

**12. Theodor Ploetz: Enzymatischer Abbau einiger nativer ligninhaltiger Materialien. V. Mitteil. über den enzymatischen Abbau polymerer Kohlenhydrate\*).**

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

(Eingegangen am 18. Dezember 1939.)

Wie eine umfangreiche Literatur beweist, hat es nicht an Versuchen gefehlt, den chemischen Bau der verholzten Zelle mit den Mitteln des scho- nenden enzymat. Angriffes zu ergründen. Die überraschende Resistenz des nativen Materials gegen isolierte Enzyme zwang aber zu Umwegen, deren Ergebnisse auf das Gesamtproblem nur mit Einschränkungen übertragen werden können.

Der eine Weg, den enzymatischen Abbau von Holzbestandteilen wie Cellulose, Xylan usw., die auf chemischem Wege aus dem Holz isoliert würden, zu studieren, zwingt, wenn man die Resultate auf das Holz anwenden will, zu der immer noch unbewiesenen Voraussetzung, daß diese Stoffe bei ihrer Isolierung keine Änderung ihres chemischen und physikalischen Zustandes erleiden.

Die Verfolgung des Holzabbaues durch lebende Organismen erlaubt andererseits nur eine Erfassung des verbleibenden Rückstandes, während der abgelöste Anteil nur mehr in Form von tiefgreifend veränderten Stoff- wechselprodukten faßbar ist.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, in denen es meines Wissens erstmalig gelungen ist, natives ligninhaltiges Material einem tiefgreifenden Abbau mit isolierten Enzymen zu unterwerfen.

Wie schon in früheren Mitteilungen bemerkt wurde, zeigten sich ver- schiedene Stammholzproben, auch bei feinster Vermahlung, sehr wider- standsfähig gegen den Angriff von Schneckenferment. Es besteht zwar nirgends eine absolute Resistenz, aber der Abbau kommt doch endgültig zum Stehen, wenn wenige Prozente des Holzes in Lösung gegangen sind. Erst wenn ein chemischer Angriff vorausgegangen ist<sup>1)</sup>, ändern sich diese Verhältnisse entscheidend.

#### Substrate.

Es lag nun der Gedanke nahe, an Stelle des abgestorbenen Stammholzes ein zwar verholztes, d. h. ligninhaltiges, aber doch noch lebendes Gewebe dem Enzymangriff auszusetzen. Ich wählte als Ausgangsmaterial Holundermark und das Mark des australischen Baumes Araucaria excelsa. Das Holundermark wurde getrennt in Material, das aus den noch grünen diesjährigen Trieben stammte, und in solches aus älteren Teilen der Pflanze. Der Alters- unterschied äußert sich deutlich im Ligningehalt (unter Lignin wird hier und im folgenden immer der Rückstand verstanden, der beim Aufschluß der Materialien mit Schwefelsäure und nach Nachbehandlung mit verd. Salzsäure nach der von Klarson gegebenen Vorschrift<sup>2)</sup> hinterbleibt). In der folgenden Tafel sind die ermittelten Daten von 4 Holundermarkpräparaten zusammengestellt (nach Alter geordnet).

\* IV. Mitteil. voranstehend; zugleich XXXI. Mitteil. über Lignin v. K. Freudenberg u. Mitarbeitern.

<sup>1)</sup> III. Mitteil. B. 72, 1885 [1939].

<sup>2)</sup> Cellulosechem. 12, 36 [1931].

Tafel 1.  
(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Holunder- mark (Präparat Nr.)	Asche % trocken	Pen- tosen %	Lignin %	Rein- cellu- lose % <sup>3)</sup>	Analytische Zusammensetzung des Lignins					
					C	H	OCH <sub>3</sub>	C	H	OCH <sub>3</sub>
Jung (II) ...	1.8	27.45	14.07	—	48.21	6.71	4.82	65.18	6.28	18.80
Alt (I) ....	0.8	33.9	17.4	—	48.66	6.43	5.21	67.24	6.46	17.78
Alt (III) ....	1.15	27.0	18.5	35.61	49.14	6.3	5.03	66.17	6.04	19.66
Alt (IV) ....	2.97	22.6	25.6	35.38	48.88	6.15	5.48	65.49	5.74	17.20

Von den Sorten I und II wurden keine Cellulosebestimmungen ausgeführt. In der Zusammensetzung unterscheidet sich demnach das Holundermark nicht prinzipiell von irgend welchen Stammhölzern.

Vergleicht man den OCH<sub>3</sub>-Gehalt der Präparate mit dem der aus ihnen erhältlichen Lignine, so ergibt sich, daß nur ein Teil des OCH<sub>3</sub> im Lignin gebunden ist. Naturgemäß nimmt dieser Anteil mit zunehmender Verholzung, d. h. Ligninbildung, zu. Er beträgt für die oben aufgeführten Substanzen:

Tafel 2.

	Holundermark-Präparat Nr.			
	II	I	III	IV
Im Lignin gebundener Anteil des Gesamt-OCH <sub>3</sub> ....	54.9 %	59.4 %	72.3 %	80.3 %

Da im Vergleich zu diesen Unterschieden der OCH<sub>3</sub>-Gehalt der Präparate selbst nur geringfügig schwankt, führt das zu dem Schluß, daß die mit zunehmendem Alter eintretende Ligninanreicherung von keiner Neubildung von OCH<sub>3</sub> begleitet wird, sondern daß schon das junge Gewebe genügend OCH<sub>3</sub> enthält, um den Bedarf des später gebildeten Lignins zu decken. Chemische Umwandlung, oder aber nur Kondensation und Polymerisation von Inhaltsstoffen der jugendlichen Pflanze werden also als Ligninbildung in Erscheinung treten.

E. Beckmann, O. Liesche und Fr. Lehmann<sup>4)</sup> sowie M. Philips und M. G. Goss<sup>5)</sup> haben an Getreidesorten festgestellt, daß in den jüngsten Wachstumsstufen die Ligninanreicherung begleitet ist von einem steigenden OCH<sub>3</sub>-Gehalt des gefundenen Lignins. Dieser Befund steht nicht unbedingt im Gegensatz zu der eben geäußerten Ansicht, denn 1) hat auch das als „jung“ bezeichnete Holundermark jene ersten Entwicklungsstadien, die von den genannten Verfassern geschildert werden, schon hinter sich, 2) ist es durchaus möglich, daß das Lignin sich aus sehr verschiedenen hoch methylierten Bausteinen zusammensetzt<sup>6)</sup>, und daß die Pflanze in den ersten Entwicklungsstadien nur über niedermethylierte Bausteine verfügt.

<sup>3)</sup> Vergl. IV. Mitteil.

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. 139, 502 [1923].

<sup>5)</sup> Journ. agric. Res. 51, 301 [1935].

<sup>6)</sup> Eigene Versuche, noch nicht veröffentlicht.

Das mikroskopische Bild der Phloroglucin-HCl-Reaktion von Holundermarkschnitten ergibt eine gleichmäßige Färbung, d. h. Ligninverteilung über das Gewebe. Anders verhält sich dagegen das Araucaria-Mark. Bei ihm zeigt die Phloroglucin-HCl-Reaktion, daß das Gewebe praktisch ligninfrei ist, jedoch durchsetzt von stark angefärbten Einzelzellen, sogen. „Steinzellen“. Das Araucaria-Mark scheint mit diesem Verhalten eine Sonderstellung einzunehmen.

Neben dem Mark, das den Vorzug einer quantitativ sauberer Abtrennbarkeit aus dem Holzkörper besitzt, erscheint auch die äußerste Stellschicht, das Cambialgewebe und der Bast, geeignet für enzymatische Abbauversuche. Sie wurden von einem Araucaria-Stammstück nach Möglichkeit abgelöst und getrennt untersucht. Folgende Tafel vergleicht die so erhaltenen Gewebsteile:

Tafel 3.  
(Werte in %, bezogen auf trocken und aschefrei.)

Araucaria	Pen-tosen	Lignin	Rein-cellulose	Analytische Zusammensetzung des Lignins					
				C	H	OCH <sub>3</sub>	C	H	OCH <sub>3</sub>
Mark .....	14.4	16.03	nicht geprüft	47.88	6.29	3.50	62.57	5.15	6.55
Bast (Benzol-Alkohol extrahiert) .....	24.0	17.25	37.8	52.73	6.32	3.97	—	—	—
Stammholz (Benzol-Alkohol extrahiert) ...	12.3	28.55	40.1	—	—	—	68.32	5.62	15.32

#### Der enzymatische Abbau.

Die enzymatischen Abbauversuche führten zu dem erwarteten Ergebnis, daß, im Gegensatz zum resistenten Stammholz, Araucaria-Mark und -Bast leicht angreifbar sind.

Das wichtigste Ergebnis der Versuche ist dabei, daß im Verlauf des Abbaus der Kohlenstoff- und OCH<sub>3</sub>-Gehalt des Rückstandes stark ansteigt. Die an chemisch vorbehandeltem Material erzielten Ergebnisse<sup>1)</sup> konnten nun also an nativem Gewebe bestätigt werden, und es scheint mir damit erwiesen, daß im Holz Substanzen mit höherem C-Gehalt, die Lignine, vorgebildet sind.

Das eigentliche Ziel der Arbeiten, auf enzymatischem Wege ein reines Lignin zu isolieren, konnte nicht erreicht werden. Dieser Mißerfolg beruht jedoch nicht auf Unzulänglichkeiten der Versuchsführung, sondern scheint im Wesen der Holzsubstanz begründet zu sein. Darauf soll später eingegangen werden<sup>2)</sup>. Der Abbau führt auch bei den leichtangreifbaren Materialien zu einem Produkt, das Lignin und Kohlenhydrate gemeinsam enthält.

Je nach der Art des verwendeten Ausgangsmaterials bestehen mehr oder weniger große Differenzen zwischen der Ligninmenge, die auf Grund der Klar-son-Bestimmung im nativen Gewebe gefunden wird und der Menge,

<sup>1)</sup> Siehe VI. Mitteil.

die der Abbaurückstand noch enthält. Ein Teil der Stoffe, die im Rohprodukt als Lignin erfaßt werden, muß also im Verlauf des Abbaus in Lösung gehen. Damit stimmt auch überein, daß die Abbaulösungen  $\text{OCH}_3$  enthalten. Letzteres ist allerdings auch der Fall, wenn, wie im Beispiel des jungen Holundermarks, durch den Abbau kein Ligninschwund eintritt. Die beiden Abbaulösungen unterscheiden sich aber in ihrem Verhalten gegen verdünnte Schwefelsäure. Tritt nämlich beim Abbau ein Ligninschwund ein, so ergeben die Abbaulösungen beim Erhitzen mit 2-proz. Schwefelsäure geringe braune Flockungen, die in verdünnter Natronlauge löslich sind, während die ebenfalls methoxylhaltigen Abbaulösungen von Materialien, die ihren Lignin gehalt beibehalten, keine solchen Flockungen liefern. Ob diese  $\text{OCH}_3$ -haltigen Substanzen, die durch ihre Auflösung eine Abnahme des Gesamt-Lignins des Abbaumaterials hervorrufen, der Kohlenhydratreihe angehören oder ob sie echte Ligninbausteine sind, die nur vielleicht infolge ihres geringen Polymerisationsgrades bei der Freilegung löslich werden, konnte ich noch nicht feststellen. Aus der Tatsache, daß in allen Fällen der aus der Gewichtsabnahme und aus der Zuckerbestimmung ermittelte Abbaugrad innerhalb der Versuchsgenauigkeit übereinstimmen, geht jedenfalls hervor, daß sich die fraglichen Substanzen unter den Bedingungen der Willstätter-Schudel-Bestimmung ähnlich wie Kohlenhydrate verhalten.

### 1. Araucaria-Bast.

Während in verschiedenen Ansätzen von Araucaria-Stammholz nur ein enzymatischer Abbau von etwa 5% erreicht werden konnte, wurde eine Probe Araucaria-Bast ohne Schwierigkeit in 6 Stufen zu 53.64% abgebaut. Folgende Tafel vergleicht die Zusammensetzung des Rückstandes mit der des Ausgangsmaterials:

Tafel 4.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	C	H	$\text{OCH}_3$
Ausgangsmaterial .....	52.73	6.32	3.97
Abbaurückstand .....	55.32	6.67	6.63

Vom Gesamt- $\text{OCH}_3$  des Ausgangsmaterials sind in diesem Stadium 22.2% in Lösung gegangen. Der Pentosenabbau liegt mit 70% höher als der Gesamtabbau, was damit übereinstimmt, daß die Lösung der 1. Abbaustufe besonders reich an Pentosen ist.

### 2. Araucaria-Mark.

Das fein gemahlene Araucaria-Mark wurde in zwei verschieden großen Ansätzen mit verschiedenen Enzymen in verschiedenen Zeiten so lange behandelt, bis keinerlei reduzierender Zucker in den Abbaulösungen mehr entstand. Der Abbau betrug dann in den beiden Ansätzen 77.5 und 78.1%, stimmte also sehr gut überein. Bei einem der beiden Ansätze wurde die Zusammensetzung des Abbaurückstandes an einigen Stufen geprüft:

Tafel 5.  
(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	Abbau in %	C	H	OCH <sub>3</sub>
Ausgangsmaterial .....	0	47.88	6.29	3.50
Rückstand der 1. Stufe .....	54.2	50.10	6.13	2.74
"    2.    " .....	74.6	—	—	3.08
Nicht weiter angreifbar .....	78.1	54.90	6.28	3.20

Der nicht weiter abbaubare Rückstand des 78.1-proz. Abbaus wurde nun einer KIason-Lignin-Bestimmung unterzogen. Folgende Tafel vergleicht das aus dem Abbaurückstand gewonnene Lignin mit dem aus dem Ausgangsmaterial.

Tafel 6.  
(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	C	H	OCH <sub>3</sub>
	in %		
Lignin aus Ausgangsmaterial .....	62.57	5.15	6.55
Lignin aus Abbaurückstand .....	61.06	5.33	4.45

Die beiden Lignine unterscheiden sich also nur in ihrem OCH<sub>3</sub>-Gehalt. Der niedere OCH<sub>3</sub>-Wert erinnert an die Zusammensetzung der aus ganz jungen Pflanzenteilen isolierten Lignine. Auf Grund der von K. Freudenberg entwickelten Vorstellung trüge in einem solchen Körper etwa jeder vierte Benzolring ein OCH<sub>3</sub>. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Bausteine dieses Lignins liegt dann bei 168.

Die verwendete Schwefelsäure wurde nach Beendigung des Aufschlusses verdünnt und der in ihr enthaltene reduzierende Zucker und die Pentosen bestimmt. Rechnet man die erhaltenen Werte auf Mole um, so ergibt sich für den nicht mehr abbaubaren Rückstand von Araucaria-Mark folgende Zusammensetzung:

0.213 Mol Hexosan + 0.066 Mol Pentosan

0.279 Mol Polysaccharide + 0.277 Mol Lignin.

Vergleicht man die im Araucaria-Mark festgestellte Ligninmenge mit dem im Abbaurückstand noch enthaltenen Lignin, so zeigt sich, daß in letzterem nur noch 71.5% des Ausgangslignins enthalten sind. Etwa  $\frac{1}{4}$  des Lignins bzw. der ligninbildenden Substanzen sind demnach in Lösung gegangen. Damit findet auch die Veränderung der Zusammensetzung des Lignins eine hinreichende Erklärung. Wie oben ausgeführt, liefern auch die enzymatischen Abbaulösungen mit verdünnter Schwefelsäure ligninartige Stoffe.

Wesentlich größer als der Ligninschwund ist der in Lösung gegangene Anteil des Gesamt-OCH<sub>3</sub>. Er beträgt 80%. Außer Lignin und Ligninbildenden Substanzen muß also das Araucaria-Mark noch reichlich OCH<sub>3</sub>-haltige Kohlenhydrate enthalten, wofür auch der Abfall des OCH<sub>3</sub>-Gehalts nach der ersten Abbaustufe spricht (Tafel 5). Daß dieses OCH<sub>3</sub> nicht etwa durch enzymatische Abspaltung verschwindet, geht daraus hervor, daß eingedampfte Proben der Abbaulösungen entsprechenden OCH<sub>3</sub>-Gehalt aufweisen. Auch im Abbaurückstand müssen noch solche Stoffe enthalten sein, denn auch hier beansprucht das Lignin nur 72.7% des vorhandenen OCH<sub>3</sub>.

## 3. Holunder-Mark.

Die oben beschriebenen Holundermark-Präparate (Tafel 1) ergaben bezüglich ihrer enzymatischen Angriffbarkeit kein einheitliches Bild. Der Abbau der Präparate I, II und III wurde z. B. mit einem nicht sehr aktiven Enzym-Präparat eingeleitet. Erwartungsgemäß wurde dabei das junge Material II viel stärker angegriffen, als die beiden älteren Proben. Letztere könnten aber auch in späteren Stufen, unter der Einwirkung starker Enzyme, nicht weiter als bis zu knapp 30% abgebaut werden. In einem anderen Ansatz wurde dann das alte Holundermark III gleich von Anfang an einem starken Enzym ausgesetzt und zeigte sich nun genau so weit abbaubar wie das junge Mark II. Für dieses Verhalten läßt sich bis jetzt noch keine beweisbare Erklärung abgeben.

Wurde der Angriff mit schwachem Enzym begonnen, so ließ sich Mark I maximal zu 29.5% abbauen. Dazu wurden 4 Abbaustufen von insgesamt 30 Tagen Dauer benötigt. Tafel 7 vergleicht den Rückstand mit dem Ausgangsmaterial:

Tafel 7.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Holundermark I	C	H in %	OCH <sub>3</sub>
Ausgangsmaterial . . . . .	48.66	6.43	5.21
Abbaurückstand . . . . .	51.21	6.29	5.92

Wie beim Araucaria-Mark gehen dabei die Pentosen bevorzugt in Lösung. Die Abnahme des Pentosengehalts des Rückstandes beträgt 45.6%. Die hier untersuchten lebenden Gewebe zeigen durchweg einen zunächst bevorzugten Pentosenabbau, verhalten sich also anders als das tote Lindenstammholz, bei dem eine solche Bevorzugung nicht festgestellt werden konnte. Der in Lösung gegangene OCH<sub>3</sub>-Anteil liegt mit 20% niedriger, als der Gesamtabbau. Die abgebaute lösliche Substanz enthält also weniger OCH<sub>3</sub> als das Ausgangsmaterial.

Da im Ausgangsmaterial ein Ligningehalt von 17.4% ermittelt wurde, der erreichte Abbau 29.5% betrug, also noch 70.5% der Einwaage verblieben, so war zu erwarten, daß, wenn kein Lignin in Lösung gegangen war, der Rückstand, der ja gerade das vierfache des Ligningewichtes beträgt, zu einem Viertel aus Lignin bestehen müsse.

Bei der Ligninbestimmung wurden im Abbaurückstand 26.3% Lignin gefunden, also die dem Ausgangsmaterial entsprechende Menge. Überraschenderweise zeigt aber dieses Lignin eine andere Zusammensetzung als das Lignin des Ausgangsmaterials:

Tafel 8.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Lignin aus	C	H in %	OCH <sub>3</sub>
Ausgangsmaterial . . . . .	67.24	6.46	17.78
Abbaurückstand . . . . .	63.34	5.91	15.71

Dieser Befund, der besonders bezüglich des Abfalls des  $\text{OCH}_3$ -Gehaltes in den folgenden Abbauversuchen immer wieder bestätigt wird, harrt noch einer befriedigenden Erklärung.

Die für den Ligninaufschluß verwendete Schwefelsäure wurde verdünnt und ihr Gehalt an reduzierendem Zucker ermittelt. Umgerechnet auf Polysaccharide ergibt sich folgende Zusammensetzung (in Millimol):

$$\begin{array}{r} 0.351 \text{ Hexosan} + 0.139 \text{ Pentosan} \\ \hline 0.490 \text{ Polysaccharide} + 0.147 \text{ Lignin.} \end{array}$$

Das im Abbaurückstand enthaltene  $\text{OCH}_3$  verteilt sich zu knapp 70% auf das Lignin und zu 30% auf den Zuckeranteil.

Das alte Holundermark III wurde zunächst einem Abbauversuch, parallel mit Mark I, mit gleichen Enzympräparaten und -Mengen unterworfen. Der Abbau dieses Materials war nach 4 Stufen von zusammen 34 Tagen Dauer beendet, d. h. es konnte dann keine Bildung von reduzierendem Zucker mehr beobachtet werden. In diesem Stadium waren 26.8% der Substanz in Lösung gegangen. Infolge dieser geringen Gewichtsabnahme unterscheiden sich hier Ausgangsmaterial und Abbaurückstand nur wenig.

Tafel 9.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Holundermark III	C	H	$\text{OCH}_3$
	in %		
Ausgangsmaterial .....	49.14	6.30	5.03
Abbaurückstand .....	50.4	6.36	5.30

Auch im Aussehen erfährt das Material durch den Abbau keine Veränderung. Der durch den enzymatischen Angriff in Lösung gegangene Kohlenhydratanteil bestand fast zur Hälfte aus Pentosen.

Analog den bei Holundermark I angestellten Überlegungen war, wenn kein Lignin in Lösung gegangen war, zu erwarten, daß der Rückstand zu einem Viertel aus Lignin bestehen müsse. Dafür sprach auch von vornherein die Tatsache, daß der Abbau zum Stillstand kam, als der Rückstand genau das 4-fache Gewicht der im Ausgangsmaterial gefundenen Ligninmenge (18.5%, vergl. Tafel 1) erreicht hatte. Tatsächlich ergab die Ligninbestimmung eine Ausbeute von 24.8%. Auffallend ist dabei wieder der starke  $\text{OCH}_3$ -Abfall gegenüber dem Lignin aus dem Ausgangsmaterial:

Tafel 10.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Lignin aus	C	H	$\text{OCH}_3$
	in %		
Ausgangsmaterial .....	66.17	6.04	19.66
Abbaurückstand .....	64.67	5.84	14.77

In der für die Lignin-Bestimmung verwendeten Aufschlußsäure wurde nach dem Verdünnen der Zuckergehalt ermittelt. Umgerechnet auf Polysaccharide wurden 92% des theoretischen Wertes gefunden. Da das Lignin

noch einer Nachbehandlung mit heißer verdünnter Salzsäure unterworfen wurde und dabei u. U. noch entstehende Zucker nicht erfaßt wurden, ist dieser Fehlbetrag erklärlich.

Der Pentosangehalt des Abbaurückstandes betrug 18.4%. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Molekulargewichte ergibt sich daraus ein Molverhältnis Pentose : Lignin = 1 : 1.

Für die Zusammensetzung des Abbaurückstandes wurde folgendes Molverhältnis ermittelt:

$$\frac{0.304 \text{ Mol Hexosan} + 0.135 \text{ Mol Pentosan}}{0.439 \text{ Mol Polysaccharide} + 0.135 \text{ Mol Lignin.}}$$

Nur 69% des im Abbaurückstand enthaltenen  $\text{OCH}_3$  werden durch seinen Ligningehalt gedeckt. Der Rest muß, ebenso wie die beim Abbau in Lösung gegangenen 23% des Gesamt- $\text{OCH}_3$ , anderweitig gebunden sein.

In einem späteren, etwas größeren Ansatz, wurde Mark III von Anfang an einem kräftigen Enzym ausgesetzt. Die im vorhergehenden Ansatz festgestellte Abbauschranke wurde hier rasch durchbrochen und schließlich nach 7 Enzymeinwirkungen von insgesamt 52 Tagen Dauer ein Abbau von 63% erreicht. In den letzten Stadien konnte dabei nur durch neues Mahlen des Abbaurückstandes jeweils ein geringer weiterer Abbau erzielt werden.

Die erste, 7-tägige Enzymeinwirkung brachte bereits  $\frac{1}{3}$  der Substanz in Lösung, wobei der  $\text{OCH}_3$ -Gehalt des Rückstandes von 5.03 auf 6.46% stieg. Der dabei in Lösung gehende Zucker bestand zu einem Drittel aus Pentosen. Da bei dem Abbau auch ein Teil des  $\text{OCH}_3$  in Lösung geht, wurde versucht, einen ersten Anhaltspunkt für den Verbleib, bzw. die Zugehörigkeit dieses  $\text{OCH}_3$  zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde die gereinigte Abbaulösung dieser ersten Stufe mit Hefe vergoren. Der unvergärbar hinterbleibende Zucker, der auf Grund der Pentosenbestimmung praktisch völlig aus  $\text{C}_6$ -Zuckern besteht, enthielt dann 4.24%  $\text{OCH}_3$ , womit die Hauptmenge des in Lösung gegangenen  $\text{OCH}_3$  gefaßt war. Es dürfte also in erster Linie im Holz in Form methylierter Pentosane oder Poly-Uronsäuren vorliegen.

Folgende Tafel vergleicht den nicht weiter abbaubaren Rückstand mit dem Ausgangsmaterial:

Tafel 11.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Holundermark III	C	H	$\text{OCH}_3$
	in %		
Ausgangsmaterial . . . . .	49.14	6.30	5.03
Rückstand des 63-proz. Abbaus . . . . .	54.18	6.44	8.22

Entgegen den beiden schon beschriebenen Abbauversuchen von Holundermark kommt hier der Abbau zum Stehen, wenn der Rückstand die doppelte Gewichtsmenge des im Ausgangsmaterial festgestellten Lignins (18.5%) beträgt.

Die Untersuchung des Abbaurückstandes ergab folgende Zusammensetzung (ausgedrückt in Millimol):

$$\frac{0.237 \text{ Hexosan} + 0.066 \text{ Pentosan}}{0.303 \text{ Polysaccharide} + 0.309 \text{ Lignin.}}$$

War schon bei den weniger weit abgebauten Präparaten ein auffallender  $\text{OCH}_3$ -Schwund im Lignin des Abbaurückstandes festgestellt worden, so gilt dies ganz besonders in vorliegendem Fall.

Tafel 12.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Lignin aus	C	H	$\text{OCH}_3$
		in %	
Ausgangsmaterial . . . . .	66.17	6.04	19.66
Rückstand des 63-proz. Abbaus . . . . .	58.92	5.73	12.13

Man beobachtet also mit zunehmendem enzymatischen Abbau ein Absinken des C- und  $\text{OCH}_3$ -Gehaltes des aus den Abbaurückständen erhaltenen Lignins. Eine Fraktionierung des im Ausgangsmaterial vorhandenen Lignins kann dabei nicht vorliegen, da innerhalb der Versuchsgenauigkeit die gesamte, im Ausgangsmaterial enthaltene Ligninmenge erhalten bleibt. Auch wurde die Möglichkeit eines nicht vollständigen Holzaufschlusses einerseits, sowie einer Beeinflussung der Analysendaten durch Huminsubstanzen andererseits, durch Variation der für den Aufschluß verwendeten Schwefelsäure-Konzentration geprüft. Die erhaltenen Lignine zeigten aber praktisch gleiche C- und  $\text{OCH}_3$ -Werte.

Vom  $\text{OCH}_3$ -Gehalt des Abbaurückstandes sind 83% im Lignin gebunden. Im Verlauf des Abbaus sind aber etwa 40% des im Ausgangsmaterial enthaltenen  $\text{OCH}_3$  in Lösung gegangen.

Wie schon eingangs betont, vollzog sich der Abbau des jungen Holundermarks II auch bei anfänglicher Verwendung schwächerer Enzyme mit großer Leichtigkeit. In nur 2 Stufen von zusammen 14 Tagen Dauer waren schon 64% der Substanz in Lösung gegangen. Nach weiteren 14 Tagen und 3 Stufen betrug der Gesamtabbau 70.9%, wobei aber in der letzten Stufe bereits kein reduzierender Zucker mehr gebildet wurde. Dem stärkeren Abbau entsprechend zeigt der Rückstand eine viel stärkere Zunahme des C-Gehaltes gegenüber dem Ausgangsmaterial als dies bei den vorstehend beschriebenen Holundermarksorten der Fall war:

Tafel 13.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	C	H	$\text{OCH}_3$
		in %	
Holundermark II . . . . .	48.21	6.71	4.82
Abbaurückstand . . . . .	55.61	6.25	9.67

Im Gegensatz zu dem nicht weiter angreifbaren Rückstand aus Araucaria-Mark, der äußerlich völlig wie ein schonend gewonnenes Lignin aussieht, verändert das junge Holundermark sein Aussehen im Verlauf des 70.9-proz. Abbaus überhaupt nicht. Der Rückstand ist von heller, gelblich-

weißer Farbe. Trotzdem ergab die weitere Untersuchung den erwarteten hohen Ligningehalt dieses Materials von 50%. In Molen ausgedrückt ergab sich für den Abbaurückstand folgende Zusammensetzung:

$$\frac{0.206 \text{ Mol Hexosan} + 0.073 \text{ Mol Pentosan}}{0.279 \text{ Mol Polysaccharide} + 0.259 \text{ Mol Lignin.}}$$

Die Zusammensetzung des aus dem Abbaurückstand gewonnenen Lignins weicht von der des Ausgangsmaterial-Lignins etwas ab:

Tafel 14.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	C	H	OCH <sub>3</sub>
	in %		
Holundermark II Lignin .....	65.18	6.28	18.80
Abbaurückstand .....	64.24	5.99	16.33

Das im Ausgangsmaterial festgestellte Lignin wird im Abbaurückstand zu 95%, d. h. unter Berücksichtigung der Fehlerquellen, die durch die Umrechnung vervielfacht werden, quantitativ wiedergefunden. Die Feststellung, daß etwa die Hälfte des OCH<sub>3</sub>-Gehalts von Holundermark II nicht dem Lignin angehört, wird durch die Ergebnisse des Abbaus bestätigt.

Zusammenfassend stellt sich das Ergebnis der geschilderten Versuche kurz folgendermaßen dar:

1. Es ist erstmalig gelungen, verholztes Material mit isolierten Enzymen z. Tl. weitgehend abzubauen, indem an Stelle der sehr resistenten Hölzer jüngeres, lebendes Gewebe, wie Pflanzenmark und Bast, verwendet wurden.
2. Der enzymatische Abbau führt zu Abbaurückständen, in denen C und OCH<sub>3</sub> gegenüber dem Ausgangsmaterial angereichert sind, womit die Existenz von Körpern mit höherem C-Gehalt als Kohlenhydrate ihn besitzen, im nativen Holz eindeutig bewiesen ist. Die chemische Untersuchung der Abbaurückstände bestätigt die Ligninanreicherung.
3. Ein je nach Abbaugrad und -Material mehr oder weniger großer Teil des OCH<sub>3</sub>-Gehaltes der Hölzer geht beim Abbau mit den Zuckern in Lösung. Tritt durch den enzymatischen Abbau kein Ligninschwund ein, so dürfte das in Lösung gehende OCH<sub>3</sub> wohl hauptsächlich in Form von Methylzuckern (Pentosen) vorliegen. Über den gegenteiligen Fall läßt sich noch nichts aussagen.
4. Die enzymatische Abbaubarkeit eines Materials hängt neben Alter und Verholzungsgrad in noch ungeklärter Weise von den angewendeten Enzymen ab. Das gleiche Material, das sich bei Anwendung kräftiger Enzyme als weitgehend abbaubar erweist, kann nämlich bei Anwendung schwächerer Enzyme einen geringeren Angriff bis zu einem Punkt erleiden, bei dem nachträglich auch die starken Enzyme nicht mehr anzugreifen vermögen.
5. An verschiedenen Materialien wurde das übereinstimmende Ergebnis erzielt, daß der Enzymangriff auch bei leicht abbaubaren Geweben nicht

ohne weiteres bis zum Lignin führt. Es werden vielmehr zwei Abbauarten festgestellt, die insofern zu definierten Abbaurückständen führen, als in diesen bestimmte, ganzzahlige Lignin-Polysaccharid-Verhältnisse vorliegen.

### Beschreibung der Versuche.

Die Abbauversuche, die sich z. Tl. über längere Zeit erstreckten, wurden mit verschiedensten *Helix*-präparaten, die nach schon beschriebenen Reinigungsverfahren<sup>8)</sup> hergestellt wurden, durchgeführt. Da es sich hier jedoch nur darum handelt, in möglichst kurzer Zeit die Holzproben abzubauen und weitgehende Trennungen und Aufteilungen des Enzymgemisches, das der Verdauungssaft der Weinbergschnecke darstellt, diesem Zweck eher schädlich als nützlich sind, beschränkte ich mich in letzter Zeit auf die Forderung, daß das verwendete Enzympräparat die angesetzten Hölzer weder adsorptiv noch durch Flockung verunreinigt. Zur Erreichung dieses Ziels genügt es, wenn man 20 ccm zentrifugierten Rohsaft mit 400 ccm H<sub>2</sub>O und 160 ccm Acetat-Puffer vom pH 4.7 versetzt und diese Lösung unter Toluol so lange bei 37° im Brutschrank stehen läßt, bis die allmählich eintretende Eiweißfällung beendet ist. Dies ist nach 8—14 Tagen der Fall. Durch wiederholtes Zentrifugieren der gesamten Lösung während dieser Zeit stellt man den Endpunkt der Flockung fest. Die so gereinigte Enzymlösung besitzt noch ein Reduktionsvermögen gegenüber Hypojodit (Willstätter-Schudel), das durch Dialyse nur wenig herabgesetzt werden kann. Ich habe mich überzeugt, daß dieser „Leerwert“ nicht von Zuckern, sondern vom Eiweiß stammt. Die Enzymlösung wird dann ohne weitere Verdünnung mit den Hölzern angesetzt. Parallelansätze prüfen die Aktivität gegen Cuprophan sowie die Konstanz des Leerwertes.

### Abbau von Araucaria-Materialien.

1. 4.3719 g Trockensubstanz (= TS) (aschefrei) fein gemahlener, mit Benzol-Alkohol und Wasser extrabierter Araucaria-Bast wurden angesetzt. In der ersten Abbaustufe (6 Tage) gingen 878 mg red. Zucker in Lösung. Davon waren 426 mg Pentosen. 5 weitere Stufen brachten in insgesamt 41 Tagen noch 1446 mg red. Zucker in Lösung, wovon 329 mg Pentosen waren. Die Abbaufähigkeit der Substanz war dann noch nicht erschöpft. Der Rückstand betrug 2.026 g TS aschefrei.

Zwischen den einzelnen Abbaustufen werden die abzentrifugierten Holzrückstände immer gründlich mit Acetat-Puffer vom pH 4.7, Wasser und schließlich mit Alkohol gewaschen, zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut in der Achatmühle gemahlen.

### 2. Das Araucaria-Mark wurde nur getrocknet und gemahlen.

Ein erster Ansatz von 0.906 g TS ließ sich in nur 3 Abbaustufen von insgesamt 17 Tagen Dauer zu 77.5% abbauen. Der Rückstand wurde dann noch 3-mal frischem Enzym insgesamt 14 Tage ausgesetzt, ohne daß reduzierender Zucker festgestellt werden konnte. Der Rückstand betrug 0.295 g TS.

<sup>8)</sup> I. Mitteil., *Ztschr. physiol. Chem.* **259**, 19 [1939].

Der zweite Ansatz von 1.769 g TS wurde in 5 Stufen von zusammen 37 Tagen zu 78.1% abgebaut. Auch hier war eine weitere Ferment-Einwirkung erfolglos. Die erste Abbaustufe von 54.2% wurde in 7 Tagen erreicht.

20 ccm der Abbaulösung der 2. Stufe wurden, mit 20 ccm 4.5-proz. Schwefelsäure versetzt,  $6\frac{1}{2}$  Stdn. bei 100° gehalten. Es entstand eine geringe rotbraune Flockung, die nach dem Abtrennen, Waschen und Trocknen in verd. kalter Natronlauge löslich war.

89.0 mg TS des Abbaurückstandes ergaben unter den Bedingungen der Klason-Bestimmung 46.6 mg Lignin TS. Die Hydrolysiersäure enthielt 50.2 mg red. Zucker, wovon 9.9 mg Pentosen waren. Da letztere bei der Zuckerbestimmung als 11.9 mg red. Zucker (Hexose) erscheinen, verbleiben in Wirklichkeit 38.3 mg Hexose neben 9.9 mg Pentose, das sind 34.5 mg Hexosan und 8.7 mg Pentosan, zusammen 43.2 mg Polysaccharide.

Bilanz: Erfäüte Substanz	46.6 mg	+	43.2 mg	=	89.8 mg
Einwaage					89.0 ..

#### Abbau von Holundermark.

Holundermark I, aus älteren Pflanzenteilen gewonnen, wurde getrocknet, in der Kugelmühle fein gemahlen und mit Benzol-Alkohol extrahiert.

Der beschriebene Abbauversuch wurde mit 1.8015 g TS (aschefrei) durchgeführt. Nach Beendigung der Enzymeinwirkung wurden 1.270 g TS Rückstand festgestellt.

Die Ligninbestimmung des Abbaurückstandes wurde, ebenso wie alle anderen, nach der Vorschrift von Klason<sup>2)</sup> durchgeführt. Die Schwefelsäurekonzentrationen hielten wir jedoch mit 60% etwas niedriger als dort angegeben, da sich herausstellte, daß die Verwendung einer 66-proz. Säure bei den hier untersuchten Materialien die Gefahr einer Bildung von Huminstoffen auf Kosten der Pentosen in sich schloß.

99.3 mg TS (aschefrei) des Abbaurückstandes lieferten unter diesen Bedingungen 26.1 mg Lignin.

Im Hydrolysat wurden 88.0 mg red. Zucker gefunden. Davon waren 20.8 mg Pentosen, die bei der Zuckerbestimmung 24.9 mg Hexosen vortäuschen. Der tatsächliche Zuckergehalt der Flüssigkeit betrug demnach 63.1 mg Hexosen und 20.8 mg Pentosen. Im Holz liegen diese Zucker vor als 56.8 mg Hexosan und 18.3 mg Pentosan, zusammen also 75.1 mg Polysaccharide.

Von den 99.3 mg Einwaage wurden also 75.1 mg Polysaccharide + 26.1 mg Lignin, insgesamt 101.2 mg Substanz wiedergefunden. Die gesamte, im Abbaurückstand festgestellte Ligninmenge beträgt 106% des im Ausgangsmaterial enthaltenen.

Holundermark III: Das nicht extrahierte Mark wurde getrocknet und in der Kugelmühle staubfein gemahlen.

Der parallel mit Mark I durchgeführte Abbauversuch wurde mit 1.829 g TS (aschefrei) angesetzt. Infolge verschiedener Probenahmen während des Abbaus wurden noch 1.294 g TS des nicht weiter angreifbaren Rückstandes erhalten.

Die Ligninbestimmung, für die das bei Mark I gesagte gilt, wurde mit 97.2 mg TS (aschefrei) durchgeführt. Ligninausbeute 24.1 mg.

Das Hydrolysat enthielt 79.2 mg red. Zucker, wovon 20.4 mg Pentosen waren. Der tatsächliche Hexosengehalt ist demnach 54.7 mg. Berechnet man beide Zuckerarten als Polysaccharide (100-proz.), so erhält man 49.2 mg Hexosan neben 17.9 mg Pentosan, zusammen also 67.1 mg Polysaccharide. Daraus folgt das Molverhältnis 0.304 mg Mol Hexosan + 0.135 mg Mol Pentosan + 0.135 Mol. Lignin.

Die Bilanz ist aber nicht vollständig, da von den 97.2 mg Einwaage nur  $67.1 + 24.1 = 91.2$  mg erfaßt wurden.

Das im Ausgangsmaterial ermittelte Lignin wird im Rückstand zu 98.2% wiedergefunden, allerdings mit verminderterem  $\text{OCH}_3$ -Gehalt.

Für den zweiten Abbauprozess mit kräftigen Enzymen wurden 4.538 g TS des Materials angesetzt. In der ersten Abbaustufe wurde bereits ein Abbau auf 2.979 g erreicht, wobei die Abbaulösung 1685 mg red. Zucker enthielt. 562 mg davon waren Pentosen.

Am Ende der 7. Abbaustufe wurden 1.680 g TS Abbaurückstand erhalten.

Eine Ligninbestimmung von 97.9 mg TS (aschefrei) dieses Materials lieferte 55.0 mg Lignin, also 56.2%. Bezogen auf den Ligningehalt des Ausgangsmaterials bedeutet dies eine Ausbeute von 112%, was aber in Hinblick auf den hohen Umrechnungsfaktor (von 100 mg auf 4500 mg) noch in die bei Ligninbestimmungen erreichbare Genauigkeit fällt.

In der Hydrolysiersäure wurden 54.6 mg red. Zucker gefunden, wovon 9.9 mg Pentosen waren. Da letztere bei der Zuckerbestimmung als 11.9 mg Hexosen erscheinen, verbleiben in Wirklichkeit 42.7 mg Hexosen neben 9.9 mg Pentosen. In der Holzprobe liegen demnach vor 38.4 mg Hexosan und 8.7 mg Pentosan, zusammen 47.1 g Polysaccharide. Von der Einwaage von 97.9 mg sind somit erfaßt 38.4 mg Hexosan + 8.7 mg Pentosan + 55.0 mg Lignin = 102.1 mg Substanz.

Das junge Holundermark II wurde fein gemahlen und getrocknet dem enzymatischen Abbau unterworfen. Der im theoretischen Teil beschriebene Abbauprozess wurde mit 1.758 g TS (aschefrei) durchgeführt.

Von dem nicht mehr weiter angreifbaren Rückstand wurden 92.4 mg TS (aschefrei) zur Lignin-Bestimmung nach K1ason verwendet. Ligninausbeute 46.1 mg TS (aschefrei). Die Aufschlußsäure enthielt 50.2 mg red. Zucker (als Hexose berechnet). Da sie 11.0 mg Pentosen enthielt, die bei der Zucker-Bestimmung als 13.2 mg Hexosen erschienen, ergibt sich als tatsächlicher Zuckergehalt der Lösung 37.0 mg Hexosen + 11.0 mg Pentosen. Diese liegen im Holz als 33.3 mg Hexosan + 9.7 mg Pentosan vor, zusammen 43.0 mg Polysaccharide.

Von den eingewogenen 92.4 mg Substanz sind demnach durch die Bestimmung  $46.1 + 43.0 = 89.1$  mg erfaßt.

Bei einem Ligningehalt von 14.07% enthalten die 1.758 g Ausgangsmaterial 0.248 g Lignin. Der Abbaurückstand von 0.511 g enthält bei einem Ligningehalt von 49.9% 0.255 g Lignin.

Die Ausführung der Analysen verdanke ich unserem unter Leitung von Hrn. Dr. E. Wiesenberger stehenden Mikrolaboratorium. Die Zuckerbestimmungen wurden von Fr. L. Wagner und Fr. E. Horn ausgeführt.