

11. Theodor Ploetz: Vergleichender enzymatischer Abbau einiger isolierter Holzbestandteile mit Schneckenferment. IV. Mittell. über den enzymatischen Abbau polymerer Kohlenhydrate*).

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

(Eingegangen am 2. Dezember 1939.)

In der III. Mitteilung wurde am Beispiel des Lindenholzes betont, daß natives Holz, im Gegensatz zu der aus Äthylendiaminkupferoxyd-Lösung erhältlichen Fraktion, enzymatisch sehr schwer angreifbar ist.

Da nun seit den eingehenden Arbeiten P. Karrers¹⁾ über das Schneckenferment bekannt ist, daß native Cellulose dem enzymatischen Angriff viel größeren Widerstand entgegensetzt, als eine Cellulose, die irgendwelche Umfällungsprozesse durchgemacht hat — eine Tatsache, die von W. Graßmann²⁾ auch für die Luizymcellulase bestätigt wurde —, erhebt sich die Frage, ob etwa diese Resistenz der nativen Cellulose Ursache der schweren Angreifbarkeit der Hölzer ist.

Zur Prüfung dieser Frage wurde von verschiedenen Hölzern nach dem Chloraufschluß-Verfahren Cellulose isoliert, und deren Verhalten beim enzymatischen Abbau geprüft.

Die beim Chlordioxyd-Aufschluß nach E. Schmidt anfallenden Skelettsubstanzen enthalten fast den gesamten Kohlenhydratkomplex des Holzes, da sie unter nahezu ausschließlicher Abtrennung des Lignins entstehen. Ihr Verhalten beim enzymatischen Abbau mußte in diesem Zusammenhang besonders aufschlußreich erscheinen. Der Freundlichkeit von Hrn Prof. E. Schmidt verdanke ich die Proben von Fichten- und Buchenholzskelettsubstanzen, die für vorliegende Versuche verwendet wurden.

Bei den mit verschiedenen gereinigten Helixfermenten durchgeführten Abbauversuchen wurde der durch Bestimmung des entstandenen reduzierenden Zuckers ermittelte Abbaugrad der Zellstoffe bzw. Skelettsubstanzen, verglichen mit dem vom gleichen Ferment bewirkten Abbau von Cuprophan (also umgefällter Cellulose), da der Abbau der Hölzer selbst für den Vergleich zu langsam verläuft.

Die Versuche ergaben, daß die nach dem Chloraufschluß-Verfahren hergestellten Zellstoffe, je nach der Aktivität des verwendeten Enzymmaterials mit Geschwindigkeiten abgebaut werden, die der des Cuprophanabbaus nur wenig nachstehen, ja ihr sogar gleichkommen können.

Buchenholzskelettsubstanz wird etwa halb so rasch abgebaut, wie die gleiche Gewichtsmenge Cuprophan. Fichtenholzskelettsubstanz ist noch leichter angreifbar, als Buchenholzskelettsubstanz.

Interessant ist, daß ein cellulasefreies Enzympräparat, das aber eine gut wirksame Lichenase enthält (geprüft an Lichenin), Buchenholzskelettsubstanz trotz ihres Gehaltes an Hemicellulosen nicht angreift.

Daß der enzymatische Abbau des komplexen Polysaccharidgemisches, das die Buchenholzskelettsubstanz darstellt, auswählend vor sich geht, geht daraus hervor, daß der Kohlenstoffgehalt des ungelösten Rückstandes im Verlauf des Abbaus ansteigt.

*) III. Mittell.: B. 72, 1885 [1939].

¹⁾ Helv. chim. Acta 8, 797 [1925].

²⁾ A. 502, 20 [1933].

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die erhöhte Resistenz nativer Cellulose bzw. des gesamten nativen Kohlenhydratkomplexes, der neben dem Lignin die Holzsubstanz ausmacht, zur Erklärung der schweren Angreifbarkeit des Holzes durch Helixferment nicht ausreicht. Wenn das Verhalten, das diese Substanzen im isolierten Zustand zeigen, geschwindigkeitsbestimmend wäre, müßte der Holzabbau wesentlich rascher erfolgen.

Es bleiben demnach nur noch zwei Erklärungsmöglichkeiten für das Verhalten des Holzes: Entweder ist die Cellulose bzw. der größere Teil der Kohlenhydrate durch das Lignin rein mechanisch so abgedeckt, daß dem Enzym der Zutritt verwehrt ist, oder die in Frage stehenden Polysaccharide sind mit dem Ligninanteil chemisch verknüpft, und das Enzym ist außer Stande, diese anders gearteten Bindungen zu lösen.

Beschreibung der Versuche.

Die für die Abbauversuche verwendeten Zellstoffe wurden nach dem Prinzip des Cross-Bevan-Verfahrens dargestellt, wobei in Anlehnung an neuere Verbesserungsvorschläge³⁾ die Chlor-Einwirkungsdauer verkürzt wurde. Die Chlorierungen wurden so lange wiederholt, bis ein praktisch farbloser Zellstoff resultierte. Die abschließende Permanganatbehandlung führte dann zum weißen Rohprodukt, in dem durch Pentosenbestimmung der Gehalt an Reincellulose berechnet wurde, und das als solches für die Abbauversuche angesetzt wurde.

Fein gemahlenes, mit Benzol-Alkohol extrahiertes Fichtenstammholz ergab nach dieser Methode bei 6 Chloreinwirkungen von insgesamt 40 Min. Dauer eine Ausbeute an Rohcellulose von 55.9%. Diese enthielt noch 11.9% Pentosen, woraus sich 49.7% Reincellulose für das Holz berechnen.

Analog vorbehandeltes Stammholz von *Araucaria excelsa* ergab bei 4 Chloreinwirkungen von insgesamt 20 Min. Dauer 47.1% Rohcellulose mit 14.75% Pentosan, also 40.1% Reincellulose.

Beide Hölzer hatten sich, ebenso wie viele andere, sehr resistent gegen Helixferment erwiesen. Die Rohzellstoffe, die auf Grund ihres hohen Pentosangehaltes wohl noch als sehr geschont angesprochen werden dürfen, wurden in fein gemahlenem Zustand der Enzymeinwirkung ausgesetzt.

Von einem Schneckenferment, das nur durch 3-tägige Dialyse gereinigt war (wobei sich das Volumen verachtachte), wurden je 1 ccm + 4 ccm Acetat-Puffer vom pH 4.7 + 5 ccm Wasser auf je 100 mg Cuprophan, Fichten- und *Araucaria*-Zellstoff sowie 2 Ansätze mit 100 mg und einen Ansatz mit 200 mg Buchenholzskelettsubstanz einwirken gelassen. Die Enzymlösung enthielt stark wirksame Lichenase und Cellobiase.

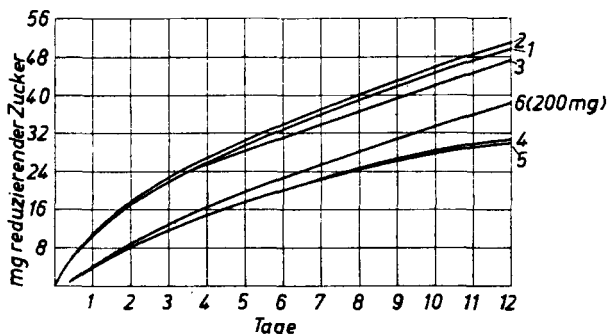
Der Verlauf des Abbaus dieser Substrate geht aus den Kurven der Abbild. hervor.

Die in diesen Kurven eingetragenen Werte geben die Zahlen wieder, die durch direkte Zuckerbestimmung der Abbaulösungen ermittelt wurden. Nach Beendigung des Versuches wurden die einzelnen Lösungen noch der Nachhydrolyse mit verd. Schwefelsäure unterworfen. Mit Ausnahme der Cuprophanabbaulösung ergaben sich dabei noch durchweg beträchtliche Steigerungen des Reduktionsvermögens.

³⁾ Journ. Indian. and Engin. Chem., Anal. Edit. 1, 40 [1929].

Da sich die Zellstoffe und die Skelettsubstanz vom Cuprophan vor allem durch ihren Gehalt an Pentosen unterscheiden, lag es nahe, diese Zunahme des Reduktionsvermögens auf Pentosane zurückzuführen, um so mehr, als Lichenase und Cellobiase in reichlicher Menge zugegen sind. Diese Auffassung, die inzwischen noch durch anderweitige Ergebnisse erhärtet werden konnte, führt somit zu der Vorstellung, daß der in

Abbild.



Abbau isolierter Holzbestandteile mit Schneckenferment

- | | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| 1 Cuprophane, | 2 Fichtenzellstoff, |
| 3 Araucariazellstoff, | 4, 5 u. 6 Buchenholzskelettsubstanz. |

vorstehendem Versuch festgestellte gleichlaufende Abbau von Cuprophane und den Zellstoffen sowie der dem nur wenig nachstehende Abbau der Skelettsubstanz in erster Linie den Aufbruch der Hexosane mißt. Die im Gemisch vorhandenen oder beim Abbau freigelegten Pentosane werden dagegen nur unvollständig und mit geringerer Geschwindigkeit gespalten.

Im Hinblick auf die untergeordnete physiologische Bedeutung der Pentosen ist es nicht unwahrscheinlich, daß der Organismus darauf verzichtet, die mit der Nahrung aufgenommenen Pentosane völlig in resorbierbare Form überzuführen.

Wenn im Sinne Weidenhagens auf die Annahme einer eigenen Xylanase verzichtet wird, scheinen sich also die β -Glucosidsplattendenden Fermente des Schneckenasaftes ähnlich zu verhalten, wie dies kürzlich von Helferich⁴⁾ für das Süßmandel-Emulsin festgestellt wurde.

Die Tatsache, daß M. Ehrenstein⁵⁾ Xylan aus Weizenstroh und W. Voss⁶⁾ bestimmte Xylanfraktionen aus verschiedenen Materialien fermentativ, selbst bei langandauernder Enzym-Einwirkung nur unvollständig spalten konnten, weist aber auf noch andere Erklärungsmöglichkeiten, wie Bindungsanomalien, hin.

Die Richtigkeit der ermittelten Werte wurde bei allen Ansätzen durch Rückwiegen des getrockneten Abbaurückstandes geprüft. Es ergab sich fast theoretische Übereinstimmung.

Ein weiterer Vergleich der Abbaugeschwindigkeit von Cuprophane- und Araucaria-Zellstoff wurde mit einem Fermentpräparat angestellt, das über 6 Reinigungsstufen weitgehend von Begleitsubstanz befreit, aber zugleich

⁴⁾ B. 72, 1953 [1939].

⁵⁾ Helv. chim. Acta 9, 332 [1926].

⁶⁾ A. 534, 161 [1938].

auch stark geschwächt war. Den Abbau von je 100 mg Substrat zeigen folgende Zahlen:

Einwirkungsdauer in Tagen	entstandener Zucker (mg)	
	Cuprophane	Roh-Cellulose
4	45.1	30.7
5	52.7	—
6	60.2	43.5

Der Abbau des Araucaria-Zellstoffes bleibt hier zwar hinter dem des Cuprophane zurück, ist aber immer noch von derselben Größenordnung, im Gegensatz zum Holzabbau, der nach einer geringen Hydrolyse von wenigen Prozenten ins Stocken gerät.

Im Hinblick auf den Hemicellulosegehalt der Skelettsubstanz wurde seine Angreifbarkeit durch Lichenase geprüft. Ein Enzympräparat, das Cuprophane in 3 Tagen nur zu 6.6% in Lösung bringt, und Lichenin im gleichen Zeitraum völlig hydrolysiert, führt bei Buchenholzskelettsubstanz nur zu einem Abbau von 0.9%.

Im weiteren wurde ein Vergleich der enzymatischen Angreifbarkeit von Fichten- und Buchenholzskelettsubstanz angestellt. Die dabei verwendeten Präparate hatten folgende Zusammensetzung (berechnet auf trockne und aschefreie Substanz):

Fichtenholzskelettsubstanz ...	C 45.25 %	H 6.36 %	OCH ₃ 0.90 %
	14.65 %	Pentosen	
Rotbuchenholzskelettsubstanz .	C 45.09 %	H 6.08 %	OCH ₃ 1.50 %
	33.3 %	Pentosen	

In zwei parallelen Ansätzen wurden 0.874 g Fichten- und 0.918 g Buchenholzskelettsubstanz mit je 90 ccm Enzym-Puffergemisch angesetzt. Der Verlauf des Abbaus ist in folgender Tafel zusammengestellt:

Zeit in Tagen	Abbau in Prozenten	
	Fichte	Buche
8	33.3	17.2
13	95.3	59.0
25	—	78.9

Der Abbau der Fichtenholzskelettsubstanz verläuft demnach etwa doppelt so rasch, als der von Buchenholzskelettsubstanz, und dürfte somit dem der oben geprüften Rohcellulosen gleichkommen.

Bei der Buchenholzskelettsubstanz wurde auch die Zusammensetzung des ungelösten Rückstands während des Abbaus verfolgt. Dabei ergab sich, daß der Kohlenstoffgehalt des letzteren kontinuierlich ansteigt:

Ausgangsmaterial	C 45.09 %	H 6.08 %	OCH ₃ 1.50 %
Bei 59 % Abbau	„ 46.38 %	„ 6.64 %	„ 1.03 %
Bei 78.9 % Abbau	„ 47.90 %	„ 6.67 %	„ 1.27 %

Der Rückstand des 78.9-proz. Abbaus geht unter den Bedingungen der Klason-Lignin-Bestimmung völlig in Lösung.