

- [8] W. R. BAMFORD & T. S. STEVENS, *J. chem. Soc.* 4735 (1952); J. POWELL & M. C. WHITING, *Tetrahedron* 7, 305 (1959); 12, 163 (1961).
- [9] L. FRIEDMAN & H. SCHECHTER, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 5512 (1959); 82, 1002 (1960); 83, 3159 (1961); 87, 659, 661, 935 (1965).
- [10] C. H. DE PUY & D. H. FROEMSDORF, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 634 (1960); L. CAGLIOTI, P. GRASELLI & A. SELVA, *Gaz. chim. ital.* 94, 537 (1964); A. P. KRAPCHO & J. DIAMANTI, *Chemistry & Ind.* 847 (1965); W. KIRMSE, B. G. VON BÜLOW & H. SCHEPP, *Lieb. Ann. Chem.* 697, 41 (1966); K. B. WIBERG & J. M. LAVANISH, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 365 (1966); J. W. WILT, C. A. SCHNEIDER, H. F. DABEK JR., J. F. KRAEMER & W. J. WAGNER, *J. org. Chemistry* 31, 1543 (1966).

264. Zur Reaktion von Reaktivfarbstoffen mit Cellulose

IV. Enzymatische Hydrolyse reaktiv gefärbter Cellulose¹⁾ [1]

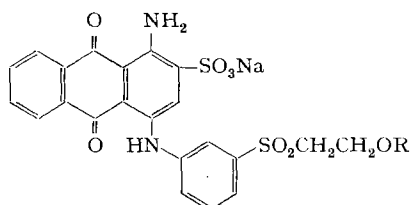
13. Mitteilung über textilchemische Untersuchungen [2]

von P. Hagen²⁾, E. T. Reese und O. A. Stamm

(25. VIII. 66)

1. *Einleitung.* In einer früheren Mitteilung [3] haben wir über den säurehydrolytischen Abbau von reaktiv gefärbter Cellulose berichtet. Wir haben nun Cellulose, die mit dem gleichen Reaktivfarbstoff gefärbt war, auch enzymatisch abgebaut. Diese enzymatische Hydrolyse ist nicht nur im Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung [3], sondern auch vom Standpunkt der Enzymaktivität gegenüber solchen gefärbten Substraten interessant. Das Verhalten reaktiv gefärbter Cellulose gegenüber Enzymen wurde schon verschiedentlich qualitativ geprüft [4] [5], die Konstitution der Abbauprodukte aber noch nie untersucht.

2. *Resultate.* Als Substrat diente diesmal Cellulosepulver, das nach WALSETH [6] mit Phosphorsäure gequollen, getrocknet und auf eine Partikelgröße von $\leq 0,5$ mm gemahlen wurde. Dieses Produkt vom durchschnittlichen Polymerisationsgrad 518 wurde viermal mit je 10% Remazolbrillantblau R (I) angefärbt, wobei nicht reaktiv



I: R = SO₃Na
 II: R = H
 III: R = C₁₂H₁₂O₁₀

gebundener Farbstoff jedesmal erschöpfend mit kochendem Wasser extrahiert wurde. So erhielt man ein blaues Pulver mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad von 0,025.

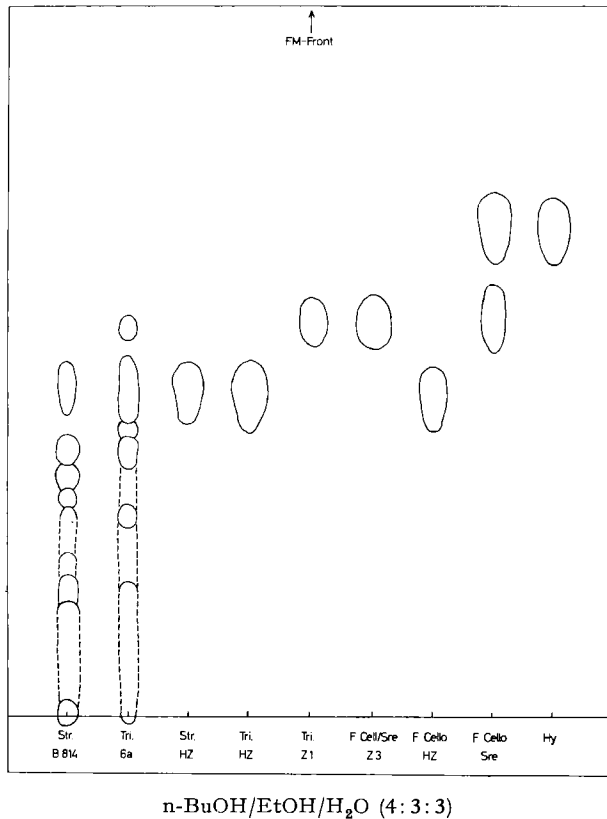
Dieses Substrat wurde einerseits mit dem Kulturfiltrat von *Streptomyces sp.* QM B 814³⁾, andererseits mit dem von *Trichoderma viride* QM 6a³⁾ behandelt. Nach ent-

¹⁾ Auszug aus der Dissertation P. Hagen, ETH, Zürich 1964.

²⁾ Jetzige Adresse: SANDOZ AG, Basel.

³⁾ Quartermaster Culture Collection, Natick, Mass., USA.

sprechender Aufarbeitung erhielt man in beiden Fällen klare, tiefblau gefärbte Hydrolysate. Bei ihrer papierchromatischen Untersuchung (vgl. Fig., Str. B 814 bzw. Tri. 6a) setzte sich jeweils eine gleich rasch wandernde Hauptzone (Str. HZ bzw. Tri. HZ) von zahlreichen weiteren, z. T. schlecht getrennten und schweifbildenden langsamer wandernden Zonen ab. Der Rf-Wert der Hauptzone entspricht dem einer synthetischen Farbstoff-Cellobioseverbindung (vgl. Fig., F Cello HZ). Beim *Trichoderma*-Hydrolysat tritt zudem noch eine, allerdings schwache, Zone (Tri. Z 1) auf, die vor der Hauptzone wandert und denselben Rf-Wert besitzt, wie der im Teil III dieser Reihe [1] als Zone 3 (vgl. Fig., F Cell/Sre Z 3) bezeichnete Farbstoff-Glucoseäther.



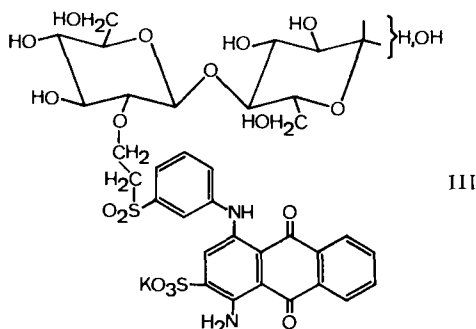
Die langsamer wandernden Verbindungen entsprechen daher offensichtlich gefärbten höheren β -1,4-Oligoglucosiden. Eine quantitative Bestimmung der prozentualen Anteile dieser verschiedenen Zonen ergab für den *Streptomyces*-Abbau 40% Hauptzone und 60% Oligomere, für den *Trichoderma*-Abbau 3% Farbstoff-Glucose-Derivat, 57% Hauptzone und 40% Oligomere.

Da im Gegensatz zum *Trichoderma*-Hydrolysat die Hauptzone beim *Streptomyces*-Hydrolysat sauber von den nachfolgenden Zonen abgetrennt war, haben wir diese Zone aus letzterem Hydrolysat isoliert. Dazu wurde das konzentrierte Hydrolysat durch Chromatographie auf Cellulosepulversäulen vorfraktioniert. Von den

zahlreichen untersuchten Möglichkeiten weiterer Reinigung führte nur die präparative Papierchromatographie auf Einzelchromatogrammen zu reinen Präparaten. Die entsprechenden Zonen wurden mit kaltem Wasser extrahiert, durch Sephadex-Chromatographie und Dialyse von aus dem Papier stammenden Verunreinigungen und von anorganischen Salzen befreit und schliesslich gefriergetrocknet. Die so isolierte Verbindung war chromatographisch und papierelektrophoretisch in verschiedenen Fließmitteln bzw. Puffersystemen einheitlich. Die Elementaranalysen entsprachen einem Produkt aus einem Farbstoffrest und einer Cellobiosemolekel. Diese Zusammensetzung liess sich durch die Behandlung mit wässrigem Alkali bestätigen. Dabei wird der Farbstoffrest leicht durch eine 1, 2-Eliminierung abgespalten, und man findet sowohl im Blindversuch mit Cellobiose allein als auch mit der gereinigten blauen Verbindung bei der Entwicklung der Chromatogramme mit Anilinhydrogenphthalat, neben einer schwachen Zone mit einem R_G -Wert von 2,1, eine Hauptzone, welche wie Cellobiose wandert. Spaltungsversuche der Substanz aus der Hauptzone mit β -Glucosidase aus Mandeln verliefen erfolglos (im Blindversuch lieferte Cellobiose quantitativ Glucose). Wurde das Hauptzonenprodukt dagegen mit 0,5N oder 1N Schwefelsäure hydrolysiert, so erhielt man neben Glucose eine neue blaue Verbindung, die sich durch Adsorption an Talk abtrennen liess. Diese neue blaue Verbindung besass den gleichen R_f -Wert wie die am raschesten wandernde Zone aus dem *Trichoderma*-Hydrolysat (Tri. Z 1) bzw. wie der seinerzeit charakterisierte Farbstoff-Glucoseäther (Zone 3 in [1]) aus dem säurehydrolytischen Abbau von mit Remazolbrillantblau R angefärbter Hydrocellulose. Auch papierelektrophoretisch verhielt sich dieses Hydrolysenprodukt gleich wie die früher beschriebene Zone 3. Der Farbstoff haftet am C-2 der Glucose: Erschöpfende Methylierung des Hauptzonenproduktes mit Methyljodid und Silberoxid in Dimethylformamid nach KUHN, TRISCHMANN & Löw [7], Eliminierung des Farbstoffs durch Alkalihydrolyse und der Methylglucosidfunktion durch saure Verseifung und anschliessende Papierchromatographie führte nach dem Ergebnis von Farbreaktionen und des Vergleichs mit synthetischen Derivaten nur zu 3,4,6-Tri-O-methylglucose neben sehr wenig 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose; das Auftreten dieser letzteren lässt sich dadurch erklären, dass trotz den relativ schwach alkalischen Bedingungen der Permethylierung der Farbstoff bereits teilweise abgespalten wird. Wir versuchten deshalb, die Reaktion bei tieferen Temperaturen durchzuführen, doch verlief dann die Methylierung nicht mehr vollständig, was durch das Auftreten von Mono- und Di-O-methylglucosen nach Hydrolyse angezeigt wurde.

Es fehlte nun noch der Nachweis, an welchem Glucoserest der Cellobiose der Farbstoff gebunden war. Permethylierung des Farbstoff-Cellobioseäthers und nachfolgender Abbau führten zu keinen eindeutigen Resultaten, da neben der 3,4,6-Tri-O-methylglucose die 2,3,6-Tri-O-methylglucose nicht sicher nachgewiesen werden konnte; immerhin fehlten Di-O-methylglucosen. Es ist bekannt, dass Natriumborhydrid Aldosen zu den entsprechenden Alkoholen reduziert, Glucoside aber nicht angreift [8]. Wenn nun der Farbstoffrest am nicht-reduzierenden Ende der Cellobiose-Einheit sitzt, sollte nach Borhydrid-Reduktion und Hydrolyse der Osidbindung Sorbitol nachweisbar sein, im andern Fall aber Glucose. Bei der Durchführung dieser Reaktion wurde die Lösung entfärbt, der Farbstoff also erwartungsgemäss bei der Reduktion zerstört. Nach Hydrolyse und Abtrennung ionischer Produkte mittels

Ionenaustauscher liess sich im Eluat papierchromatographisch nur Sorbitol nachweisen, während im Kontrollversuch mit Cellobiose unter den gleichen Bedingungen Glucose und Sorbitol identifiziert werden konnten. Das zeigt, dass der Farbstoffrest



an der nicht-reduzierenden Glucoseeinheit der Cellobiose gebunden war. Damit war die endgültige Konstitution III des Hauptprodukts aus dem Abbau mit dem *Streptomyces*-Enzym bewiesen.

Da sich die Hauptzone des *Trichoderma*-Hydrolysats chromatographisch und papierelektrophoretisch gleich verhält wie das *Streptomyces*-Abbau-Hauptprodukt, darf mit grosser Sicherheit angenommen werden, dass es sich in beiden Fällen um dieselbe Verbindung handelt. Die am raschesten wandernde Zone im *Trichoderma*-Hydrolysats, deren Anteil ca. 3% ausmacht, ist kein Farbstoffglucosid, sondern ein Farbstoff-Glucoseäther, da sie bei einer Behandlung mit 1N Schwefelsäure unverändert blieb. Da ihr Verhalten chromatographisch und elektrophoretisch dem der früher beschriebenen Zone 3 [1] entspricht, muss es sich um in 2-Stellung mit Farbstoff verätherte Glucose handeln.

Wir haben ferner die bei der Reaktion von Cellobiose mit Remazolbrillantblau R entstehenden Produkte untersucht. Der Farbstoff wurde in sodaalkalischer Lösung mit einem Überschuss an Cellobiose umgesetzt. Nach Neutralisation liessen sich die gefärbten Verbindungen an Talk adsorbieren und der überschüssige Zucker abtrennen. Die gefärbten Produkte wurden isoliert und papierchromatographisch geprüft. Man erhielt sieben Zonen, von denen die Hauptzone (ca. 60% der Gesamtmenge) durch präparative Papierchromatographie isoliert wurde (vgl. Fig., FCello HZ). Diese papierchromatographisch einheitliche Substanz lieferte bei saurer Hydrolyse (vgl. Fig., FCello Sre) 79% Hydroxyfarbstoff II (Hy) und Glucose, sowie 21% Farbstoff-Glucoseäther; es sind also rund 79% des Farbstoffs in dieser Hauptzone nur glucosidisch an die Cellobiose gebunden. Die Untersuchung des Farbstoffäthers mittels der früher beschriebenen Methoden [1] bestätigte, dass Remazolbrillantblau R unter den gewählten Bedingungen in alkalischem Milieu vor allem die 2-Stellung der Glucoseeinheit veräthert.

Zur Prüfung, wie weit sich mit verschiedenen Reaktivfarbstofftypen gefärbte Textilien in Bezug auf eine eventuelle Hemmung des mikrobiologischen Abbaus unterscheiden, haben wir die Schimmelpilz- bzw. Verrottungsbeständigkeit von 2-proz. Ausfärbungen auf Baumwoll-Cretonne mit je einem Anthrachinon- bzw. Azochromo-

phor aus der Dichlortriazinyl- (Procionbrillantblau R⁴) und Procionbrillantorange G⁵) und aus der Monochlortriazinylreihe (Cibacronblau 3 G⁶) und Cibacronbrillantorange G⁶), sowie mit Remazolbrillantblau R untersucht⁷) [11].

Gegenüber dem cellulosezerstörenden Pilz *Chaetomium globosum* zeigte sich eine geringe Differenzierung zwischen den fünf Ausfärbungen: Nach 7 Tagen konnte im Vergleich mit ungefärbter Baumwolle beim Remazolbrillantblau R eine etwas stärkere Hemmwirkung festgestellt werden als bei Procionbrillantorange G und bei Procionbrillantblau R; bei Cibacronbrillantorange G und Cibacronblau 3 G war keine Hemmwirkung feststellbar. Nach 14 Tagen waren alle Proben völlig zerstört.

Bei den Versuchen mit einem Sporengemisch der drei Pilze *Chaetomium globosum*, *Stachybotris atra* und *Trichoderma viride* waren die Proben schon nach 7 Tagen sehr stark bewachsen, wobei ebenfalls das mit Remazolbrillantblau R gefärbte Gewebe einen etwas schwächeren Pilzbefall aufweist. Nach 14 Tagen waren wiederum sämtliche Gewebestreifen völlig zerstört. Von einer Schutzwirkung kann also in keinem Fall gesprochen werden.

3. *Diskussion.* Im Gegensatz zu früheren Versuchen [4] haben wir diesmal die Hydrolyse nicht in Gegenwart von lebenden Organismen durchgeführt, sondern mittels zellfreier Cellulase-Extrakte. Experimente mit dem damals verwendeten, säurehydrolytisch abgebauten Viscosepulver vom durchschnittlichen Polymerisationsgrad 32 [4], einem hochkristallinen Material, führten aber zu keinem Erfolg. Es ist bekannt, dass zellfreie Kulturfiltrate gegenüber nativer, d. h. relativ hoch kristalliner Cellulose viel weniger aktiv sind als die entsprechenden Kulturen der Mikroorganismen selbst [12]. Offenbar besitzen letztere eine von REESE & GILLIGAN als C₁-Enzym [13] (S-Faktor [14]) bezeichnete Komponente, welche imstande ist, eine geeignete Disaggregation der nativen Cellulose zu hydratisierten Polyanhydroglucoseketten herbeizuführen. Jede Behandlung des Substrats, welche den kristallinen Celluloseanteil herabsetzt, d. h. die Quellfähigkeit der Cellulose erhöht, erleichtert den Enzymangriff [15]. Daher haben wir mit nach WALSETH [6] vorbehandelter Cellulose gearbeitet. Die Anfärbbarkeit des so gewonnenen Materials ist gut; der erhaltene Substitutionsgrad entspricht im Durchschnitt einer Farbstoffmolekel an jeder 40. Anhydroglucoseeinheit.

Durch die Einführung von Substituenten in die Cellulosemolekel wird im allgemeinen der enzymatische Abbau verlangsamt, sofern nicht die Substitution ihn durch Herabsetzung der Kristallinität bzw. Erhöhung der Quelleigenschaften begünstigt. Bei einem Substitutionsgrad von ca. 1 ist Cellulose resistent [16]. Es scheint jedoch bereits ein Substituent an jeder zweiten Anhydroglucoseeinheit diese Resistenz zu verleihen [15]. Dabei sind grosse Substituenten wirkungsvoller als kleine [17]. Der durchschnittliche Substitutionsgrad sagt natürlich nichts über die wirkliche Verteilung der Substituenten in der Cellulosemolekel aus. Eine Anhäufung von Substituenten wird an den für das betreffende Reagens, also auch für das Enzym am leichtesten zugänglichen Stellen zu finden sein; d. h., die Reduktion der Enzymaktivität

⁴) Konstitution vgl. [4].

⁵) Konstitution vgl. [9].

⁶) Konstitution vgl. [10].

⁷) Für die Durchführung der Verrottungsteste sind wir Herrn Dr. O. WÄLCHLI, EMPA, Hauptabteilung C, St. Gallen, zu Dank verpflichtet.

wird immer grösser sein als aus dem durchschnittlichen Substitutionsgrad vermutet werden könnte. Das trifft natürlich in besonderem Masse für unsere grosse Farbstoffmolekel zu, und es ist daher nicht erstaunlich, dass die Hydrolyse nur partiell bis zur Cellobiosestufe führte. Zahlreiche Hinweise [17] [18] deuten darauf hin, dass Substituenten an der Anhydroglucoseeinheit die benachbarte Osidbindung gegen Cellulasen schützen. Das von uns verwendete Enzym von *Streptomyces* sp. QM B 814 greift nach PERLIN [19] nur 4-substituierte β -D-Glucosyleinheiten an. Das stimmt mit unseren Ergebnissen überein: Der Farbstoffsubstituent sitzt am nicht-reduzierenden Glucoserest der Cellobiose, d. h. die gespaltene Osidbindung befindet sich an dem nur in 4-Stellung substituierten Anhydroglucoserest.

Das Auftreten gefärbter Oligomerer verschiedener Kettenlänge spricht für den heute in den meisten Fällen angenommenen statistischen Angriff des Enzyms (Endoenzyme) und gegen einen systematisch vom Ende her erfolgenden Abbau (Exoenzyme). Während die *Streptomyces*-Enzyme Cellulose zu Cellobiose und Cellotriose neben sehr wenig Glucose abbauen, ist die *Trichoderma*-Cellulase aktiver, da man Cellobiose und Glucose erhält. Diese Verschiedenheit zeigt sich auch beim Abbau des gefärbten Substrats, indem beim *Streptomyces*-Abbau 60%, beim *Trichoderma*-Abbau aber nur noch 40% höhere Farbstoff-Oligosaccharide erhalten werden. Wenn man die gefärbte WALSETH-Cellulose mit 86-proz. Schwefelsäure abbaut, wie wir das seinerzeit bei dem fünfmal mit je 10% Farbstoff angefärbten Baumwollgewebe gemacht haben [3], so erhält man ein analoges Resultat: Man findet rund 12% Hydroxyfarbstoff und 88% Farbstoff-Glucoseäther. Zu einem entsprechenden Ergebnis führt auch die Behandlung der *Streptomyces*-Hydrolysate mit starker Schwefelsäure. Da der Hydroxyfarbstoff, wie früher gezeigt [1] [3], von glucosidisch gebundenem Farbstoff herkommen muss, liegen diese Farbstoffglucoside hier in Form höherer Oligoglucoside vor.

Für die Wirkung von β -Glucosidase gelten ähnliche, sterisch bedingte Enzymhemmungen wie für Cellulasen [20]. So lassen sich β -Glucopyranoside, bei denen die Hydroxylgruppen an den Ring-C-Atomen 2, 3 oder 4 substituiert sind, mit Mandelemulsin nicht mehr enzymatisch spalten. Bei Substitution am Kohlenstoffatom 6 nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit zunehmender Grösse des Substituenten ab; wenn letzterer zu gross wird (z. B. Benzoyl- oder Tosylgruppen), so wird sie unmessbar klein. Tatsächlich wird auch der von uns isolierte Farbstoff-Cellobioseäther mit einer in 2-Stellung substituierten nicht reduzierenden Einheit von β -Glucosidase aus Mandeln nicht gespalten. Man muss sich allerdings darüber klar sein, dass sich die Ergebnisse mit Mandelemulsin nicht ohne weiteres auf β -Glucosidasen anderer Herkunft übertragen lassen. Trotzdem ist es erstaunlich, dass in den Abbauprodukten mittels *Trichoderma*-Enzymen, die ja β -Glucosidasen enthalten, eine allerdings sehr geringe Menge Farbstoff-Glucoseverbindung gefunden wird. Dabei handelt es sich offenbar um eine 2-O-Farbstoff-Glucose. Da es bei dem niedrigen Substitutionsgrad rein statistisch und auch sterisch unwahrscheinlich ist, dass an einer reduzierenden Eindeinheit einer Kette neben der stark bevorzugten Glucosidbildung noch eine weitere Substitution erfolgt, dürften hier diese β -Glucosidasen die Osidbindung einer substituierten Anhydroglucose-Einheit gespalten haben.

Im übrigen bestätigen die strukturanalytischen Untersuchungen an den Farbstoff-Cellobioseäthern die bereits früher erhaltenen Resultate [1]. Es zeigt sich auch

hier wieder, dass eine Identifizierung der Abbauprodukte durch chromatographischen Vergleich mit aus Cellobiose und Farbstoff hergestellten Verbindungen zu falschen Ergebnissen führt; im Synthese-Gemisch enthält nämlich das Hauptprodukt den Farbstoff zum grössten Teil osidisch gebunden, obwohl es den gleichen Rf-Wert hat wie das Hauptprodukt aus dem enzymatischen Abbau.

Der höchst unerwünschte mikrobiologische Abbau von Textilien hat grösste wirtschaftliche Bedeutung. Da wir früher bei einem Dichlortriazinylfarbstoff eine Hemmung des Wachstums von *Cellulomonas uda* beobachtet haben [11], war es naheliegend zu prüfen, ob diese Hemmung auch noch bei der entsprechenden Ausfärbung vorliegt und falls dies zutrifft, ob es sich dabei um einen spezifischen Einfluss des Reaktivsystems oder des Chromophors handelt. Wie die Unterschiede zwischen den Versuchen mit *Chaetomium globosum* und denjenigen mit dem Pilzgemisch zeigen, kann eine gewisse differenzierende Wirkung zwischen Vinylsulfon-Farbstoff und Cyanurchlorid andererseits festgestellt werden. Danach würden über eine Ätherbrücke gebundene Farbstoffe im Vergleich zu esterartig gebundenen Farbstoffen einen gewissen Schutz gegen Pilzbefall zeigen. Ob diese Aussage aber signifikant ist, könnten erst grössere Reihenversuche zeigen, trotzdem gefunden wurde, dass normalerweise bei der Enzymhydrolyse von Celluloseestern mehr Glucose produziert wird als bei Celluloseäthern vom gleichen Substitutionsgrad [17]. Eine konstitutionsbedingte Hemmwirkung ist bei den untersuchten Proben nicht festzustellen, da Anthrachinon- und Azotypen nicht unterschieden werden. Wie gefährlich aber Verallgemeinerungen hier sind, zeigt die Tatsache, dass *Cellulomonas uda* zwar Färbungen mit Procionbrillantblau R (Estercharakter) nicht abbaut, sich dagegen für die Hydrolyse von Remazolbrillantblau R-Färbungen (Äthercharakter) eignet.

Experimentelles. - 1. *Allgemeines.* Für die chromatographischen Methoden, Niedervolt-Papierelektrophorese, Dialyse, quantitative Bestimmung der papierchromatisch getrennten Farbstoffe, Spektren sowie die Abkürzungen für Papiere, Fließmittel, Entwicklungsreagenzien und Puffersysteme gelten die früher gemachten Angaben [1] [3]. Als neues Fließmittel wurde das Gemisch *n*-Butanol/Pyridin/Wasser 4:1:1 (FF) [21] und als neuer Puffer 5,9 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ + 3,1 g H_3BO_3 in 1000 ml dest. Wasser (P 9; pH = 8,2) [11] eingesetzt.

Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP) wurde viskosimetrisch nach der EWN-Methode⁸⁾ [22], der durchschnittliche Substitutionsgrad durch Verbrennung der Proben nach SCHÖNIGER [23] und konduktometrische Titration des Sulfats [24] erhalten.

Für die Durchführung der Elementaranalysen danken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ (analytische Laboratorien der CIBA AG, Basel).

2. «WALSETH»-Cellulose [6] [25]. 20 g entfettete Baumwolle werden in einem Mörser mit 200 ml 85-proz. Phosphorsäure bei 0–4° während 4 Std. behandelt, wobei die gelatinöse Masse gelegentlich mit einem Pistill verrührt wird. Dann wird die Mischung unter heftigem Rühren in einen grossen Überschuss Wasser gegossen. Man filtriert, suspendiert das Produkt wieder in Wasser und wiederholt das Auswaschen bis zur Säurefreiheit. Nach Trocknung wurde es in einer CULATTI-Mikroschlagmühle gemahlen (Porengrösse des Siebes 0,5 mm; DP = 518).

3. *Anfärbung der Walseth-Cellulose.* 100 g WALSETH-Cellulose wurden wie für das säurehydrolytisch abgebaute Viscosepulver beschrieben [3] angefärbt. Die Operation wurde dreimal wiederholt. Nach Trocknung erhielt man ein dunkelblaues lockeres Pulver (DS = 0,025).

4. *Enzymatischer Abbau der gefärbten Cellulose.* Als Enzymlösungen dienten zellfreie Filtrate von Kulturen von *Streptomyces* sp. B 814 bzw. von *Trichoderma viride* QM 6a [25]. Zu einer Suspension von 10 g gefärbter Cellulose in 250 ml 0,01M Citratpuffer (pH 6,0) wurden 250 ml *Strepto-*

⁸⁾ SNV-Norm Nr. 95589.

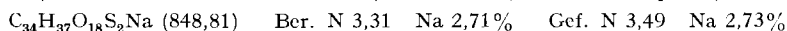
myces-Cellulase-Filtrate (13 μ /ml) mit 1 ml 1-proz. Merthiolat-Lösung gegeben. Nach zweitägiger Inkubation bei 50° wurde filtriert und der Rückstand wiederum mit frischem Enzym behandelt, wobei praktisch alles in Lösung ging. Die vereinigten Filtrate wurden zum Sieden erhitzt um die Enzyme zu inaktivieren und im Rotationsverdampfer bei 40–50° eingengt; pH des Konzentrats 7,4.

Der Abbau mit der *Trichoderma*-Cellulase erfolgt analog; pH-Wert der Pufferlösung 4,5, Inkubationsperioden je 4 Tage, pH-Wert der konzentrierten Filtrate 7,3. 79 g gefärbte Cellulose gaben 8,8 g nicht abgebautes Material.

5. *Säurehydrolyse der Enzymhydrolysate*. In 86-proz. bzw. 1N Schwefelsäure wie im Teil II [3] für die Reaktionsprodukte von Remazolbrillantblau R mit Glucose beschrieben.

6. *Säurehydrolyse der gefärbten WALSETH-Cellulose*. In 86-proz. Schwefelsäure wie im Teil II [3] für das Hydrocellulosepulver beschrieben.

7. *Isolierung und Reinigung des Hauptprodukts aus dem Abbau mit Streptomyces-Cellulase*. Papierchromatographisch wurden neben einer sauber abgetrennten Hauptzone (Rf 0,45; FA; E 202) verschiedene ebenfalls blau gefärbte Zonen mit Rf-Werten von 0 (der grösste Teil) bis 0,4 festgestellt. Zur Isolierung der Hauptzone wurden je 10 ml des konzentrierten Hydrolysats an 70 g WHATMAN-Cellulosepulver (Säule 3,5 \times 18 cm) mit FB chromatographiert. Die nur noch wenig mit nachfolgenden Fraktionen verunreinigte zuerst eluierte Hauptzone wurde im Vakuum eingengt, in Form von Banden auf E 226-Papier ausgestrichen und mit FA als Durchlaufchromatogramme entwickelt (Temp. 21°, Laufzeit 43 Std.). Die jetzt völlig von gefärbten Nebenprodukten abgetrennte Hauptzone wurde ausgeschnitten, die Streifen wurden dreimal mit Wasser extrahiert, die Extrakte eingengt, zweimal über Sephadex chromatographiert und die gefärbten Eluate wieder konzentriert. Nach Dialyse (6 Std. gegen Wasser) wurde das Produkt gefriergetrocknet. 130 ml Hydrolysat lieferten 100 mg Trockensubstanz. Rf (E 202; FA) = 0,45; ME = 1,15 (P 9; Versuchsdauer 7 Std.; 2,5 V/cm; 0,25 mA/cm, Raumtemp. 21°).



8. *Reaktionen mit dem isolierten Abbauprodukt*. – a) *Abbau mit β -Glucosidase* (FLUKA AG, Buchs): in Analogie zur Vorschrift im Teil II [3] durchgeführt. Nach 90 Std. war die gefärbte Probe unverändert, während unter den gleichen Bedingungen mit Cellobiose nach 24 Std. nur noch Glucose nachgewiesen werden konnte.

b) *Säurehydrolyse*: 16 mg Abbauprodukt wurden in 6 ml 0,5N Schwefelsäure 72 Std. bei 95–98° gehalten. Die blaue Lösung wurde mit 18 ml dest. Wasser verdünnt, der Farbstoff an 25 g Talk adsorbiert und der Talk mit dest. Wasser gewaschen, bis der Ablauf neutral war. Dann wurde die gefärbte Komponente mit Aceton vom Talk abgelöst. Nach Entfernen des Acetons erhielt man 12 mg blauen Rückstand, der papierchromatographisch und papierelektrophoretisch identisch war mit der früher beschriebenen Zone 3 [1] und für die Permethylierung verwendet wurde. Das wässrige Filtrat und das Waschwasser wurden vereinigt, auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Bariumcarbonat bis pH 6 neutralisiert. Nach Filtration liess sich im Filtrat papierchromatographisch (E 202; FA) Glucose (S 1) nachweisen.

c) *Alkalihydrolyse*: 10 mg Abbauprodukt wurden unter Stickstoff in 10 ml 0,1N NaOH 6 Std. bei 95° (Badtemp.) gehalten. Nach Neutralisation mit verd. Schwefelsäure wurde die Lösung über Amberlite IR-120 (H⁺-Form; 0,8 \times 10 cm) und über Amberlite IR-45 (OH⁻-Form; 0,8 \times 20 cm) filtriert. Man eluierte die Austauscher mit dest. Wasser (280 ml Eluat). Nach Einengen wurde die Lösung papierchromatographisch (E 202; FB; Durchlaufchromatogramm) untersucht, Sichtbarmachung mit der Sprühreagenzien S 1 und S 2. In genau gleicher Weise wurde ein Blindversuch mit 10 mg Cellobiose durchgeführt. In beiden Fällen konnte neben Cellobiose eine geringe Menge einer Verbindung mit einem R_G-Wert⁹⁾ von 2,1 nachgewiesen werden.

d) *Permethylierung des Abbauproduktes bzw. des nach Säurehydrolyse erhaltenen Farbstoffs*: erfolgte wie früher [1] beschrieben.

e) *Reduktion mit Natriumborhydrid*: 10 mg Abbauprodukt und 2 mg Natriumborhydrid wurden in 2 ml dest. Wasser bei Raumtemperatur 15 Std. stengelassen. Die entfärbte Lösung wurde mit 2 ml 1N Schwefelsäure versetzt und 72 Std. bei 95° gehalten. Nach Filtration wurde

⁹⁾ R_G = Rf-Wert Substanz/Rf-Wert Glucose.

mit Bariumcarbonat auf pH 6 gebracht, filtriert und der Rückstand gut ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden auf 1–2 ml konzentriert, über Amberlite IR-120 (H^{\oplus} -Form, $0,8 \times 10$ cm) und Amberlite IR-45 (OH^{\ominus} -Form, $0,8 \times 20$ cm) filtriert und nachgewaschen. Das Eluat (180 ml) wurde bis fast zur Trockne eingeeengt, dreimal mit je 10 ml Methanol abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und nochmals über eine Kationenaustauschersäule (2 g Dowex 50 W; H^{\oplus} -Form; $0,7 \times 10$ cm) gegeben und mit Wasser nachgewaschen. Dieses Eluat (120 ml) wurde eingeeengt und papierchromatographisch (E 202; FF; Durchlaufchromatogramm; Laufzeit 7 Tage) untersucht (S 1, S 3). Es konnte Sorbit, aber keine Glucose festgestellt werden, während mit Cellobiose unter denselben Bedingungen Glucose und Sorbit erhalten wurde.

9. *Synthese, Isolierung und Reaktionen der Farbstoff-Cellobiose-Verbindung.* Die Umsetzung von Remazolbrillantblau R mit Cellobiose in sodaalkalischem Milieu ist im Teil II [3] beschrieben. Die Hauptzone wurde analog isoliert und gereinigt wie das Hauptprodukt des *Streptomyces*-Abbaus; die Permethylierung und die Analyse der abfallenden Methylglucosen erfolgten nach der beschriebenen Methodik [1].

10. *Prüfung der Schimmelpilz- resp. Vervollständigung¹⁰⁾.* Nach konventionellen Ausziehverfahren mit je 2% Farbstoff gefärbte Baumwoll-Cretonne-Gewebe [12] wurden einerseits mit *Chaetomium globosum* (Stamm EMPA 1), andererseits mit dem Sporengemisch der Pilze *Chaetomium globosum* (Stamm EMPA 1), *Stachybotris atra* (Stamm EMPA 119) und *Trichoderma viride* (Stamm EMPA 113) geprüft. Nährmedium: Agarplatten in steilen PÉTRI-Schalen aus je 20 ml mineralischem Nähragar, auf welche je 1 Rundfilter (Durchmesser 7 cm) aufgelegt wurde. Die Prüfstreifen (Streifen in Kettrichtung; $1,5 \times 8$ cm) wurden einzeln auf die Agarplatten gelegt und hierauf mit je 1 ml der Sporenaufschwemmungen der Prüfpilze beimpft. Es wurden je 6 Parallelversuche bei $29 \pm 1^{\circ}$ angesetzt; relative Luftfeuchtigkeit 98–100%. Nach 7 und 14 Tagen wurden die Streifen auf Pilzbefall und Zustand kontrolliert.

SUMMARY

Cellulose, preswollen with phosphoric acid and dyed with Remazolbrillant Blue R, was treated with culture filtrate of *Streptomyces* sp. QM B 814 and *Trichoderma viride* QM 6a respectively. The main degradation product from the *Streptomyces* hydrolysis is shown to be a 2-O-dye- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucose. Besides higher coloured β -1,4-oligoglucosides in both hydrolysates, a small amount of a dye-glucose ether was found with the *Trichoderma* enzymes. Dyeings with different chromophoric and reactive systems respectively showed no significant differentiation with respect to resistance against enzymic attack in rot-proof tests.

Technisch-chemisches Laboratorium
Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich
(P. H. und O. A. S.) und
Microbiology Laboratory U.S. Army
Laboratories, Natick, Mass. USA
(E. T. R.)

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teil III: O. A. STAMM, Helv. 46, 3019 (1963).
- [2] 12. Mitteilung: T. ABEND, O. A. STAMM & H. ZOLLINGER, Helv. 49, 1319 (1966).
- [3] O. A. STAMM, Helv. 46, 3008 (1963).
- [4] O. A. STAMM, H. ZOLLINGER, H. ZÄHNER & E. GÄUMANN, Helv. 44, 1123 (1961).
- [5] U. BAUMGARTE, Melliand Textilber. 43, 182 (1962); G. v. HORNUFF & G. D. GOLLNISCH, Wiss. Zs. Techn. Univ. Dresden 11, 677 (1962).

¹⁰⁾ Die Prüfungen wurden gemäss der internen Prüfvorschrift VII/9 der EMPA, St. Gallen, durchgeführt.

- [6] C. S. WALSETH, *Tappi* 35, 225 (1952).
 [7] R. KUHN, H. TRISCHMANN & I. LÖW, *Angew. Chem.* 67, 32 (1955).
 [8] K. SCHENKER, *Angew. Chem.* 73, 81 (1961); B. A. LEWIS, F. SMITH & A. M. STEPHEN in R. L. WHISTLER & M. L. WOLFROM (eds.), «Methods in Carbohydrate Chemistry», Vol. II, Academic Press, New York 1963, p. 68; M. ABDEL-AKHER, J. K. HAMILTON & F. SMITH, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 4691 (1951).
 [9] H. ZOLLINGER, *Angew. Chem.* 73, 125 (1961).
 [10] J. PANCHARTEK, Z. J. ALLAN & F. MŮZÍK, *Coll. czech. chem. Commun.* 25, 2783 (1960).
 [11] Vgl. O. A. STAMM, *Habilitationsschrift*, ETH, Zürich 1963.
 [12] E. T. REESE, *Appl. Microbiol.* 4, 39 (1956); J. A. GASCOIGNE & M. M. GASCOIGNE, «Biological Degradation of Cellulose», Butterworth, London 1950.
 [13] E. T. REESE & W. GILLIGAN, *Text. Res. J.* 24, 663 (1954).
 [14] P. B. MARSH, K. BOLLENBACHER, M. L. BUTLER & L. R. GUTHRIE, *Text. Res. J.* 23, 878 (1953).
 [15] Vgl. E. B. COWLING in E. T. REESE (ed.), «Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials», Pergamon Press, Oxford 1963.
 [16] H. S. LEVINSON & E. T. REESE, *J. gen. Physiol.* 33, 601 (1950); R. G. H. SIU in E. OTT & H. M. SPURLIN (eds.), «Cellulose and Cellulose Derivatives», Part I, Interscience Publ., New York 1954.
 [17] E. T. REESE, *Ind. Eng. Chemistry* 49, 89 (1957).
 [18] M. HOLDEN & M. W. TRACEY, *Biochem. J.* 47, 407 (1950).
 [19] A. S. PERLIN in E. T. REESE (ed.), «Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials», Pergamon Press, Oxford 1963.
 [20] Vgl. H. BAUMANN & W. PIGMAN in W. PIGMAN (ed.), «The Carbohydrates», Academic Press, New York 1957.
 [21] D. J. D. HOCKENHULL, *Nature* 171, 982 (1957).
 [22] G. JAYME & W. BERGMANN, *Das Papier* 11, 280 (1957).
 [23] W. SCHÖNIGER, *Mikrochim. Acta* 1956, 859; H. MALISSA & L. MACHHERNDL, *ibid.* 1952, 1089.
 [24] J. P. DIXON, *Analyst* 86, 597 (1961); W. SAUR, *Diss. ETH*, Zürich 1965.
 [25] E. T. REESE & M. MANDELS in R. L. WHISTLER (ed.), «Methods in Carbohydrate Chemistry», Vol. III, Academic Press, New York 1963.

265. Zur Reaktion von Reaktivfarbstoffen mit Cellulose

V. Untersuchung von Nebenprodukten bei der Applikation von Reaktivfarbstoffen¹⁾²⁾

14. Mitteilung über textilchemische Untersuchungen³⁾

von P. Rys und O. A. Stamm

(25. VIII. 66)

Herrn Prof. Dr. H. HOPPF zum 70. Geburtstag gewidmet

Von den zahlreichen Gruppierungen, die als Reaktivsysteme bei Farbstoffen in Frage kommen, haben sich in der Praxis nur wenige durchsetzen können. Ein solches System ist die β -Sulfato-äthylsulfonyl-Gruppe, die z. B. in den sogenannten Remazolfarbstoffen vorliegt. Unsere Untersuchungen haben wir mit Remazolbrillantblau R

¹⁾ Auszug aus der Dissertation P. Rys, ETH, Zürich 1965.

²⁾ Vorgetragen an der Winterversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft, 19. 2. 1966.

³⁾ Vorhergehende Mitteilung: [1].