

**352. Hans Pringsheim und Walter Fuchs:**  
**Über den bakteriellen Abbau von Ligninsäure.**

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 20. Juli 1923.)

Unter den verschiedenen Bestandteilen des Holzes ist die inkrustierende Substanz ohne Frage die biologisch resistenterste. Während die Cellulose und die Pentosane für sich unschwer durch bakterielle Gärungen bis zur völligen Lösung angegriffen werden können, wurde der biologische Abbau des Lignins bisher noch nicht beobachtet. Mit diesen Umständen hat man die Entstehung der Kohle in Zusammenhang gebacht: Franz Fischer und Schrader haben ihre »Lignin-Hypothese der Kohle« durch verschiedene rein chemische Belege gestützt<sup>1)</sup>.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, die durch alkalische Kochung gewinnbare Holz-Ligninsäure durch Mikroorganismen abzubauen, wozu wir als Beispiel die Kiefernholz-Ligninsäure wählten. Als besonders vorteilhaft erwies es sich, die Säure als Ammoniumsalz in Lösung zu bringen und als Impfmateriale Walderde zu benutzen. Die Ligninsäure schien sich hierbei als ein geeignetes »Anhäufungs«-Material<sup>2)</sup> darzubieten, da nach den von Frau Dr. phil. Stefanie Lichtenstein vom hiesigen physiologischen Institut ausgeführten bakteriologischen Untersuchungen jedenfalls nur wenige Bakterienarten auf dem ligninsauren Ammonium in Gegenwart rein anorganischer Nährsalze zum Wachstum gelangten; ob die zwei isolierten Aeroben oder die in anaeroben Kulturen gewachsenen Bakterien für die Ligninzerersetzung verantwortlich sind, wird weiter geprüft.

Um die mit der Erde beigebrachten Verunreinigungen auszuscheiden, impften wir in tiefer Flüssigkeitsschicht 2-mal auf neue Nährlösung um. Bei der Verarbeitung des dritten Ansatzes zeigte sich, daß der Angriff der Bakterien auf die Ligninsäure ein energischer gewesen war: Wir gewannen bei einem 2-prom. Ansatz durch Säurefüllung 60%, bei einem 1-prom. nur 40% zurück, und die wiedergewonnene Substanz unterschied sich nach der Elementaranalyse wie auch durch den Methoxylgehalt wesentlich vom Ausgangsmaterial. Auch enthielt sie im Gegensatz zur ursprünglichen Ligninsäure bis zu 50% eines in Alkohol löslichen Anteils. Die zurückgewonnene Säure, besonders aber der alkohol-lösliche Teil, hatten einen Teil ihres Methoxylgehaltes unter dem Einfluß der Bakterien eingebüßt, und der alkohol-lösliche war auch beträchtlich kohlenstoff-reicher als das Ausgangsmaterial. Diese Befunde lassen sich im Sinne der Fischer-Schrader-schen Hypothese verwerten.

Unser Ausgangsmaterial enthielt noch gegen 6% Pentosan<sup>3)</sup>. Der heutige Stand der Forschung gibt keinen endgültigen Aufschluß darüber, ob Pentosan einen integren Bestandteil des Lignins darstellt: Wir haben absichtlich auf die auf verschiedene Weise mögliche Entfernung dieses durch Destillation mit Salzsäure nachweisbaren Pentosan-Anteiles verzichtet, um unser Ausgangsmaterial keinen unnötigen Gefahren auszusetzen.

<sup>1)</sup> vergl. Fischer und Schrader, Entstehung und chemische Struktur der Kohle, Essen 1922.

<sup>2)</sup> vergl. Ökologie. »Anhäufungen« nach Beijerinck. Beiträge zur natürlichen Reinzucht der Mikroorganismen. Berlin. Inst. f. Gärungsgewerbe 1907.

<sup>3)</sup> vergl. Hägglund, Zur Kenntnis des Salzsäure-Lignins; Kürschner, Über Pentosan im Fichteuholz; König-Festschrift, Leipzig 1923.

Eines der Resultate des bakteriellen Abbaues ist die fast völlige Beseitigung dieses Pentosan-Anteils; jedoch kann dies keineswegs die Hauptreaktion gewesen sein, da die analytischen Daten damit nicht übereinstimmen.

#### Beschreibung der Versuche.

**Darstellung des Ausgangsmaterials:** 250 g Sägemehl von Kiefernholz wurden in einem Blechgefäß mit 1 l 5-proz. Natronlauge übergossen und nach dem Vermischen im Autoklaven bei einem Überdruck von  $2\frac{1}{2}$  Atm. 6 Std. erhitzt. Hierauf wurde koliert und der auf dem Tuche verbleibende Rückstand mit der hydraulischen Presse bis zu 10 Atm. ausgepreßt. Die vereinigten Flüssigkeiten gossen wir sodann, mit Wasser stark verdünnt, bis zur völligen Klärung durch ein Faltenfilter und säuerten schließlich mit Salzsäure an. Den ausfallenden Niederschlag brachten wir nach dem Absitzen auf einem mäßig warmen Wasserbade auf eine Nutsche und wuschen zunächst mit kaltem Wasser so lange, bis das Filtrat nur mehr eine sehr schwache Chlorreaktion zeigte; sodann wurde die Substanz in einen geräumigen Erlenmeyer-Kolben gebracht und mehrmals mit kochend heißem Wasser behandelt. Dadurch wird die ursprünglich gelatinöse Masse in ein dichtes, zerreibliches Pulver verwandelt. Jedoch verstopt auch dieses Pulver leicht die Poren des Filters, weshalb es durch Dekantieren gewaschen und schließlich mit möglichst wenig Wasser auf die Nutsche gebracht wird. Nach dem Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum-Exsiccator resultieren 60 g eines hellgelben, amorphen Pulvers, welches in Wasser und in Alkohol so gut wie unlöslich ist, sich dagegen spielend leicht in Ammoniak löst, eine Eigenschaft, die sich für unsere Zwecke als besonders günstig erwies.

Die so gewonnene Ligninsäure enthält mehrere Prozent Pentosan, wie aus der zusammenfassenden Schlußtabelle, die auch die anderen charakteristischen Daten enthält, hervorgeht.

**Bakterieller Abbau der Kiefern-Ligninsäure:** 10 g Substanz wurden in einer Porzellanschale mit Wasser übergossen, etwas Ammoniak hinzugefügt, umgerührt und sodann auf dem Wasserbade bei gelinder Wärme bis zum Verschwinden des Ammoniak-Geruches digeriert. Zur Lösung des Ammoniumsalzes fügten wir in einer 5-l-Stöpselflasche ein Nährsalzgemisch aus 20 g Ammoniumsulfat, 5 g Kaliumphosphat, 2,5 g Magnesiumsulfat und ein paar Gramm Kreide. Diese Mischung, mit etwas Erde aus dem Berliner Tiergarten beimpft, wurde mit Leitungswasser völlig aufgefüllt und mit dem Stöpsel verschlossen im Brutraum bei 37° stehen gelassen. Nach einigen Tagen war in der Flasche eine schwache Gasentwicklung zu bemerken, die übrigens beim ersten Überimpfen schwächer wurde und beim zweiten anscheinend ganz ausblieb. Nach 8 Tagen impften wir auf einen in genau der gleichen Weise hergestellten Ansatz über und wiederholten den Prozeß nach abermals 8 Tagen. Den dritten Ansatz arbeiteten wir nach 8-tägigem Stehen auf.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst durch ein mit Kieselgur gedichtetes Filter abgesaugt, sodann das vollkommen klare Filtrat in einer geräumigen Schale mit Salzsäure angesäuert und einige Zeit auf dem Wasserbade digeriert. Den abgesaugten Niederschlag wuschen wir auf dem Filter so lange, bis das Waschwasser chlorfrei und vollkommen farblos abfloß. Das Auswaschen ging glatt und schnell vorstatten. Der im Vakuum-Exsiccator getrocknete Niederschlag wog 6 g. Das trockne gelbe Pulver wurde nun 5-mal mit je 50 ccm Alkohol ausgekocht, die vereinigten alkohol. Lösungen nochmals aufgekocht, filtriert und das Filtrat zur Trockne verdampft. Die in Alkohol lösliche Substanz stellte nach dem Trocknen bei 13 mm und 100° über Phosphorpentoxid ein schokoladenbraunes, amorphes Pulver dar; ihre Menge betrug 2,5 g. Der in Alkohol unlösliche Anteil war viel heller; er wog ebenso ge-

trocknet 3.5 g. Das saure Filtrat, auf 250 ccm eingedampft, gab an Äther 0.5 g einer rotbraunen harzigen Substanz ab, über welche bisher nichts Näheres ermittelt worden ist.

Der ganze Versuch wurde nunmehr von Anfang bis zu Ende wiederholt: während jedoch die zur bakteriellen Zersetzung hingestellte Lösung im obigen Beispiel 2% organische Substanz enthielt, wurde die Wiederholung des Versuches mit einer nur 1-prom. Lösung vorgenommen. Bei dieser Versuchsanordnung wird erheblich mehr organische Substanz zerstört: 10 g Ligninsäure lieferten nur 4 g eines Pulvers, das zu annähernd gleichen Teilen aus in Alkohol löslicher und unlöslicher Substanz bestand. Auch die analytischen Daten der Präparate deuten auf einen weiteren Fortschritt des Abbaues hin; im großen und ganzen ergab sich jedoch dasselbe Bild.

Kontrolle der Resultate durch einen Blindversuch: 5 g Ligninsäure wurden in 1-prom. Lösung gebracht, welche in genau der gleichen Weise hergestellt war wie in den obigen Beispielen des bakteriellen Abbaues. Wir ließen dann durch etwas Toluol gegen Infektion geschützt 8 Tage im Brutraum bei 37° stehen und arbeiteten in genau der gleichen Weise auf. Wir gewannen 4.5 g zurück, deren Analysenwerte von denen des ursprünglichen Materials nicht verschieden waren.

Der Kürze wegen fassen wir die analytischen Daten in folgender Tabelle zusammen:

	Pentosan %	% C	% H	% O. CH <sub>3</sub>
I. Ausgangs-Ligninsäure . . . . .	5.85	62.02	6.34	15.50
II. Gesamt-Gärungs-Ligninsäure . . . .	0.5	—	—	12.5
III. Gärungs-Ligninsäure, alkohol-löslich {	—	65.29 66.25	6.16 6.30	10.72 11.12
IV. Gärungs-Ligninsäure, alkohol-unlöslich .	—	62.34	5.88	13.30
V. Ligninsäure vom Blindversuch . . .	—	62.34	5.97	15.36

I. 0.1002 g Sbst.: 5.0 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub> (Kirpal). — 0.1603 g Sbst.: 0.3611 g CO<sub>2</sub>, 0.0908 g H<sub>2</sub>O, 0.0026 g Asche. — 3.909 g Sbst.: 0.2326 g Phloroglucid.

II. 1.010 g Sbst.: 0.005 g Phloroglucid. — 0.2318 g Sbst.: 9.0 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub> (Kirpal).

III. 0.1610 g Sbst.: 0.3853 g CO<sub>2</sub>, 0.0886 g H<sub>2</sub>O. — 0.1575 g Sbst.: 0.3825 g CO<sub>2</sub>, 0.0888 g H<sub>2</sub>O. — 0.1678 g Sbst.: 5.8 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub> (Kirpal). — 0.1727 g Sbst.: 6.2 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub>.

IV. 0.1574 g Sbst.: 6.8 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub> (Kirpal). — 0.1460 g Sbst.: 0.3303 g CO<sub>2</sub>, 0.0768 g H<sub>2</sub>O.

V. 0.1561 g Sbst.: 0.3567 g CO<sub>2</sub>, 0.0854 g H<sub>2</sub>O. — 0.1686 g Sbst.: 8.4 ccm  $\eta_{10}$ -AgNO<sub>3</sub> (Kirpal).