

317. Theodor Ploetz: Über das Verhalten von Lindenholz gegen Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung und den enzymatischen Abbau der Hauptfraktionen. III. Mitteil. über den enzymatischen Abbau polymerer Kohlenhydrate*).

[Aus d. Institut für d. Chemie d. Holzes u. d. Polysaccharide. Chem. Institut d. Universität, Heidelberg.]

(Eingegangen am 7. September 1939.)

R. S. Hilpert¹⁾ hat unlängst einige Hölzer einer Fraktionierung durch Einwirkung von Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung unterworfen. Im folgenden wird über einen analogen Versuch berichtet, der an Lindenstammholz (*Tilia tomentosa*) durchgeführt wurde. Für die Wahl dieses Materials waren Gründe des späteren fermentativen Abbaus maßgebend.

Bei der Behandlung des fein gemahlenden und mit Benzol-Alkohol extrahierten Holzes mit dem Reagens bleiben 61% der Holzsubstanz ungelöst, 12.7% lassen sich durch Ansäuern aus der Lösung fällen. 26.3% des Holzes sind demnach wasserlöslich geworden.

Der unlöslich verbleibende Holzurückstand unterscheidet sich in seiner Elementarzusammensetzung kaum vom Ausgangsmaterial. Nur der OCH₃-Gehalt ist etwas gestiegen.

Lindenstammholz	C 49.56 %	H 6.37 %	OCH ₃ 6.51 %
Unlös. Rückstand	„ 49.62 %	„ 6.55 %	„ 7.20 %

Man kommt dem Wesen der eingetretenen Veränderung aber näher, wenn man neben der Elementarzusammensetzung auch die Hauptkörperklassen verfolgt, aus denen sich die Holzsubstanz zusammensetzt. Dann zeigt sich nämlich, daß der Rückstand sich doch wesentlich vom Ausgangsholz unterscheidet:

	Cross-Bevan-Cellulose, pentosenfrei	Pentosen	Lignin
Lindenstammholz	45.5 %	26.1 %	18.0 %
Unlös. Rückstand	60.5 %	8.67 %	20.55 %

Von den Hauptbestandteilen des Ausgangsmaterials sind demnach in Lösung gegangen 18.9% der vorhandenen Cellulose, 79.7% der Pentosen und 30.5% des Lignins (bestimmt als Klason-Lignin). Trotz der Konstanz der Werte der Elementaranalyse sind also sehr wesentliche Veränderungen der Zusammensetzung des Holzes erfolgt.

Die Auflösung von 30% des Ligninanteils ist auch als ein Fraktionierungsvorgang aufzufassen, da sich das aus dem Rückstand erhältliche Lignin in seiner Zusammensetzung von dem des Ausgangsholzes unterscheidet:

Lindenstammholzlignin	C 64.60 %	H 5.50 %	OCH ₃ 19.86 %
Lignin aus d. Rückstand	„ 61.32 %	„ 6.04 %	„ 20.91 %

Der aus der Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung durch Ansäuern fällbare Anteil wurde als gelbliches Pulver erhalten. Die Zusammensetzung ist C 45.98%, H 5.91%, was einen Körper der Klasse C₅H₈O₄ vermuten ließe. Die Substanz enthält aber noch 7.23% OCH₃ und liefert bei der Pentosen-

*) I. Mitteil. Ztschr. physiol. Chem. **259**, 18 [1939]; II. Mitteil. ebenda im Druck.

¹⁾ B. **72**, 607 [1939].

bestimmung nur 49.6% Pentosen, was einem Pentosengehalt von 43.7% entspricht. Die Fraktion ist also keineswegs einheitlich.

Hilpert findet bei seinen analogen Fraktionen eine Elementarzusammensetzung, die auf die Formel $C_6H_{10}O_5$ stimmt. Mit 4% OCH_3 ist dabei die Fraktion aus Rotbuchenholz am höchsten methyliert. Wenn daraus der Schluß gezogen wird, „es kann also im Holz keine OCH_3 -freie Cellulose vorkommen“, so ist dem entgegenzuhalten, daß für die Einheitlichkeit des Präparats keinerlei Beweis geliefert werden kann.

Mit Schwefelsäure ergibt der fällbare Anteil 26.14% Lignin. Das Lignin ist also in dieser Fraktion gegenüber dem Holz angereichert. Der OCH_3 -Gehalt dieses Lignins liegt tiefer als der des Holzlignins und des Lignins des unlöslichen Rückstandes.

Lignin aus der Fällung: C 61.40%, H 5.25%, OCH_3 15.64%.

In dem entsprechenden Präparat aus Rotbuche findet Hilpert nur 8.5% Lignin. Da das Präparat 44.74% C enthält, wird geschlossen, daß es auf Grund seiner Elementarzusammensetzung unmöglich so viel vorgebildetes Lignin mit etwa 60% C enthalten könne. Da das Präparat aus Lindenholz bei ähnlicher Elementarzusammensetzung sogar 26% Lignin liefert, könnte dieser Schluß hier mit noch viel größerer Wahrscheinlichkeit gezogen werden. Entweder entstammen die 26% Lignin einer Vorstufe, die 35% ausmachen und ein Viertel des Gewichts, das sind 9% Wasser, beim Übergang in Klason-Lignin verlieren müßte. Oder das Lignin ist mit dem hohen Kohlenstoffgehalt vorgebildet (siehe unten); dann muß außerdem eine Substanz von geringem Kohlenstoffgehalt im Präparat enthalten sein.

Zieht man von dem gesamten OCH_3 -Gehalt des fällbaren Anteils die auf das Lignin entfallende Menge ab, so bleibt noch ein OCH_3 -Rest. Der ligninfreie Anteil enthält demnach noch 4.28% OCH_3 . Der fällbare Anteil besteht also aus Lignin und einer OCH_3 -haltigen Substanz, die nicht in das Klason-Lignin übergeht. Ob dieses OCH_3 in den Pentosen, oder in dem nicht erfaßten Rest, der noch 30% des Präparats ausmacht, gebunden ist, wurde noch nicht festgestellt. Vielleicht handelt es sich dabei um methylierte Uronsäuren oder ähnliche Stoffe, wie sie von M. H. O'Dwyer²⁾ in den Hemicellulosen gefunden worden sind. Jene 30% Restsubstanz müssen jedenfalls einen höheren Oxydationsgrad aufweisen, denn für sie errechnet sich aus den Analysendaten der anderen Bestandteile ein C-Gehalt von etwa 34%, vorausgesetzt, daß das Lignin mit 61% Kohlenstoff vorgebildet ist.

Sowohl der in Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung unlösliche Rückstand als auch die mit Säure erhaltene Fällung sind stickstoff-frei.

Folgende Tafel zeigt, inwieweit die geprüften Bestandteile des Holzes in den beiden Hauptfraktionen erfaßt worden sind (berechnet auf 100 g T. S. Ausgangsmaterial):

Tafel 1.

	Ausgangs- material	Unlös- Rückstand	Mit Säure gefällt	% d. Ausgangssubstanz erfaßt	
					i. Lsg. verbl.
Gewicht	100.0 g	61.0 g	12.8 g	73.7 %	26.3 %
Cellulose	45.5 g	38.0 g	nicht geprüft	(81.4 %)	(18.6 %)
Pentosen	26.1 g	5.29 g	6.38 g	44.7 %	55.3 %
Lignin	18.0 g	12.6 g	3.34 g	88.6 %	11.4 %
OCH_3	6.51 g	4.4 g	0.93 g	82.0 %	18.0 %

²⁾ Biochem. Journ. **33**, 713 [1939].

Der enzymatische Abbau wurde mit verschiedenen gereinigten Enzympräparaten vom Verdauungssaft der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) durchgeführt, die Cellulase, Lichenase und Cellobiase enthalten³⁾.

Das als Ausgangsmaterial verwendete Lindenstammholz verhält sich gegen den Enzymangriff sehr resistent. So gehen mit einem — allerdings nicht sehr aktiven — Enzympräparat, das Cuprophan in 6 Tagen zu 23% abbaut, im gleichen Zeitraum vom Lindenholz nur 3.8% in Lösung. Die aktivsten Präparate, die Cuprophan in 2—3 Tagen völlig lösen, bewirken in 8 Tagen einen Abbau von 14%. Der in Lösung gehende Zucker besteht dabei zu 35% aus Pentosen. Dieses Verhältnis bleibt auch bei mehrmaligem Angriff mit verschiedenen Enzympräparaten ziemlich konstant (dies gilt natürlich nur für die bis jetzt erreichten Abbaugrade). Das bedeutet, daß die beiden Kohlenhydratklassen Pentosen und Hexosen beim enzymatischen Abbau von Anfang an etwa in dem Verhältnis in Lösung gehen, in dem sie im Holz vorhanden sind. Eine bevorzugte Hydrolyse des Pentosenanteils, wie sie bei der Einwirkung verdünnter Säuren feststellbar ist, tritt also hier nicht auf.

Man konnte nun vermuten, daß die Aufteilung der Holzsubstanz in Fraktionen durch die Einwirkung der Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung den enzymatischen Angriff erleichtern würde. Im unlöslichen Rückstand sollte durch die Entfernung von 40% der Holzsubstanz die Oberfläche vergrößert und der Zugang zum Zellinnern erleichtert sein. In der Säurefällung ist die Zellstruktur überhaupt verschwunden und die Möglichkeit einer Abdeckung abbaubarer Stoffe durch inkrustierende Substanzen ausgeschlossen.

Der in Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung unlösliche Rückstand zeigt aber nun keineswegs eine gesteigerte enzymatische Angreifbarkeit. Selbst durch lang andauernde Enzym-Einwirkung und mehrmalige Erneuerung des Enzyms konnten nämlich nur insgesamt 18.6% der Substanz in Lösung gebracht werden. Der aus der Zuckerbestimmung und aus der Gewichtsabnahme ermittelte Abbau stimmen dabei völlig überein, so daß außer den bei der Zuckerbestimmung erfaßten Stoffen nichts in Lösung geht. Der gebildete Zucker besteht zu 42.5% aus Pentosen, die somit in einer Menge von 7.9% des Materials entstanden sind. Die Untersuchung hatte ergeben, daß der unlösliche Rückstand 8.7% Pentosen enthält. Demnach sind die im Material enthaltenen Pentosen auf enzymatischem Wege restlos in Lösung zu bringen. Auffallend ist übrigens, daß der enzymatische Abbau zum Stillstand kommt, wenn gerade soviel in Lösung gegangen ist, als dem Hemicellulosenanteil des Materials (19%) entspricht. Der Rückstand bestände demnach nur aus Lignin (25%) und Cellulose (75%). Diese Folgerung bedarf noch der Prüfung.

Im Gegensatz zum unlöslichen Rückstand läßt sich die mit Säure aus der Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung erhaltene Fällung enzymatisch relativ leicht abbauen. Es konnte hier in zwei Abbaustufen ein Abbau von 51.4% erreicht werden. Entsprechend der Zusammensetzung des Präparats (Tafel 1) besteht der in Lösung gehende Zucker zu 70% aus Pentosen. Die Abbaulösungen enthalten auch OCH_3 , was mit der Feststellung übereinstimmt,

³⁾ I. Mittel., Ztschr. physiol. Chem. **259**, 19 [1939].

daß außer dem Lignin-OCH₃ noch OCH₃ an Kohlenhydrat, oder eine andere reduzierende, wasserlösliche Substanz gebunden vorliegen muß. Über die Veränderung der Zusammensetzung geben folgende Zahlen Aufschluß:

Ausgangsmaterial	C 45.98 %	H 5.91 %	OCH ₃ 7.23 %
Nach 51.4-proz. Abbau . . .	51.77 %	6.36 %	9.07 %

Die Zunahme der Werte für C und OCH₃ läßt vermuten, daß eine Anreicherung an Lignin eingetreten ist.

Auf Grund der Analyse (Tafel 1) sind vom Gesamt-OCH₃ des gefällten Materials 56.5% im Lignin gebunden. Der Rückstand des enzymatischen Abbaus enthält jetzt noch 62% des ursprünglichen OCH₃, d. h., daß das an den Nicht-Ligninanteil gebundene OCH₃ bereits fast völlig in Lösung gebracht ist. Der Abbau dieses Anteils eilt also dem Gesamt-Abbau voraus, denn unter der Voraussetzung, daß kein Lignin in Lösung gegangen ist, besteht der Rückstand des Abbaus immer noch zu 46% aus Kohlenhydraten, d. h. er setzt sich zu etwa gleichen Teilen aus Lignin- und Kohlenhydrat-Bausteinen zusammen.

Auch das äußere Aussehen weist auf die Ligninanreicherung hin. Das ursprünglich hellgelbliche Pulver dunkelt im Verlaufe des Abbaus stark (was bei dem vorigen Präparat, dem in Äthylendiaminkupferoxyd unlöslichen Rückstand, nicht der Fall ist) und ist äußerlich von einem schonend gewonnenen Lignin nicht mehr zu unterscheiden.

Überraschend ist, daß in diesem Stadium der bisher flott verlaufene Abbau plötzlich ins Stocken gerät und selbst bei Anwendung aktivster Enzympräparate nur mehr sehr schleppend weiter geht.

Immerhin gelang es in 13 Tagen, den Abbau noch um 9.8% weiterzutreiben, so daß er nun 61.2% betrug. Der bei dieser letzten Behandlung in Lösung gegangene Zucker bestand zu 92% aus Pentosen, womit die im Ausgangsmaterial enthaltenen Pentosen völlig in Lösung gegangen waren.

Wenn auch diese enzymatischen Abbauversuche, die in ihrem letzten Stadium sehr zeitraubend verlaufen, noch nicht abgeschlossen sind, so berechtigen sie doch zu der Erwartung, daß es gelingen dürfte, unter den schonenden Bedingungen des enzymatischen Abbaus, also bei pH 4.7 und bei 37°, aus nativem Material ligninartige Körper zu isolieren. Der Anstieg des Kohlenstoffgehalts nach dem 51.4-prozentigen Abbau weist deutlich auf die Gegenwart ligninartiger Anteile von hohem Kohlenstoffgehalt hin.

Beschreibung der Versuche.

1) Die Einwirkung von Äthylendiaminkupferoxyd auf das Holz.

Das Reagens wurde nach Hilperts¹⁾ Angaben dargestellt.

Fein gemahlene Lindenstammholz wurde erschöpfend mit Benzol-Alkohol extrahiert. Von dem durch ein 80-Maschensieb gesiebten Material wurden 20 g in 500 ccm Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung 5 Tage unter Lichtausschluß geschüttelt.

Die Aufarbeitung erfolgte wie bei Hilpert¹⁾ angegeben. Die mit Säure abgeschiedenen Flocken wurden mit Alkohol und Äther ausgewaschen und getrocknet. Man erhielt so ein hellgelbes lockeres Pulver.

Angesetztes Holz	19.45 g	Trockensubstanz
Unlöslicher Rückstand	11.88 g	Trockensubstanz
Mit Säure gefällt	2.47 g	Trockensubstanz

Nach Isolierung dieser beiden Hauptfraktionen wurde die angesäuerte Mutterlauge im Vak. zur Trockne gebracht. Nach Entfernung des HCl-Überschusses wurde mit Äther extrahiert, wobei noch in Spuren ein harzartiges Produkt herausgelöst wurde. Die nachfolgende Alkoholextraktion lieferte eine braune Lösung, aus der durch weitere Aufarbeitung ein nunmehr wasserunlösliches ligninartiges Produkt in einer Ausbeute von 100 mg Trockensubstanz isoliert wurde.

C 63.57 %, H 7.25 %, OCH₃ 15.62 %.

Der in der Extraktionshülse verbliebene Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Man erhielt eine braune Fällung, die kupferfrei gewaschen, in einer Ausbeute von 254 mg Trockensubstanz anfiel.

C 57.68 %, H 6.17 %, OCH₃ 14.88 %.

Durch die Einengung im Vak. waren also aus der sauren Lösung noch geringe Mengen wasserunlöslicher Produkte entstanden. Der Rest blieb jedoch wasserlöslich und wurde nicht weiter verfolgt.

Die Ligninbestimmung wurde mit 72-proz. Schwefelsäure durchgeführt.

2) Der enzymatische Abbau.

Über die Reinigungsoperationen für Schneckenferment siehe die I. Mitteilung. Inzwischen wurden noch andere Wege entwickelt, über die an anderer Stelle berichtet werden soll.

Der Abbau verlief bei 37°. Durch Zugabe von reichlich Acetatpuffer wurde das p_H 4.7 konstant erhalten. Die Ansätze wurden mit 1 g Trockensubstanz bei einem Gesamtvolumen des Enzym-Puffergemisches von meist 100 ccm in verschlossenen Erlenmeyer-Kölbchen unter Toluol stehen gelassen. Parallel-Ansätze unterrichteten über den Leerwert und die Aktivität der Enzymlösung gegenüber Cellulose, Lichenin und Cellobiose. Der Abbau-grad wurde durch 1—2-tägige Probenahme und Zuckerbestimmung (Mikrowillstätter-Schudel) ermittelt. In Abständen von 6—8 Tagen wurden die Enzymlösungen erneuert. Zu diesem Zweck wurde filtriert (mit dem Filtrat wurden Pentosen- und sonstige Bestimmungen, wie vor allem die Nachhydrolyse zur Ermittlung etwa nicht ganz aufgespaltener Oligosaccharide, ausgeführt), ausgewaschen und getrocknet. Der aus der Zuckerbestimmung ermittelte Abbaugrad wurde an der Gewichtsabnahme kontrolliert. Dann wurde, meist nach abermaligem Mahlen in der Achatmühle, mit neuem Enzym angesetzt.

Für die Ausführung der Mikroanalysen bin ich den HHrn. Dr. E. Wiesenberg u. Dr. J. Harand zu Dank verpflichtet, ebenso den Frll. L. Wagner und E. Horn für die Zuckerbestimmungen.