

Über ein Antigen von *Brucella abortus* Bang.

(2. Mitteilung.)

Von

L. Schmid und H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 29. Sept. 1950. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Jän. 1951.)

In der 1. Mitteilung¹ wurde durch Elektrophoreseversuche die Einheitlichkeit des zur Untersuchung verwendeten Materials (sogeannter Hitzeextrakt) — soweit dies aus solchen Versuchen überhaupt gefolgert werden darf — erwiesen. Im folgenden soll aufgezeigt werden, aus welchen Bausteinen das Antigen zusammengesetzt ist und wie diese nachgewiesen werden konnten. Während über die stickstoffhaltigen Komponenten in einer gesonderten Mitteilung berichtet wird, ist nachstehend überwiegend von den Kohlehydraten des Antigens die Rede. Als Untersuchungsmaterial diente wieder der Hitzeextrakt.

Schon die ersten Versuche ließen erkennen, daß man es weder mit einem lipoidhaltigen Stoff, noch mit einem reinen Polypeptid zu tun hatte. Vielmehr zeigten bereits qualitative Zuckerreaktionen eindeutig, daß ein recht beachtlicher Kohlehydratanteil am Aufbau beteiligt ist. Und zwar ließen die Reaktionen nach *Schiff*, *Bial*, mit Naphthoresorcin und Phloroglucin², die alle auch spektralanalytisch ausgewertet wurden, auf das Vorliegen von *Pentosen* im allgemeinen schließen. Negativ verliefen dagegen die Reaktionen auf Uronsäuren mit Naphthoresorcin², die *Dische*-Reaktion auf Desoxypentosen³, die nach *Rosenthaler*⁴ auf Methylpentosen, sowie Reaktionen auf Inosit⁵ und Ketosen⁶.

¹ L. Schmid, H. Michl und G. Zwettler, Mh. Chem. 81, 198 (1950).

² Van der Haar, Monosaccharide und Aldehydsäuren. Berlin. 1920.

³ Z. Dische, Mikrochem. 8, 4 (1930).

⁴ L. Rosenthaler, Z. analyt. Chem. 48, 165 (1909).

⁵ E. Salkowski, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 69, 478 (1910).

⁶ F. Weehuizen, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 37, 302 (1918).

Mit Sicherheit konnte aber auch auf *Hexosen* geschlossen werden, wie der Verlauf der Reaktion nach *Dische*⁷, sowie die Proben mit Guanidin-Zinnchlorür, Harnstoff-Zinnchlorür⁸ und mit Gallussäure⁹ ergaben, welche ebenfalls spektralanalytisch ausgewertet wurden.

Man darf daraus aber nicht folgern, daß die nachgewiesenen Pentosen und Hexosen als freie Monosaccharide im Antigen vorliegen. Das läßt sich auf verschiedene Weise zeigen, z. B. durch eine nur geringe Dialysiergeschwindigkeit, durch das mangelnde Reduktionsvermögen, sowie auch durch das Ausbleiben von Farbreaktionen unter milden Bedingungen.

Die weitere Frage war nun:

1. Liegt im Antigen ein nur aus Pentosen bzw. nur aus Hexosen oder ein aus beiden gemeinsam aufgebautes Polysaccharid vor?

2. Ist in das Antigen eine Pentosenphosphorsäure als Bestandteil einer Nukleinsäure eingebaut?

Mit der Möglichkeit des Vorliegens eines pentosehaltigen Polysaccharids mußte man rechnen, da ja solche bereits von *Penell*, *Huddleson* und Mitarbeitern¹⁰ in Brucellenantigenen wahrscheinlich gemacht wurden. Zur Beantwortung dieser Frage brauchte man einen Weg, der es ermöglicht, ein Polysaccharid schonend von den stickstoffhaltigen Bestandteilen des Antigens abzutrennen. Es scheint dies zunächst im Hinblick auf die elektrophoretische Einheitlichkeit wenig aussichtsreich. Man muß aber bedenken, daß die im folgenden angeführten Extraktions- und Fällungsmethoden einem wenn auch milden chemischen Eingriff gleichkommen und daher eine Spaltung des als eine Art Symplex aufzufassenden „Antigenmoleküls“ in valenzmäßig definiertere Verbindungen erwarten lassen.

Tatsächlich gelang es nach einer Reihe von Versuchen, wie Zerschäumen¹¹, Ausschütteln mit Butanol-Chloroform¹², Chromatographieren, Extraktion mit Glykolen¹³, mit Phenol, mit Methyl- oder Äthylalkohol, Fällung mit Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Uranylazetat, Quecksilberazetat und kolloidalem Zinkhydroxyd, mit einem kombinierten Verfahren, und zwar einer Bleiazetat- und Phosphorwolframsäurefällung, eine wenn auch nicht quantitative Trennung von Polysaccharid und stickstoffhaltigen Verbindungen zu erreichen. Energischere Einwirkung als die mit den oben genannten Reagenzien

⁷ *Z. Dische*, Mikrochem. 7, 36 (1929).

⁸ *J. H. Foulger*, J. biol. Chemistry 99, 207 (1932).

⁹ *E. Chierici*, Chem. Zbl. 1931 II, 96.

¹⁰ *R. P. Pennel* und *F. I. Huddleson*, J. Bacteriol. 33, 42 (1937).

¹¹ *G. Hesse*, Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium. Berlin. 1943.

¹² *M. G. Sevag*, E. P. 481924 (1935).

¹³ *W. T. J. Morgan*, Biochemic. J. 31, 2003 (1937).

schien wegen der Gefahr einer tiefergehenden Veränderung nicht ratsam. Im Versuchsteil ist ein Schema dieses Trennungsganges angegeben. Die einzelnen Fraktionen sind dort beziffert; die gleiche Bezifferung wird auch im folgenden verwendet.

Wenn durch die kombinierte Bleiazetat- und Phosphorwolframsäurefällung zwar nur eine partielle Abtrennung des Polysaccharids zu erzielen war, so konnte doch eindeutig bewiesen werden, daß das abgetrennte Polysaccharid VII auch nicht die Spur einer Pentose enthielt. Es mußte somit die ursprünglich nachgewiesene Pentose in der Bleiazetat- I bzw. Phosphorwolframsäurefällung V enthalten sein. Tatsächlich gelang es, nach Zerlegung der Bleiazetatfällung I mit Schwefelsäure, Filtrieren und Wiederausfällen mit Alkohol in der alkohol. Mutterlauge die Pentose III wie folgt nachzuweisen:

Die alkohol. Lösung, Filtrat von II, wurde zwecks Abtrennung der Schwefelsäure mit Bariumkarbonat versetzt und zur Trockene gebracht. Durch Behandeln des Abdampfrückstandes mit warmem Wasser konnte daraus eine kristallisierte Substanz III isoliert werden. Diese erwies sich aus folgenden Gründen als Bariumsalz einer Pentosenphosphorsäure, und zwar der Ribose-5-phosphorsäure:

1. Sie enthielt 6,75% Phosphor in organischer Bindung, was bei einem Kristallwassergehalt von $5\frac{1}{2}$ H₂O — das Ba-Salz der Ribose-5-phosphorsäure kristallisiert mit diesem Wassergehalt¹⁴ — in guter Übereinstimmung mit dem für eine Pentosenphosphorsäure errechneten Wert ist.

2. Aus dem Reduktionswert ergab sich ein Pentosengehalt, der mit dem errechneten gut übereinstimmt.

3. Die quantitative photometrische Auswertung der bei der *Bial*-Reaktion auftretenden blauen Farbe (Absorptionsverlauf im Sichtbaren, siehe Abb. 1) spricht für eine Ribose-5-phosphorsäure. Hierzu wurde, da keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, das Extinktionsvermögen obiger Substanz bei der *Bial*-Reaktion mit dem einer äquivalenten Menge Arabinose verglichen. Bei 6100 Å ergab sie eine 2,21mal so große Extinktion wie die Arabinose; dies stimmt mit dem in der Literatur angegebenen Wert¹⁵ von 2,19 sehr gut überein. Zum Vergleich sei erwähnt, daß Ribose-3-phosphorsäure, welche als einzige von den sonst noch möglichen Pentosenphosphorsäuren in Naturstoffen bisher noch nachgewiesen worden ist¹⁶, nur eine 1,15mal so große Extinktion gibt.

4. Bei der Oxydation mit Brom mußte eine Ribose-5-phosphorsäure

¹⁴ P. A. Levene und W. A. Jacobs, Ber. dtsh. chem. Ges. **44**, 749 (1911).

¹⁵ H. K. Barrenscheen und A. Peham, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **272**, 81 (1942). — T. Valyi-Nagy, Z. Vitamin-, Hormon-, Fermentforsch. **1**, 279 (1948).

¹⁶ A. M. Michelson und A. R. Todd, J. chem. Soc. London **1949**, 2476.

eine 5-Phosphoribonsäure ergeben. Eine Ribose-3-phosphorsäure würde eine am C-Atom 3 phosphorylierte Trioxyglutarsäure bilden. In unserem Fall gab das Oxydationsprodukt mit Cu-Ionen einen blauen Komplex, was also auf benachbarte Hydroxylgruppen, wie im Fall der 5-Phosphoribonsäure, schließen läßt¹⁷.

5. Bei der Hydrolyse ließ sich die Phosphorsäure nur schwer abspalten. Bei nicht am Kohlenstoffatom 5 phosphorylierten Pentosenphosphorsäuren erfolgt die Verseifung im allgemeinen viel leichter¹⁸.

6. Nicht unerwähnt soll eine Zufallsbeobachtung bleiben, der wir den Nachweis freier Ribose verdanken. Es gelang nämlich, aus einem

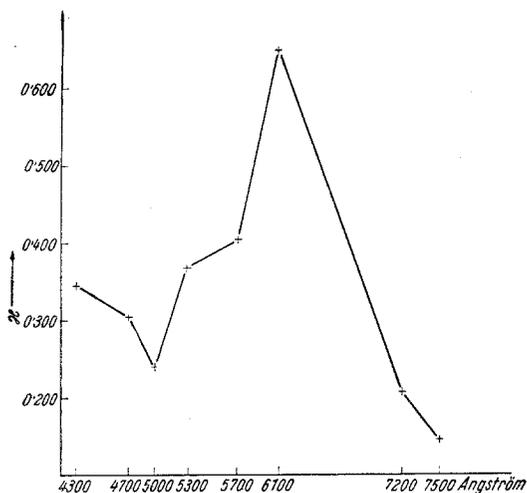


Abb. 1.

jahrelang aufbewahrten Hitzeextrakt, der noch Agglutinationshemmung zeigte, Ribose als Bromphenylhydrazon zu isolieren (Zersp. 164°).

Naheliegend war nun die Annahme, daß die Ribose in einem Nucleinsäureverband vorlag. In diesem Falle sollte aber auch eine Purin- oder Pyrimidinkomponente im Antigen enthalten sein, wofür bis jetzt noch kein direkter Beweis vorhanden war. Zur Prüfung auf diese Stoffklasse wurden

daher 100 mg Antigen hydrolysiert und in Anlehnung an den von Hoppe-Seyler und Thierfelder beschriebenen Gang¹⁹ aufgearbeitet. Nach diesem Verfahren konnte Adenin in Form des Pikrats kristallisiert erhalten werden; sein Zersp. lag bei 283°.

In der Mutterlauge des Adeninpikrats wurde Hypoxanthin gefunden. Seine Isolierung gelang in der Form des Silber-Hypoxanthinpikrats, als welches es auch zur Analyse gebracht wurde. Xanthin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin waren nicht nachzuweisen. Mit dem Nachweis des Adenins bzw. Hypoxanthins war jetzt auch der Hinweis gegeben, wie die Pentose in das Antigen eingebaut ist; nämlich im Sinne einer Nucleinsäure, im besonderen einer Ribonucleinsäure.

¹⁷ R. Klimek und J. K. Parnas, Biochem. Z. 252, 392 (1932).

¹⁸ P. A. Levene und S. A. Harris, J. biol. Chemistry 95, 755 (1932).

¹⁹ Hoppe-Seyler und Thierfelder, Handbuch der physiologischen und pathologischen Analyse, S. 875. Berlin. 1924.

Durch die kombinierte Bleiazetat-Phosphorwolframsäurefällung war es nun gelungen, aus dem Antigen eine pentosenhaltige Fraktion III abzutrennen, die frei von Hexosen war. Darüber hinaus wurde erreicht, daß die hexosenhaltige Fraktion frei von Pentosen zu gewinnen war. Die Hexosenfraktion VII war im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung V anzutreffen, aus der sie durch Alkoholfällung isoliert werden konnte.

Folgende Punkte sprachen dafür, daß man es mit einem *Hexosen-polysaccharid* zu tun hatte:

1. Die Farbreaktionen auf Hexosen waren positiv.

2. Die Elementarzusammensetzung entsprach der eines Polysaccharids.

3. Bei der *Bial*-Reaktion wurde nur eine Braunfärbung beobachtet; ihre photometrische Auswertung — siehe Abb. 2 — ließ kein Anzeichen des für Pentosen so charakteristischen Maximums bei 6100 Å erkennen.

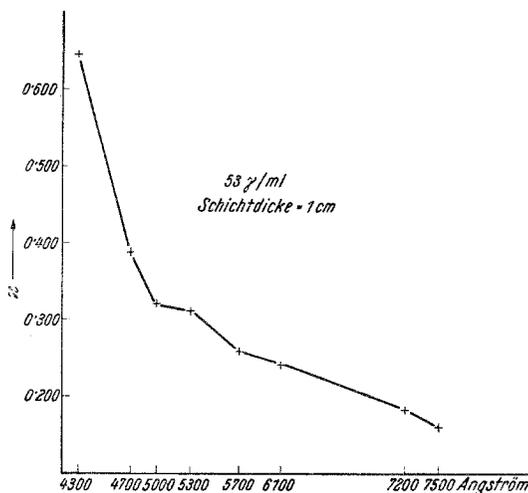


Abb. 2.

4. Durch Hydrolyse entstand aus der ursprünglich nicht reduzierenden Substanz ein rechtsdrehendes, reduzierendes Produkt, welches als Glukose identifiziert werden konnte.

Das Polysaccharid selbst bildete eine weiße, pulvrige Masse. Beim Erhitzen trat ungefähr ab 160° Gelbfärbung auf, bei weiterem Erhitzen wurde die Substanz dunkel und zersetzte sich schließlich bei 230°. Sie ist geruch- und geschmacklos. In Wasser löste sie sich ausgesprochen leicht, nicht löslich war sie in 90%igem Alkohol und in organischen Lösungsmitteln. In wäßriger Lösung zeigte das Polysaccharid keine optische Aktivität, obwohl Lösungen bis zu einer Konzentration von 10% zur Messung verwendet wurden. Ein Aschegehalt von 1,2% ließ sich weder durch wiederholtes Umfällen, noch durch Dialyse abtrennen, da das Kohlehydrat auch durch feinporige Membranen leicht hindurchtrat.

Der Diffusionskoeffizient einer 0,1%igen Lösung lag bei 0,228 cm²/Tag bei einer Temperatur von 15°. Nach der *Oeholmschen* Gleichung ($D\sqrt{M} = 7,15$)²⁰ errechnete sich daraus ein Teilchengewicht von zirka

²⁰ Vgl. *A. Eucken*, Lehrbuch der chemischen Physik, Bd. II, S. 1066. Leipzig, 1944.

1000. Diese Teilchengröße entspricht ungefähr der eines Hexasaccharids einer Hexose.

Das an sich nicht reduzierende Kohlehydrat ist durch verdünnte Säuren hydrolysierbar. Bei Verwendung von 0,72 n Schwefelsäure ist bei 100° nach 1 Std. vollständige Hydrolyse eingetreten. Die quantitative Auswertung der Hydrolysegeschwindigkeit unter den angeführten Bedingungen ergab eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $6,6 \cdot 10^{-2}$.

Als Hydrolysenprodukt resultierte ausschließlich Glukose, wie aus den folgenden Ergebnissen geschlossen werden kann:

1. Schmp. und Mischschmp. des isolierten Hydrolysenproduktes mit Glukose liegen bei 145°.

2. Das Phenylsazon zeigt einen Zersp. von 207° und einen Mischschmp. (u. Zers.) mit Glukosazon von 207°.

3. Die spezif. Drehung lag bei 54° in wäßriger Lösung und bei einer Temperatur von 20°.

4. Papierchromatogramme, die mit Verwendung verschiedener beweglicher Phasen durchgeführt wurden, zeigten ausschließlich Glukose.

5. Das Polysaccharid wird von Hefe nicht angegriffen, das Monosaccharid ist vergärbar.

Während die Pentose in der Form des Bariumsalses der Ribose-5-phosphorsäure(III) und das Polysaccharid VII aus den Filtraten der Bleiazetatfällung in Substanz isoliert werden konnten, ist das gleiche am Polysaccharid, das in die Bleifällung II mitgegangen war, nicht gelungen, zumindest war dies nicht auf Grund verschiedener Löslichkeiten bzw. Fällbarkeiten zu erreichen.

Es blieb also nichts anderes übrig, als den gesamten Bleiniederschlag zu hydrolysieren, wobei auch das Polysaccharid zu einem Monosaccharid mitverseift wurde. Dieses konnte als Glukose identifiziert werden (Osazon und Papierchromatogramm).

Bemerkenswert ist, daß das Antigen nach Abtrennen des nicht fällbaren Polysaccharids ein völlig geändertes Verhalten hinsichtlich seiner Löslichkeit zeigt. Während es im Verband mit dem nicht fällbaren Polysaccharid leicht 2%ige Lösungen gibt, wird es nach Abtrennen desselben wasserunlöslich.

Zum Schluß ist noch auf eine Bemerkung von *Pennel* und *Huddleson*²¹ einzugehen. Die genannten Autoren fanden in einem *Bang*-Antigen, das sie aus einem Trichloressigsäureextrakt aus autolysierten und mit Trypsin verdauten Bakterien hergestellt hatten, azetylierte Aminosucker. Unter dem Eindruck dieses Befundes wurde mit erhöhter Aufmerksamkeit in unserem Antigen nach Aminosuckern gesucht. Wir konnten *keine*

²¹ *R. P. Pennel* und *F. I. Huddleson*, Technical Bulletin 156 of agricultural exp. Station, 1938.

solchen nachweisen. Ebenso sprechen obige Autoren von einem Arabinosevorkommen in ihrem Antigen. Wir konnten in unserem Untersuchungsmaterial als einzige Pentose nur Ribose nachweisen. Möglicherweise ist der Befund obiger Autoren dadurch zustande gekommen, daß sie ihre Angaben aus einem Osazon herleiten, welches doch für Ribose und Arabinose identisch ist.

Experimenteller Teil.

Die Isolierung des Polysaccharids und der Ribose-5-phosphorsäure.

1,5 g Antigen wurden mit 50 ml dest. Wasser versetzt und 2 Tage bei Zimmertemp. stehengelassen; hierauf wurde vom ungelöst gebliebenen Teil abzentrifugiert.

Die opaleszierende Lösung wurde mit 5 ml 10%iger neutraler Bleiazetatlösung gefällt. Niederschlag IV getrocknet: 0,218 g.

Niederschlag I: Er wurde mit 0,5%iger Schwefelsäure zerlegt und mit Alkohol gefällt.

Filtrat: Nach Entfernung des Bleis mit Schwefelsäure wurde aus 2%iger Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt

Niederschlag II: 0,751 g

Nach Versetzen der alkohol. Lösung mit Ba-Karbonat wurde der Alkohol abgedampft und der Rückstand mit Wasser von 40° ausgelaugt; unlöslich blieb das Ba-Sulfat. Der wasserlösliche Teil fiel bei Alkoholzusatz aus; er wurde nochmals in Wasser gelöst und durch Eindunstenlassen zur Kristallisation gebracht: III

Niederschlag V: Er wird mit Ba-Hydroxyd zersetzt und mit Alkohol gefällt: 30 mg Polypeptid VI

Filtrat wird mit frisch gefälltem Ba-Karbonat von der Schwefelsäure befreit und mit Alkohol gefällt

Fällung VII: 0,25 g rohes Polysaccharid. Es wurde in 5 ml Wasser gelöst, mit verd. Schwefelsäure restliches Ba entfernt und neuerdings mit der 10fachen Alkoholmenge gefällt: 0,2 g Hexosenpolysaccharid VIII

Darstellung des Hitzeextraktes.

Bakterien vom Stamme *Brucella abortus* Bang wurden 8 Tage lang auf Leberagar gezüchtet. Der Rasen wurde mit dest. Wasser und Glasperlen abgespült. Es wurde nun von eventuell mitgerissenen Agarteilchen filtriert und die Bakterien aus dem Filtrat abgeschleudert. Nach 3maligem Waschen mit insgesamt 2,5 l dest. Wasser und Zentrifugieren wurden die Bakterien mit dest. Wasser aufgeschwemmt. Auf eine aus 1,5 m² Kulturfläche gewonnene Bakterienmenge kamen 200 ml Wasser zur Verwendung. Die Suspension wurde nunmehr 60 Min. lang auf 80° erwärmt. Die dadurch abgetöteten

und ausgelaugten Bakterien wurden abgeschleudert; die überstehende zellfreie und schwach gelb gefärbte Lösung war der reine Hitzeextrakt. Dieser wurde mit Alkohol bis zu einer Konzentration von 90 Gew.-% versetzt, das ausgefallene Antigen abgeschleudert, dekantiert und getrocknet.

Die Art der Trocknung hatte Einfluß auf die spätere Löslichkeit in Wasser. Je schärfer und länger sie durchgeführt wird, desto ungünstiger werden die Löslichkeitsverhältnisse beeinflußt. Das von uns verwendete, über Silikagel konstant getrocknete Material löste sich nur langsam in dest. Wasser. Eine bei Zimmertemp. gesättigte Lösung, wie sie bei der folgenden Isolierung des Polysaccharids und der Ribose-5-phosphorsäure verwendet wurde, war nach Abschleudern des überschüssigen Bodenkörpers 2,53%ig. Ihr pH lag bei 4,5.

Ribosephosphorsäure.

$C_5H_9O_8PBa \cdot 5\frac{1}{2} H_2O$: Phosphor nach *Lieb*²²:

Ber. 6,67. Gef. 6,75.

Reduktionsvermögen nach *Hagedorn-Jensen*²³:

Ber. 32,4. Gef. 31,5.

Photometrische Auswertung der Bial-Reaktion (Abb. 1). Die Messungen erfolgten in einem *Zeiß*'schen Stufenphotometer. Unter den in Abb. 1 und im Text angegebenen Wellenlängen sind die Maxima der Durchlässigkeiten der jeweils verwendeten Spektralfilter zu verstehen. Das Gesamtvolumen war 10 ml, die Konzentration 78 γ /ml (Ba-Salz), die Schichtdicke 1 cm.

*Oxydation*²⁴. 5 mg Ba-Salz wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml ges. Bromwasser versetzt. Nach 1tägigem Stehen wurde nochmals 0,1 ml Bromwasser und soviel einer 2 n Sodalösung, als zur Entfärbung des Broms nötig war, hinzugefügt. Nach weiteren 2 Tagen wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert, vom Ba-Sulfat abzentrifugiert, noch einen Tag stehen gelassen und dann das überschüssige Brom ausgeschüttelt. Schließlich wurde mit 0,5 ml einer 10%igen Kupfersulfatlösung versetzt und alkalisch gemacht. Beim Vergleich mit einer Blindprobe war eine deutliche Blaufärbung zu beobachten.

Hypoxanthinsilberpikrat. $C_5H_3ON_4Ag \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$. Ber. N 20,76.
Gef. N 20,64.

Bial-Reaktion des Polysaccharids (Abb. 2).

Konzentration: 0,053 mg/ml,

Gesamtvolumen: 6 ml.

Schichtdicke: 1 cm.

Diffusionsversuch. Dieser wurde in enger Anlehnung an die von *Oeholm* beschriebene Methode ausgeführt²⁵.

Diffusionsdauer: 4,67 Tage. Temperatur: 15°. Konzentration: 1,025 mg/ml Polysaccharid.

²² *H. Lieb* in *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse, S. 114. Leipzig und Wien. 1933.

²³ *H. G. Hagedorn* und *B. N. Jensen*, *Biochem. Z.* **135**, 46 (1923).

²⁴ *E. Fischer*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **26**, 637 (1893). — *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, *ibid.* **44**, 746 (1911). — *H. Kiliiani*, *ibid.* **55**, 81 (1922).

²⁵ *L. W. Oeholm*, *Z. physik. Chem.* **50**, 309 (1905).

Die in den verschiedenen Schichten aufgetretenen Konzentrationen bestimmte man auf zweierlei Art:

Im ersten Fall hydrolysierte man die Polysaccharidlösung jeweils 2 Stdn. mit 2%iger Schwefelsäure und titrierte die aufgetretene Zuckermenge nach *Hagedorn-Jensen*²³.

Im zweiten Fall wurde der Polysaccharidgehalt mit der Diphenylaminprobe nach *Dische*⁶ bestimmt. Gemessen wurde dabei die Extinktion bei 5300 Å bei einem Gesamtvolumen von 6 ml und einer Schichtdicke von 1 cm.

	mg reduzierende Substanz/ml als Glukose berechnet	Extinktion bei 5300 Å
Konzentration zu Beginn des Versuches	1,07	0,713
Konzentration nach Beendigung des Versuches in 0,96 cm Höhe	0,270	0,182
Konzentration in 2,88 cm Höhe	0,026	0,019

Die Berechnung erfolgte nach *Kohlrausch*, Praktische Physik, Bd. I, S. 244, 1943; die Werte für die *Gaußsche* Fehlerfunktion wurden Bd. II, S. 565, entnommen.

Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Eine Lösung, die 0,775 mg Polysaccharid pro ml enthielt, und 0,72 n an Schwefelsäure war, wurde auf 100° gehalten. Nach je 10 Min. wurde 1 ml entnommen, abgekühlt, neutralisiert und nach *Hagedorn-Jensen* titriert. Aus dem Verbrauch an Oxydationsmittel errechnete sich der Prozentgehalt von Glukose:

Nach	% reduzierender Substanz als Glukose berechnet
0 Min.	0
10 „	50,8
20 „	78,9
30 „	88,9
40 „	93,8
50 „	100
65 „	104

Die Berechnung erfolgte nach *J. Eggert*, Lehrbuch der physikalischen Chemie, S. 579, 1944.

Papierchromatogramm. Filtrierpapier: *Schleicher* und *Schüll* 602 hart. Versuchsdauer: 3 Tage aufsteigend. Bewegliche Phasen: Butanol: Wasser: Eisessig gleich 4:5:1²⁶, Äthanol: Wasser: Butanol²⁷ gleich 1:5:4 unter Zusatz von NH₃; Entwicklung: saures Anilinphtalat²⁸.

²⁶ *S. M. Partridge* und *R. G. Westall*, Biochemic. J. **42**, 238 (1948).

²⁷ *E. L. Hirst*, *L. Hough* und *J. K. N. Jones*, J. chem. Soc. London **1949**, 928.

²⁸ *S. M. Partridge*, Nature (London) **164**, 443 (1949).