK, während in den übrigen Fällen ein nativer, aus Java stammender Agar verwendet wurde. Er lag in den bekannten Fasern vor; er war vor Jahren dem einen von uns durch Vermittlung der Notgemeinschaft d. dtsh. Wissenschaft zum Geschenk gemacht. Über die Einheitlichkeit der Handelsprodukte läßt sich leider nichts aus-

¹⁵ C. NEUBERG und L. LIEBERMANN, *Biochem. Z.* **121** (1921) 326.

¹⁶ T. SODA, *Biochem. Z.* **135** (1923) 621.

¹⁷ R. TAMBA, *Biochem. Z.* **141** (1923) 274.

sagen. Somit (s. S. 50) sind alle damit angestellten Versuche mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, und es ist zu wünschen, daß sie mit Materialien von eindeutiger Herkunft, bestimmtem Standort und definierter Vegetationsperiode kontrolliert und ergänzt werden, wenn auch deren Beschaffung mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

Experimenteller Teil.

I. Aufteilung von Agar durch Behandlung mit kaltem Wasser.

240 g Agar, die etwa 40 g Wasser enthielten, wurden in kleine Stücke geschnitten und 20 Stunden lang in einer großen Schliff-Flasche mit 5 Litern destillierten Wassers und 5 cm³ Toluol unter Beigabe von Glasperlen kräftig geschüttelt. Nach Beendigung der Schüttelung wurde das Ganze durch ein Sieb gegeben, wobei der ungelöste Agar mit den Glasperlen zurückblieb. Die abgeseigte Flüssigkeit war mit einem breiähnlichen schleimigen Niederschlag durchsetzt, der abzentrifugiert wurde. Die überstehende schwach gelbliche klare Lösung wurde im FAUST-HEIMSchen Verdunstungskasten bei 40° auf ungefähr einen Liter eingengt, filtriert und dann in 5 l Äthylalkohol eingegossen. Hierbei fiel eine grobe, flockige Masse aus, deren Sedimentierung mit Hilfe von etwas Ammoniumchlorid beschleunigt wurde.

Nach dem Abdekantieren des Alkohols wurde der Niederschlag abzentrifugiert. Die weiße Masse wurde möglichst von Alkohol befreit, aber noch feucht in 1 l warmen Wassers gelöst. Die filtrierte Flüssigkeit wurde wiederum mit 5 l Äthylalkohol gefällt, dann wurde dekantiert und zentrifugiert. Der farblose Niederschlag wurde jetzt zweimal mit Aceton durchgeknetet, vom Aceton abgesogen und einen Tag im Vakuumexsiccator über Paraffin und Calciumchlorid getrocknet. Es hinterblieben 17,5 g einer rein weißen Substanz (A₁). Ausbeute daran rund 9% vom Ausgangsmaterial.

Bei der Veraschung, die unter Zugabe weniger Tropfen Salpetersäure ausgeführt wurde, blieben 6% Rückstand.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden 57 mg des absolut trockenen Materials in 20 cm³ Wasser unter gelindem Erwärmen gelöst.

$$[\alpha]_D = -33.33^\circ$$

$$(\alpha = -0.19^\circ, l = 2, c = 0.285).$$

Zur Gesamt-Schwefel-bestimmung wurde die Substanz A_1 mit der zehnfachen Menge Soda-Salpeter-mischung geschmolzen. In guter Übereinstimmung mehrerer Analysen sind 3·8% *Gesamt-Schwefel* gefunden.

Aus gekörntem Agar (MERCK) hergestelltes Produkt A_1 : 0·1397 g Substanz gaben 0·0394 g $BaSO_4$ = 3·87% S.

Aus javanischem Faden-agar dargestelltes Produkt A_1 : 0·1844 g Substanz gaben 0·0495 g $BaSO_4$ = 3·68% S.

Die Verbindung reduzierte FEHLINGSche Mischung nicht. Die MOLISCH-Reaktion war positiv. Mit Sulfosalicylsäure-lösung trat keine Trübung ein. Von Kationen war Calcium zugegen.

Nach Hydrolyse der Substanz mit verdünnter Salzsäure ließ sich freies Sulfat nachweisen, und zugleich fiel die FEHLINGSche Probe positiv aus. Die Zunahme der Reduktionskraft geht aus *Kurvenbild 1* hervor.

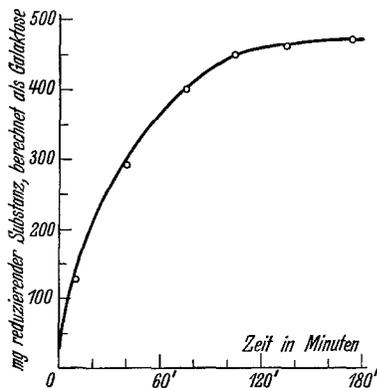
Die Verbindung ist als Calcium-salz einer Polysaccharid-ester-schwefelsäure aufzufassen.

Um festzustellen, ob sämtlicher *Schwefel* in Form eines leicht spaltbaren Ester-sulfats vorlag, wurde folgender Hydrolysen-versuch ausgeführt.

0·3848 g der Substanz A_1 wurden $3\frac{1}{2}$ Stunden mit 50 cm^3 3·5% iger Salzsäure im siedenden Wasserbade behandelt. Die Flüssigkeit wurde mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt, filtriert und in der Hitze mit Bariumchlorid versetzt. Der hierbei als Bariumsulfat (0·0898 g) ausgefallte Schwefel betrug 3·2% auf die Gesamtsubstanz berechnet; ihr Gesamt-Schwefel war — wie erwähnt — zu 3·8% gefunden.

Hydrolysen, die mit starker Salpetersäure oder konz. Salzsäure oder mit einer Mischung beider durch Kochen über offener Flamme vorgenommen wurden, führten bei diesem Agarmaterial zu einer Sulfat-enspaltung, die einem Durchschnittswerte von 3·25% Schwefel entsprach.

Zur Feststellung der *Zucker-komponente* wurden 1·3 g der Substanz A_1 mit 50 cm^3 5% iger Schwefelsäure $3\frac{1}{2}$ Stunden auf dem Wasserbade hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Barium-



Kurve 1. Kurve für die Hydrolyse der Lösung des Ca-Salzes der Ester-schwefelsäure A_1 in 0·1 n-Schwefelsäure (Erhitzung am Rückflußkühler). Reduktionsbestimmungen nach LEHMANN-MAQUENNE.

carbonat und Abfiltrieren vom BaSO_4 und BaCO_3 wurde die wässrige Lösung im Vakuum auf 20 cm^3 eingengt. Diese wurden nach den Angaben von C. NEUBERG und M. LÜDTKE¹⁸ mit 15 cm^3 Methyl-phenylhydrazin in 20 cm^3 Äthylalkohol unter Zugabe weniger Tropfen Essigsäure versetzt. Nach Einimpfung einer Spur von *d*-Galaktose-methyl-phenylhydrazon wurde die Mischung nunmehr in den Eisschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurden die ausgeschiedenen weißen Kristalle abgesaugt, mit wenig gekühltem Alkohol gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt, von dem 530 mg erhalten wurden, zeigte den Schmelzpunkt 187° . Durch Umkristallisieren nach den Angaben von NEUBERG (l. c.) resultierten rein weiße Kristalle vom Schmp. 189° . Es handelt sich also um Galaktose-methyl-phenylhydrazon. Die 530 mg Hydrazon entsprechen 340 mg Galaktose; das sind 26% des Ausgangsmaterials (13 g der Substanz A_1). Wurde die Mutterlauge eingengt und mit absolutem Methylalkohol versetzt, so schieden sich erneut 120 mg Hydrazon aus. Diesen entsprechen 76 mg Galaktose, die 6% des Ausgangsmaterials ausmachen. Im ganzen wurden also 32% vom Gewicht der Substanz A_1 als Galaktose gefunden.

Die Menge der abspaltbaren Galaktose wurde noch auf andere Weise ermittelt.

Bei Oxydation von 400 mg der Substanz A_1 mit Salpetersäure nach der Methode von CREYDT, TOLLENS und KENT¹⁹ wurden 626 mg Schleimsäure erhalten, die 110 mg Galaktose = 28% des Ausgangsmaterials anzeigen.

Ein weiterer Kontrollversuch wurde folgendermaßen ausgeführt. 213 g der Substanz A_1 wurden mit 100 cm^3 $n/10\text{ H}_2\text{SO}_4$ 5 Stunden hydrolysiert. Zu dem von H_2SO_4 mit Baryt befreiten und eingengten Hydrolysat wurde die etwa 20fache Menge Alkohol hinzugegeben. Nach mehrtägigem Stehen der klar filtrierten Flüssigkeit im Eisschrank hatte sich beinahe $1/4$ vom Gewicht des Ausgangsmaterials als kristallisierte *d*-Galaktose abgeschieden. Sie war direkt rein; $[a]_D = +79^\circ$ (anstatt $+80^\circ$).

Die Beobachtung, daß die wässrige Lösung der Substanz A_1 mit Bleiessig einen weißen voluminösen Niederschlag lieferte, legte den Gedanken nahe, über das Bleisalz eine Reinigung der

¹⁸ C. NEUBERG, Biochem. Z. 3 (1907) 531; M. LÜDTKE, Biochem. Z. 212 (1929) 419.

¹⁹ Siehe bei C. NEUBERG „Der Harn“, S. 414; A. W. VAN DER HAAR, Anleit. Berlin 1920, S. 125.

Substanz vorzunehmen und so eine schwefelreichere Fraktion zu gewinnen.

Die Verbindung A_1 wurde in warmem Wasser gelöst und mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und noch feucht mit einer reichlichen Menge dest. Wassers angerieben. In die Suspension wurde bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang Schwefelwasserstoff unter Druck eingeleitet. Dann wurde vom Bleisulfid abfiltriert und die Lösung, in der etwas kolloidales PbS verteilt war, unter Zugabe von Filtrierpapier-schnitzeln kurz aufgeköcht. Das nunmehr blanke Filtrat wurde im Vakuum stark eingeengt und darauf, wie für die Darstellung von Substanz A_1 beschrieben ist, in die fünffache Menge Äthylalkohol eingegossen. Die ausgefallene weiße Verbindung wurde abgesaugt, flüchtig getrocknet, abermals in Wasser gelöst, wiederum durch Äthylalkohol abgeschieden und zweimal mit Aceton verrieben. Die abgeschleuderte Substanz wurde im Vakuumexsiccator über Paraffin und Calciumchlorid getrocknet.

Ein Anhalt über die Zusammensetzung der Substanz A_2 wurde mit den für Substanz A_1 benutzten Methoden gewonnen. Es ergab sich wiederum ein Galaktose-gehalt von ungefähr 33 %, indessen der Schwefel-gehalt auf 4·9 % gestiegen war.

0·1827 g Substanz A_2 lieferten 0·0652 g $\text{BaSO}_4 = 4·905\%$ S.

Auf die Fähigkeit der soeben erwähnten Substanz A_2 , in der Wärme mit salzsaurem Chinidin eine weiße, pastenartige Verbindung zu bilden, gründet sich die Möglichkeit, eine weitere Reinigung unter gleichzeitiger Anreicherung an Schwefel durchzuführen.

1 g der Substanz A_2 wurde in 100 cm^3 heißem Wasser gelöst; hinzu wurden 5 g Chinidin-hydrochlorid in 300 cm^3 heißem Wasser gegeben. Aus dem zunächst dicklich getrübten Gemisch hatte sich nach 24 Stunden eine am Boden des Gefäßes haftende pastenartige Schicht abgesetzt. Von dieser wurde abdekantiert. Der Niederschlag wurde zur Entfernung des Fällungsmittels mehrmals mit absolutem Alkohol gewaschen. Der Rückstand wurde in 100 cm^3 verdünnter Salzsäure in der Kälte gelöst und mit der fünffachen Menge Äthylalkohol versetzt. Es schied sich ein schwach gelber, flockiger Niederschlag aus, der abzentrifugiert, viermal mit Alkohol und viermal mit Aceton gewaschen wurde. Die vom Aceton getrennte Substanz wurde im Vakuumexsiccator getrocknet. Es resultierten pro Ansatz 0·2 g eines schwach gelben Pulvers, das sich gegen 155° zersetzte (Substanz A_3).

Am Aufbau dieses Körpers war gleichfalls Galaktose, und zwar zu 32%, beteiligt; der Schwefelgehalt war bis auf 6% angestiegen.

0.1394 g Substanz A_3 gaben 0.0618 g $BaSO_4 = 6.09\%$ S.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden 0.1520 g in 20 cm³ Wasser unter gelindem Erwärmen gelöst.

$$[\alpha]_D = 28.3^\circ$$

$$(a = 0.43, l = 2, c = 0.76).$$

Die Substanz A_3 reagierte stark sauer; $p_H = 2$ in 1% iger Lösung.

Die von der ausgefallenen Alkaloidverbindung (s. S. 49 u. 55) abgeessene Flüssigkeit (400 cm³) wurde im Vakuum eingeengt, bis überschüssiges Chinidinhydrochlorid auszukristallisieren begann. Die Lösung wurde dann mit der fünffachen Menge Äthylalkohol versetzt, wobei sich ein farbloser, flockiger Körper abschied. Ungefähr wie Substanz A_3 wurde er durch wiederholtes Umfällen mit Alkohol aus schwach salzsaurer wässriger Lösung und Waschen mit Aceton gereinigt. Ausbeute: 0.25 g an einem rein weißen Pulver, das sich gegen 230° zersetzte, rund 1/3 seines Gewichts Galaktose lieferte und 3.87% Schwefel aufwies.

Die Substanz A_4 reagierte in wässriger Lösung gegen Lackmus schwach sauer.

Den beiden zuletzt beschriebenen Substanzen A_3 und A_4 ähnliche Körper erhielten wir in der selben analytischen Zusammensetzung durch die gleiche Behandlung des ursprünglichen wässrigen Extraktes aus Agar, ohne daß dieser Anteil zunächst über das Bleisalz (Substanz A_2) gereinigt war.

Wie angegeben, können aus dem Kaltwasserextrakt von nativem Agar durch Alkohol etwa 10% vom Gewichte des Ausgangsmaterials in fester Form abgeschieden werden. Der bei der Wasserextraktion verbliebene Rückstand bestand aus 2 deutlich unterscheidbaren Komponenten. Die eine zeigte körnige Struktur, die andere bildete eine weiche schleimige Masse.

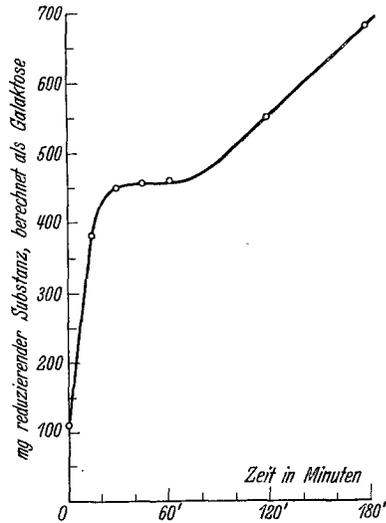
Die mechanisch abgetrennte schleimige Fraktion (s. S. 48 u. 52) wurde mit 2 Litern Wasser auf dem Wasserbade unter Turbinieren erhitzt; dann wurde schnell dekantiert und abgeschleudert. Das Zentrifugat war klar und nach dem Abkühlen schon in der Verdünnung stark viskos. Nach dem Einengen wurde mit der vierfachen Menge Methanol und 1 Teil Aceton versetzt, wobei eine weiße gallertige Masse entstand. Wie in den anderen Versuchen wurde diese abzentrifugiert, durch Lösen in viel Wasser, Wiederausfällung durch Alkohol und Waschen mit Aceton gereinigt. Die

analytischen Kennzeichen waren ein Gehalt von rund 35 % Galaktose und 0,8 % Schwefel. Die Materialausbeute war gering, weil sich der Schleim selbst in der Hitze nur wenig in Wasser gelöst hatte.

Da diese Substanz B_1 mit Bleiessig lediglich eine schwache Trübung ergab, war wohl anzunehmen, daß der geringe Schwefelgehalt einer Verunreinigung zuzuschreiben sei; daher wurde die Substanz B_1 in viel siedendem Wasser gelöst und gerade solange mit Bleiessig versetzt, bis kein

Niederschlag mehr auftrat. Hierbei wurde der schwefelhaltige Begleiter tatsächlich entfernt, während die schwefelfreie Substanz B_1 in Lösung blieb. Vom Bleisalz wurde abfiltriert und das klare Filtrat mit H_2S entbleit. Nach Abfiltrieren des Schwefelbleis wurde das Filtrat eingeeengt. Der mit Methanol erzeugte Niederschlag wurde in der schon mehrfach erwähnten Weise umgefällt und gereinigt. Er bildete ein schwach graues Pulver, in dem nur noch Spuren von Schwefel

zugegen waren. Die Hydrolysenkurve (s. Kurvenbild 2) dieser schwefelfreien Substanz rechte-



Kurve 2. Kurve für die Hydrolyse der schwefelfreien Substanz B_1 . Die 1% ige Lösung der Substanz in 0,1 n-Schwefelsäure wurde am Rückflußkühler gekocht. Reduktionsbestimmungen nach LEHMANN-MAQUENNE.

fertigte vielleicht die Annahme des Vorhandenseins einer zweiten Zuckerkomponente in diesem Polysaccharid. Um diese zu charakterisieren, wurde 1 Teil des bei der Wasserextraktion von Agar erhaltenen Schleimstoffes mit 10 Teilen 5% iger Schwefelsäure 15 Stunden lang bei Siedetemperatur hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit Bariumcarbonat und folgender Filtration wurde die Flüssigkeit stark eingeeengt. Mit Äthanol konnte eine geringe Menge einer weißen Substanz ausgefällt werden. Sie gab bei Anstellung der Probe nach NEUBERG und KOBEL²⁰ eine einwandfreie Uronsäure-reaktion. Bei 3-minütiger Erhitzung mit Naphthoresorcin und 50% iger Schwefelsäure im Wasserbade traten die bekannten Flocken auf, die in Toluol oder Benzol mit leuchtend violetter Farbe übergangen.

²⁰ C. NEUBERG und M. KOBEL, Biochem. Z. 243 (1931) 435.

Bei dieser Gelegenheit sei die Beobachtung mitgeteilt, daß im Handel Sorten von *vergälltem* Spiritus vorkommen, mit denen die Naphthoresorcinprobe fast typisch ausfällt. Reiner Weingeist zeigt die Farbreaktion natürlich nicht.

Durch 2-stündige Spaltung der Substanz mit 10 Teilen 10%iger Schwefelsäure im Rohr bei 140° (Ölbad) entstand eine Flüssigkeit, die ebenfalls eine Uronsäure-reaktion lieferte.

Der von dem schleimigen Bestandteil B_1 mechanisch abgetrennte körnige Anteil wurde in einer großen Porzellanschale auf dem Wasserbade eingetrocknet. Hierbei nahm er eine gelbbraune Farbe an und ließ sich in Gestalt lamellenartiger Blättchen aus der Schüssel herausnehmen. Die Blättchen waren in heißem Wasser gut löslich und enthielten wenig Schwefel. Wurde die wässrige Lösung in die zehnfache Menge Äthylalkohol eingegossen, so sanken schnell dicke, weiße Flocken zu Boden. Sie wurden abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit Aceton resultierte ein rein weißes, in Wasser leicht lösliches Pulver. Die wässrige Lösung dieser Substanz B_2 gelierte so stark, daß eine Abtrennung von einem noch in geringer Menge beigemischten Schwefelsäureester unmöglich war. Auch in dieser Substanz ließen sich etwa 30% Galaktose nach den verschiedenen Bestimmungsmethoden nachweisen. Das Schwefelsäure-hydrolysat der Substanz B_2 lieferte nach Neutralisation mit BaCO_3 usw. und Abtrennung der Galaktose (sie geschah durch Ausfällung mit Alkohol, Einengung der Mutterlauge im Vakuum sowie Extraktion des Rückstandes mit 95%igen Alkohol) mit Di-phenylhydrazin in alkoholischer Lösung nach 6-wöchigem Stehen im Eisschrank feine seidige Kristalle, die bei 178—180° (korr.) schmolzen. Zur Identifizierung reichte die Menge nicht aus.

In den Hydrolysaten der Fraktionen A_{1-4} sowie B_{1-2} wurde schließlich Galaktose noch mit der typischen Hefe *Saccharomyces fragilis* nachgewiesen. Während gewöhnliche Oberhefe nicht ansprach, trat mit der *Galaktose-hefe* überall Gärung ein; in keinem Falle wurde mehr Kohlendioxyd entwickelt, als einem Gehalt an 30% Galaktose gleichkam.

II. Partielle Hydrolyse von Agar mit Bromwasserstoffsäure.

In Wasser lösliche Produkte des Agars, die noch Ester-schwefelsäuren sind, lassen sich durch Behandlung mit Mineralsäuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Brom-

wasserstoffsäure, darstellen. Gut bewährte sich mit dem gleichen Volumen Wasser versetzte Bromwasserstoffsäure $D=1.49$.

120 g fein geschnittener Agar (d. s. 100 g Trockensubstanz) wurden mit 1350 cm³ Bromwasserstoffsäure übergossen (675 cm³ der konzentr., Säure, die zuvor mit dem gleichen Volumen dest. Wassers verdünnt war). Nach halbstündlicher Schüttelung blieb das Gemisch 14 Stunden bei 25° stehen. Nach Neutralisation mit Bariumcarbonat und Filtration wurde die Lösung, die hellbraun gefärbt war, im FAUST-HEIMSchen Verdunstungskasten auf ungefähr ein Liter eingengt. Die Lösung wurde nun in die 4- bis 5-fache Menge Äthylalkohol eingegossen, worin das Bariumbromid gelöst blieb, während ein weißer Niederschlag in groben Flocken ausfiel. Nach dem Umfällen aus wässriger Lösung nunmehr mit Methylalkohol und anschließendem Waschen mit Aceton und Äther hinterblieb ein rein weißes Pulver in einer Ausbeute von 14 g. (Substanz H.)

An anorganischen Bestandteilen enthielt diese Substanz Barium und Spuren von Calcium, Natrium, Kalium sowie Magnesium. Die Verbindung zersetzte sich gegen 260°. Sie reduzierte FEHLINGsche Mischung schwach, und ihr Schwefelgehalt schwankte bei verschiedenen Darstellungen zwischen 3.8 und 4%.

Das Reduktionsvermögen der Substanz H gegenüber FEHLINGscher Lösung wurde durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure um ein mehrfaches erhöht.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden 0.1817 g in 10 cm³ Wasser auf dem Wasserbade gelöst.

$$[\alpha]_D = -15.1^\circ,$$
$$(a = -0.55^\circ, l = 2, c = 1.817).$$

Nach 75 Minuten während der Hydrolyse sollten nach den Bestimmungsverfahren von LEHMANN-MAQUENNE 51% des Materials als Hexose vorliegen; indes waren nur 30% Galaktose mit Methylphenylhydrazin und nach der Schleimsäuremethode zu ermitteln. Eine Erfassung der reduzierenden Begleitstoffe wurde auf verschiedene Weisen versucht, doch erhielt man mit Phenylhydrazin, 2.4-Di-nitrophenylhydrazin und Di-phenylhydrazin keine brauchbaren Hydrazone bzw. Osazone.

III. Verhalten zu Sulfatase.

Nach den vorliegenden Erfahrungen²¹ konnte man eine sulfatatische Spaltbarkeit der aus Agar erhaltenen Schwefelsäureester am ehesten bei Einwirkung der Chondro-sulfatase erwarten;

²¹ Lit. s. bei NEUBERG und Mitarbeitern, S. 50.

denn diese Sulfatase, die aus dem *Bacterium fluorescens non liquefaciens* gewonnen wird, zerlegt auch andere Kohlenhydrat-schwefelsäure-ester. Das Enzym-material²² wurde nach den Angaben von C. NEUBERG und E. HOFMANN (l. c.) bereitet.

0'32 g Bariumsalz der Substanz *H* wurden mit 0'048 g Kaliumsulfat in das Kaliumsalz umgewandelt. Nach dem Abzentrifugieren vom Bariumsulfat wurde die Lösung auf 90 cm³ aufgefüllt und zu folgenden 3 Ansätzen verwendet.

- | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| α) 30 cm ³ Substratlösung, | β) 20 cm ³ Wasser, | γ) 20 cm ³ Substratlösung, |
| 0'3 g Enzym, | 0'2 g Enzym, | 0'65 cm ³ Toluol. |
| 1 cm ³ Toluol. | 0'65 cm ³ Toluol. | |

Nach 83 Stunden wurden aus den Gemischen, die während dieser Zeit im Brutschrank bei 35° gestanden hatten, je 10 cm³ abpipettiert und mit je 12 Tropfen Essigsäure versetzt. Die Proben wurden zur Abscheidung des (in α und β vorhandenen) Eiweißes auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins und Filtration erhielt man blanke Flüssigkeiten. In Probe α) konnte freies Sulfat nachgewiesen werden. Gleichzeitig hatte das Reduktionsvermögen gegenüber den Proben β und γ zugenommen.

Zur quantitativen Erfassung wurden folgende 2 Ansätze gemacht.

1.) 6 g des Kaliumsalzes der Substanz *H* wurden in 600 cm³ Wasser gelöst und mit 8 g Ferment sowie 6 cm³ Toluol versetzt. Unter wiederholtem Durchschütteln wurde das Gemisch 47 Tage im Brutschrank bei 35° belassen. Dann wurde enteiweißt und nicht umgesetztes Substrat sowie Ferment durch Zugabe der 5-fachen Menge Methanol ausgefällt. (Anorganisches Sulfat wurde dabei nicht mitgerissen.) Die methylalkoholische Lösung wurde sodann im Vakuum stark eingeengt und nochmals mit der 5-fachen Menge Methanol vermischt. Nach erneuter Filtration wurde die klare Lösung wiederum im Vakuum auf 20 cm³ konzentriert und mit der doppelten Menge 98%igen Äthylalkohols und 2'9 cm³ Methyl-phenylhydrazin versetzt. Das Gemisch blieb 15 Stunden lang im Brutschrank, wobei schon Hydratronkristalle ausfielen. Das Gefäß wurde nun in den Eisschrank gestellt. Nach 50 Stunden

²² Die Sulfatase, die verschiedene Hexose-schwefelsäure-ester angreift und von T. SODA und C. HATTORI [Proc. Imp. Acad. Tokyo. 7 (1931) 269] in japanischen Schnecken entdeckt ist, stand uns nicht zur Verfügung. Dieses Enzym schließt immer Pheno-sulfatase ein (T. SODA und F. EGAMI, Chem. Zbl. 1934 I, 1660), spaltet aber nach T. SODA (Chem. Zbl. 1934 II, 3262) mehrere Ester-sulfate niedrig molekularer Zucker.

wurde das gesamte Hydrazon abgesaugt, mit 20 cm³ kaltem Äthylalkohol gewaschen und über Phosphorpentoxyd 26 Stunden im Exsiccator getrocknet. Ausbeute: 1'06 g Galaktose-methylphenylhydrazon vom Schmp. 184°.

1'06 g Hydrazon entsprechen 0'67 g Galaktose, und da aus dem Substrat 33% Galaktose erhalten werden können, waren in den 47 Tagen 2 g Kaliumsalz der Substanz H, d. h. 1/3 der eingesetzten Menge, von der Chondro-sulfatase hydrolysiert worden.

Bei einem Schwefelgehalt von 3'2% könnten die 2 g umgesetztes Substrat 192 mg SO₄-Ionen liefern. Gefunden wurden 0'1030 g BaSO₄ = 0'0430 g SO₄ oder 23% der Theorie.

2.) Um den Verlauf der enzymatischen Spaltung verfolgen zu können, wurde noch folgender Ansatz angestellt.

5'04 g Bariumsalz der Substanz H wurden ins Kaliumsalz verwandelt; die Lösung des Kaliumsalzes wurde mit Wasser auf ein Volumen von 500 cm³ gebracht.

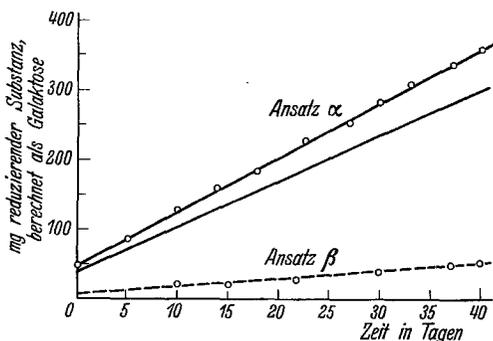
- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| α) 200 cm ³ der Lösung, | β) 100 cm ³ Wasser, |
| 2'5 g Enzym, | 1'25 g Enzym, |
| 5 cm ³ Toluol. | 2'5 cm ³ Toluol. |

Ein Bild vom Fortschreiten der enzymatischen Hydrolyse gibt Kurve 3.

Von den durch Fraktionierung des Agars gewonnenen Substanzen haben wir ferner die schwefelreichste, über das Chinidin-salz bereitete Substanz A₃ der Einwirkung von Chondro-sulfatase unterworfen und dieser zugänglich befunden.

Im Verlauf von einer Woche war die Abspaltung von Sulfat (angenähert 1/3 der theoretisch möglichen Menge) festzustellen; dabei war keine hydrolytische Bildung reduzierender Stoffe zu bemerken.

Des weiteren haben wir nach neuen *Bakterien* gefahndet, die Agar angreifen.



Kurve 3. Auf die Ordinate sind die mg reduzierender Substanz, berechnet als Galaktose, aufgetragen, auf die Abzisse die Zeiten in Tagen.

Die Gerade α zeigt die Zunahme der reduzierenden Substanz im Hauptversuch α (Substrat + Ferment). Die Gerade β veranschaulicht die Entstehung reduzierender Substanz im Kontrollversuch β als Folge einer Autolyse des Enzymmaterials. Durch Subtraktion der β-Werte von den entsprechenden α-Daten erhält man die absoluten Zahlen für den Hydrolysenverlauf in der Substratlösung. (Die geringen Abweichungen von den durch die Gerade dargestellten Werten liegen innerhalb der Fehlergrenzen.)

Zu diesem Zwecke wurde die Lösung von 1 g der Substanz A_3 in ca. 30 cm^3 Wasser mit Natronlauge auf p_H 7 gebracht und dann an einem warmen Orte offen an die Luft gestellt. Nach längerer Zeit hatten sich auf der inzwischen etwas eingedunsteten Flüssigkeit Bakterien angesiedelt. Durch Schüttelkulturen konnten vier Erreger differenziert werden.

Vorversuche ergaben sodann, daß die Stämme 1 und 2 die gewünschte Fähigkeit besaßen.

Zur Gewinnung hinreichender Mengen Bakterien-materials wurden je 50 Platten (Durchmesser ca. 20 cm) mit Fleisch-extrakt-Agar + 1 % Pepton gegossen; darauf wurden die Bakterien überimpft und 60 Stunden im Brutschrank bei 26° gezüchtet. Nunmehr wurden die Mikroben mit möglichst wenig Wasser ab-gespült. Eine direkte Zentrifugierung ließ sich wegen der äußerst feinen Verteilung der Organismen nicht durchführen.

Die Aufschwemmung von Bacterium 1 (400 cm^3) wurde mit 1200 cm^3 Methylalkohol und 400 cm^3 Äther im Mischzylinder geschüttelt. Das Bacterienmaterial sedimentierte dabei schnell in weißlichen Flocken.

Die Lösung wurde abdekantiert und der Rest abzentrifugiert. Der Rückstand wurde im Mörser mit Äther verrieben, in einer Flasche nochmals kräftig mit etwas absol. Alkohol enthaltendem Äther geschüttelt, worauf sich das wasserfreie Trockenpräparat gut abfiltrieren ließ. Die Ausbeute betrug bei Verarbeitung von 50 Kulturplatten der erwähnten Beschaffenheit 6 g Trockenpräparat. Dieses soll im folgenden mit E_1 bezeichnet werden.

Bacterium 2 wurde wie 1 gezüchtet. Nach dem Abspülen wurde zur Ausfällung ein Alkohol-Äther-gemisch benutzt, das doppelt soviel Äther enthielt, wie bei 1 verwendet wurde. Die Ausbeute belief sich auf 7.3 g Trockenpräparat. Es wird im folgenden E_2 benannt.

2 g Substanz A_3 wurden in 200 cm^3 Wasser gelöst, mit *n*-Natronlauge neutralisiert und mit 30 cm^3 Phosphat-puffer $p_H=7$ auf 250 cm^3 aufgefüllt. Damit wurden 5 Hydrolysenversuche vor-genommen.

- 1.) 100 cm^3 Substratlösung + 3 g E_1 + 3 cm^3 Toluol.
- 2.) 100 cm^3 " + 3 g E_2 + 3 cm^3 " .
- 3.) 33 cm^3 Wasser + 1 g E_1 + 1 cm^3 Toluol.
- 4.) 33 cm^3 " + 1 g E_2 + 1 cm^3 " .
- 5.) 25 cm^3 Substratlösung + 0.75 cm^3 Toluol.

Diese fünf Ansätze wurden nach gutem Durchschütteln bei

37° aufbewahrt. Die im Laufe der Zeit eingetretenen Veränderungen gehen aus folgender Zusammenstellung hervor.

In je 10 cm^3 der Ansätze 1 und 2 waren 4·8 mg Schwefel enthalten. Davon wurden mineralisiert im Versuch

	1.	2.
nach 115 Std.	1'23 mg	1'31 mg
nach 236 „	1'33 mg	1'42 mg .

Auf den in Sulfatform vorliegenden Schwefel berechnet wurden also 30% abgespalten. Eine geringe Zunahme des Reduktionsvermögens war, wie die Prüfung der Ansätze 3 und 4 lehrte, auf Autolyse des Fermentmaterials zurückzuführen. Ansatz 5 veränderte sich überhaupt nicht.

IV. Sulfurylierung von Agar.

Der Schwefelgehalt der einzelnen aus Agar gewonnenen Fraktionen liegt, wie vorausgehend angegeben ist, zwischen 3·6 und 6% S.

Um den Gehalt an Ester-sulfat-schwefel zu erhöhen, wurde eine künstliche weitere Sulfurylierung vorgenommen. Dazu bedienen wir uns der von NEUBERG (l. c.) angegebenen Methode und wählten insbesondere die von TAMBA (l. c.) für die Sulfurylierung der Stärke befolgte Vorschrift.

100 cm^3 wasserfreies Pyridin wurden mit einer Mischung von 3 cm^3 Chlorsulfonsäure in 30 cm^3 trockenem Chloroform unter dauernder Eiskühlung vermischt. Dieses Gemenge wurde dann bis zur Lösung der ausgeschiedenen Kristalle erwärmt und in ein mit dreifach durchbohrtem Stopfen verschlossenes weites Reagensglas gegossen. Durch die mittlere der Bohrungen führte ein mit Quecksilber abgedichteter Rührer, durch die beiden anderen ein Chlorcalciumrohr und ein oben erweitertes, mit einem Stopfen verschließbares Zuführungsrohr. Das mit der Sulfurylierungsflüssigkeit beschickte weite Gefäß wurde darauf in ein siedendes Wasserbad gestellt und unter stetem heftigen Rühren das zu sulfurierende Produkt eingetragen. Die Zugabe geschah durch das Einfüllrohr und erfolgte allmählich im Verlaufe von etwa einer Stunde. Die Substanz muß absolut trocken sein.

Zur Sulfurylierung wurde zunächst das durch partielle Säurehydrolyse aus Agar erhaltene Produkt *H* benutzt.

6·5 g des völlig wasserfreien Materials wurden im Verlaufe einer Stunde in kleinen Portionen in die Pyridinmischung eingetragen und dann 5 Stunden lang unter gutem Rühren der Einwirkung des Sulfurylierungsmittels ausgesetzt. Nach der Beendigung der Reaktion hat sich auf dem Boden des Reaktions-

gefäßes ein dunkelbrauner zäher Klumpen abgesetzt. Die überstehende Pyridin-Chloroform-Lösung wurde möglichst quantitativ abgegossen und das Reaktionsprodukt häufig mit Methanol durchgeknetet. Es nahm dabei eine körnige Beschaffenheit an, und der dunkle Farbton hellte sich auf. Wurde nun noch zweimal mit Aceton gewaschen, so hinterblieb nach dem Trocknen eine lichtbraune Substanz. Diese war ein Pyridinsalz; es entstand in einer Ausbeute von 2·1 g. Das Material wurde in 550 cm³ Wasser gelöst und im FAUST-HEIMSchen Verdunstungskasten auf 250 cm³ eingengt. Nach dem Filtrieren wurde das Pyridinsalz mit verdünnter Bromwasserstoffsäure zerlegt. Versuche, das sulfurylierte Produkt auszufällen, waren jedoch erfolglos; weder Methyl- und Äthylalkohol noch Aceton oder Äther erzeugten Fällungen. Indessen ließ sich das neue Produkt mit alkoholischem Bleiessig niederschlagen. $\frac{1}{3}$ der Lösung wurden mit 50 cm³ Bleiessig und 150 cm³ Alkohol versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren solange mit Alkohol gewaschen, bis darin kein Blei mehr überging. Die Bleiverbindung wurde nun in reichlich Wasser aufgeschlemmt und ein langsamer Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet. Nach dem Abfiltrieren des Bleisulfids wurde die Lösung mit Bariumhydroxyd neutralisiert und im FAUST-HEIMSchen Apparat auf 50 cm³ konzentriert. Nach dem Filtrieren ließ sich jetzt das Reaktionsprodukt durch Zugabe von 450 cm³ Methanol und 150 cm³ Äther als schwach gelbe flockige Masse ausfällen. Nach dem Waschen mit Aceton wurde über Nacht im Vakuumexsiccator getrocknet. Die quantitative Bestimmung zeigte, daß keine wesentliche Anreicherung an Schwefel eingetreten war.

Das erstrebte Ziel wurde mit dem selben Verfahren erreicht, wenn statt des Agar-abbauproduktes *H* ein nativer Agar verwendet wurde. Benutzt wurde in diesem Falle gepulverter Agar D. A. B. 6 von E. MERCK.

In dem gut verlaufenen Versuch mit 8 g Agar wurden 3·4 g eines rein weißen Reaktionsproduktes erhalten. Diese Substanz wies einen Schwefelgehalt von 17·9% auf.

0·0457 g Substanz ergaben 0·0595 g BaSO₄ = 17·9% Schwefel.

Über die hydrolytische Abspaltung von Sulfat s. Kurve 4.

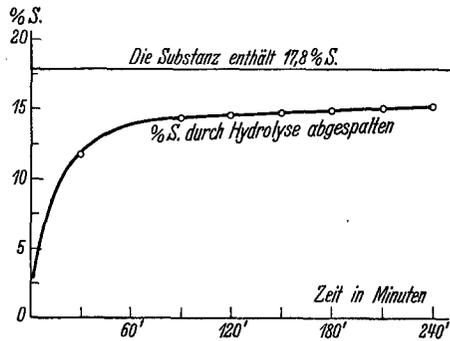
Nach einer wichtigen Beobachtung von S. BERGSTRÖM²³

²³ S. BERGSTRÖM, Z. physiol. Ch. 238 (1936) 163. — Übrigens ist ein solcher Effekt auch bei Schwefelverbindungen zu konstatieren, die ganz anderen Körperklassen angehören. S. J. H. STERNER und G. MEDES, Americ. Journ. of Physiol. 117 (1936) 92.

zeigen bestimmte Schwefelsäure-ester von Polysacchariden eine verzögernde Wirkung auf die Blutgerinnung (Heparin-effekt). Keiner der durch Fraktionierung von Agar gewonnenen Stoffe besaß einen nennenswerten Einfluß auf die Dauer der Blutgerinnung. Einzig das künstlich sulfurylierte Produkt aus nativem Agar ließ eine deutliche Verzögerung erkennen.

Die persulfurylierte Verbindung hielt in einer Menge von 50 γ die Gerinnung von 0,9 cm^3 Blut noch gerade eben auf.

Wurden einem Kaninchen 50 mg dieser Substanz intravenös eingespritzt, so wurde das Blut dadurch für etwa 20 Minuten ungerinnbar. Die Zeit der totalen Gerinnung wurde auf etwa $2\frac{1}{2}$ Stunden nachweisbar verlängert, während die Blutungszeit anscheinend normal blieb. (Nach freundlicher Mitteilung des Herrn Dr. ZIMMERMANN von den Sächsischen Serumwerken Dresden, dem für seine Mühewaltung bestens gedankt sei.)



Kurve 4. Hydrolyse des persulfurierten Agarproduktes mit n -HCl. 1,15 g in 100 cm^3 n -Salzsäure.

V. Farbreaktion.

Nach einer von M. L. LISON²⁴ jüngst gemachten Beobachtung geben Schwefelsäure-ester von Polysacchariden mit einigen basischen Farbstoffen wie Toluidin-blau und Brillant-Kresyl-blau in einer Verdünnung von 1:10.000 einen Farbenumschlag von Blau in ein rotstichiges Violett. Diese Farbprobe haben wir mit den aus Agar bereiteten Verbindungen angestellt und positiv befunden. Der Farbenumschlag, den Agarprodukte bei völlig neutraler oder schwach-saurer Reaktion hervorriefen, war mit Toluidin-blau eindeutig; er war mit den Agarkörpern besser zu erkennen als mit Chondroitin- und Mucoitin-schwefelsäure. Es liegt hier eine anscheinend allgemeine Farbreaktion auf Polysaccharid-schwefelsäure-ester vor.

Kurze Zusammenfassung.

Aus javanischem Agar wurden durch schonende Extraktionsmethoden verschiedene Polysaccharide erhalten. Produkt A_3 und A_4 waren Schwefelsäure-ester mit ungleichem S-Gehalt. Diese

²⁴ M. L. LISON, Bull. Soc. Chim. biol. 18 (1936) 225.

zwei Substanzen wichen auch in der Stärke ihres Säurecharakters von einander ab. Beide vermochten nicht zu gelieren. Die schwefelfreien Körper B_1 und B_2 unterschieden sich durch ihre Löslichkeiten in Wasser. Beide gelierten schon in starken Verdünnungen.

Die Verbindung A_3 wurde durch Sulfatase angegriffen. Es erfolgte nur eine hydrolytische Abspaltung von Schwefelsäure; ein Abbau des Polysaccharids, also ein Auftreten von freiem Zucker bzw. eine Zunahme des Reduktionsvermögens, wurde nicht beobachtet.

Es gelang, in nativem Agar Schwefelsäure einzuführen. Das dabei erzeugte Produkt enthielt rund 18% Schwefel und zeigte eine deutliche Heparin-wirkung.

Mit den natürlichen Schwefelsäure-estern wie auch mit dem persulfurylierten Stoff fiel die von LISON angegebene Farbreaktion positiv aus.