

### 13. Theodor Ploetz: Über den Bindungszustand des Lignins im Holz. VI. Mitteilung über den enzymatischen Abbau polymerer Kohlenhydrate\*.)

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

(Eingegangen am 19. Dezember 1939.)

Der enzymatische Abbau von Holzfraktionen, die durch Behandeln von Lindenholz mit Äthylendiamin-Kupferoxyd-Lösung gewonnen worden waren<sup>1)</sup>, hatte ergeben, daß diese Produkte nach einer bestimmten Abbauleistung dem weiteren Enzymangriff trotzten. Der Grad der Eignung zum Abbau war bei den beiden untersuchten Fraktionen sehr verschieden.

Die Hauptmenge des Materials, der in Äthylendiamin-Kupferoxyd unlöslich verbliebene Anteil (R), konnte nur um 18.6% abgebaut werden. Da in R 60.5% Cellulose und 20.55% Lignin gefunden worden waren, die zusammen also 81.05% des Materials ausmachten, wurde die Vermutung ausgesprochen, daß der enzymat. Abbau nur die Hemicellulosen (=18.95%) erfaßt habe. Der Rückstand müßte dann so zusammengesetzt sein, daß auf 3 Gewichtsteile Kohlenhydrat 1 Teil Lignin treffen würde, ein Verhältnis, das in erster Näherung auch auf die Moleküle bzw. deren Bausteine übertragen werden kann.

Die zweite Fraktion des Lindenholzes, die beim Ansäuern der Äthylendiamin-Kupferoxyd-Lösung erhaltene Fällung (F), zeigte sich dem enzymat. Abbau wesentlich zugänglicher. Hier konnten leicht 51.4% der Substanz in Lösung gebracht werden. Da F 26.14% Lignin enthält, wurde die Vermutung ausgesprochen, daß der rasche Abbau dann beendet sei, wenn der Rückstand zu gleichen Teilen aus Lignin und Kohlenhydratbausteinen besteht. Durch weitere Enzymeinwirkungen konnte nun allerdings der Abbau gewichtsmäßig weitergetrieben werden. Er verlief dann aber äußerst schleppend. So konnte in der gleichen Zeit, in der vom Ausgangsmaterial 51.4% abgebaut wurden, der Abbau nur auf 64.8% weitergetrieben werden. Neben der plötzlichen Änderung der Abbaugeschwindigkeit spricht aber noch etwas für die Annahme, daß nach Erreichung des Kohlenhydrat-Ligninverhältnisses 1 : 1 das Substrat seine Eigenschaften ändert. Trotz des Fortschreitens auf 64.8%, wobei also vom Rückstand des 51.4-proz. Abbaus noch ein Drittel in Lösung geht, ändert sich die analytische Zusammensetzung des Rückstandes fast nicht mehr.

Tafel 1.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

	C	H	OCH <sub>3</sub>
		in %	
Ausgangsmaterial . . . . .	45.98	5.91	7.23
Nach 51.4-proz. Abbau . . . . .	51.77	6.36	9.07
Nach 64.8-proz. Abbau . . . . .	50.53	6.10	9.38

\*) Zugleich XXXII. Mitteil. über Lignin v. K. Freudenberg u. Mitarbeitern; V. bzw. XXXI. Mitteil. voranstehend.

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

Man gewinnt also den Eindruck, daß der Rückstand des enzymat. Abbaus nach Erreichung der Zusammensetzung Lignin-Kohlenhydrat 1 : 1 sich gegen den weiteren enzymat. Angriff wie eine schwer abbaubare, einheitliche Substanz verhält.

Bei der Untersuchung des Abbaurückstandes der Fraktion R wurden 97% der Einwaage erfaßt. Das Material bestand aus 72.8% Polysacchariden und 24.2% Lignin. In Millimol ausgedrückt, standen die erfaßten Bestandteile in folgendem Verhältnis:

$$\frac{0.389 \text{ Hexosan} + 0.045 \text{ Pentosan}}{0.434 \text{ Polysaccharide} + 0.129 \text{ Lignin.}}$$

Der Abbaurückstand der Fraktion F bestand zu 45.8% aus Polysacchariden. Da das Lignin bei der Aufarbeitung teilweise verloren ging und der Versuch aus Materialgründen nicht wiederholt wurde, muß hier als Lignin-gewicht die Differenz, also 54.2%, eingesetzt werden. Unter dieser Einschränkung ergibt sich für den Abbaurückstand folgende Zusammensetzung (in Millimol):

$$\frac{0.268 \text{ Hexosan} + 0.055 \text{ Pentosan}}{0.323 \text{ Polysaccharide} + 0.300 \text{ Lignin.}}$$

Die bei jungen Materialien<sup>2)</sup> festgestellte Erscheinung, daß die aus den Abbaurückständen isolierten Lignine wesentlich OCH<sub>3</sub>-ärmer sind, als die vor dem Enzymangriff erhältlichen Lignine, trifft beim Lindenholz nicht zu. Folgende Tafel vergleicht die Zusammensetzung der einzelnen Lignine:

Tafel 2.

(Werte bezogen auf trocken und aschefrei.)

Lignin aus:	C	H	OCH <sub>3</sub>
		in %	
Fraktion R .....	61.32	6.04	20.91
Abbaurückstand .....	64.07	5.70	20.36
Fraktion F .....	61.40	5.26	15.64
Abbaurückstand .....	62.79	5.57	17.10

In beiden Fraktionen R und F bleibt also die ursprünglich festgestellte Ligninmenge, unabhängig von der Tiefe des enzymat. Abbaues, im Rückstand erhalten. Die gleiche Feststellung wurde auch bei den Holunder-Mark-Präparaten gemacht. Nur beim Araucaria-Mark trat mit dem Abbau eine Abnahme des Lignin gehaltes ein.

Es fällt nun auf, daß bei diesen verschiedenen Materialien der enzymat. Abbau zu resistenten Rückständen analoger Zusammensetzung führt. Tafel 3 vergleicht diese Abbaurückstände.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß die Beendigung des enzymat. Abbaus nicht von Zufälligkeiten, wie dem Verteilungsgrad usw., abhängt. Es tritt vielmehr eine Gesetzmäßigkeit zu Tage, die zu Rückschlüssen auf den inneren Bau der Holzsubstanz zwingt.

<sup>2)</sup> Vergl. V. Mittel. voranstehend.

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

Rückstand des enzymat. Abbaus von	Hexosan	Pentosan	Poly- saccha- ride	Lignin	Polysacch.	Lignin
					Lignin	Pentosan
Holundermark I . . . .	55.1	21.8	76.9	23.1	3.32	1.06
Holundermark III . . .	52.9	23.5	76.4	23.5	3.25	1.00
Lindenfraktion R . . . .	69.2	7.9	77.1	22.9	3.36	2.90
Araucaria-Mark . . . .	38.3	11.9	50.2	49.8	1.01	4.18
Holundermark II . . . .	38.3	13.5	51.8	48.2	1.07	3.57
Holundermark III . . .	38.7	10.8	49.5	50.5	0.98	4.68
Lindenfraktion F . . . .	43.0	8.8	51.8	48.2	1.07	5.47

Da bei den leicht abbaubaren Materialien der Abbau durchweg dann zum Stocken kommt, wenn der Rückstand aus gleichen Teilen Lignin und Kohlenhydrat besteht, muß ein innerer Zusammenhang dieser beiden Komponenten angenommen werden. Welcher Art dieser Komplex ist, geht aber aus den bisherigen Versuchsergebnissen nicht hervor. Es liegt nahe, eine chemische Bindung anzunehmen. Das würde also bedeuten, daß das gesamte, im nativen Material gefundene Lignin als Verbindung mit der gleichen Menge Kohlenhydrat im Holz vorliegt. Als integrierender Bestandteil dieses Komplexes erscheinen die Pentosen, die vermutlich zu den Hexosen auch in einem ganzzahligen Verhältnis stehen dürften. Letzteres konnte infolge der bekannten Fehlerbreite der Pentosen-Bestimmung und durch die kleinen Substanzmengen, die mir bis jetzt zur Verfügung standen, noch nicht ermittelt werden. Es besteht auch noch die Möglichkeit, daß Uronsäuren die oben gefundenen Pentosanwerte vortäuschen.

Wie schon in der V. Mitteilung hervorgehoben wurde, zeigen die Abbaurückstände einen höheren  $\text{OCH}_3$ -Gehalt, als ihrer Ligninmenge entspricht. Es müssen also noch methylierte Kohlenhydrate in ihnen enthalten sein. Daß auch diese Tatsache nicht zufällig sein dürfte, zeigt folgende Zusammenstellung der Abbaurückstände:

Tafel 4.

Abbaurückstand von	% $\text{OCH}_3$	% Lignin	$\text{OCH}_3$ -Gehalt des Lignins	$\text{OCH}_3$ an Lignin gebunden, in % des Gesamt- $\text{OCH}_3$
Holundermark I . . . . .	5.92	26.3	15.71	69.3
Holundermark III . . . .	5.30	24.8	14.77	69.2
Lindenfraktion R . . . . .	7.20	24.2	20.36	68.4
Araucaria-Mark . . . . .	3.20	52.3	4.45	72.7
Holundermark II . . . . .	9.67	49.9	16.33	84.3
Holundermark III . . . .	8.22	56.2	12.13	82.9

Mit Ausnahme des Araucaria-Marks, das bezüglich der  $\text{OCH}_3$ -Werte eine Sonderstellung einnimmt, zeigen also die beiden Arten Abbaurückstände auch in dieser Beziehung eine überraschende Übereinstimmung.

Wie das Verhalten des Abbaurückstandes der Lindenfraktion F zeigt, braucht die Resistenz gegen den weiteren enzymat. Angriff keine absolute

zu sein. Es genügt, eine wesentlich verringerte Reaktionsgeschwindigkeit anzunehmen, wie wir sie z. B. aus den Arbeiten von B. Helferich über Emulsin kennen. Große Unterschiede in der Natur des Aglykons können die Aufspaltbarkeit von Glykosiden mit gleichem Zuckerrest durch ein Enzym sehr unterschiedlich gestalten. Die Annahme einer glykosidischen Lignin-Zucker-Bindung könnte also zur Erklärung der Befunde ausreichen. Die Deutungsmöglichkeiten sind aber damit nicht erschöpft.

Läßt sich schon das Ergebnis, daß im Holz eine dem Lignin entsprechende Kohlenhydratmenge irgendwie an dem Lignin verankert ist, schlecht mit den bisherigen Vorstellungen über die Verteilung der Kohlenhydrate im Holz vereinbaren, so werden diese Schwierigkeiten noch viel größer, wenn man ein diesem noch übergeordnetes Bauprinzip annehmen will.

Ein solches deutet sich aber in der Zusammensetzung der „schwer abbaubaren“ Materialien der Tafel 3 an. Die Abbaurückstände dieser Stoffe enthalten etwa 3 Kohlenhydrate auf einen Ligninbaustein. Außerdem scheint ein einfaches ganzzahliges Verhältnis zwischen Pentosen und Lignin zu bestehen. Die Verhältnisse liegen nun nicht etwa so, daß zwei verschiedene Kohlenhydrat-Lignin-Komplexe (3 : 1 und 1 : 1) nebeneinander im Holz vorliegen, sondern man muß annehmen, da ja jeder dieser Komplexe das gesamte im Holz vorhandene Lignin beansprucht, daß der Komplex 3 : 1 durch weiteren Abbau in das Verhältnis 1 : 1 übergeht.

Dieser Fall ist beim Holundermark III verwirklicht, in dem, bei primärem Angriff durch schwächere Enzyme, der Komplex 3 : 1 herausgearbeitet wird, während bei Anwendung starker Enzyme von Anfang an der Rückstand 1 : 1 resultiert. Inzwischen hat sich herausgestellt, daß nicht nur enzymat., sondern auch auf chemischem Wege (mit Äthylendiamin-Kupferoxyd) der Komplex 3 : 1 durchbrochen werden kann<sup>3)</sup>.

Während bei den einzelnen Holundermark-Präparaten das gesamte im Ausgangsmaterial gefundene Lignin in den Abbaurückständen noch vorhanden war und somit in obiger gebundener Form vorliegen mußte, gilt dies nicht für das Lindenholz. Auch hier gilt zwar der gleiche Befund für das in den Holzfraktionen noch vorhandene Lignin, doch ist diese Menge kleiner als die im nativen Lindenholz gefundene Ligninmenge. Über die im Verlauf des Äthylendiamin-Kupferoxyd-Aufschlusses verloren gegangene Ligninmenge (11.4% des Gesamtignins) kann dagegen nichts ausgesagt werden. Es kann sich dabei um echtes Lignin oder Lignin-Kohlenhydrat-Verbindungen handeln, die infolge eines niedrigen Polymerisationsgrades beim Aufschluß löslich werden, es können aber auch Stoffe sein, die erst unter dem Einfluß der Mineralsäure zu Lignin werden.

### Beschreibung der Versuche.

Die Abbaurückstände wurden nach der in der V. Mitteil. beschriebenen Methode untersucht.

Von dem Abbaurückstand des in Äthylendiamin-Kupferoxyd-Lösung unlöslichen Rückstandes wurden 94.8 mg TS (aschefrei) der Lignin-Bestimmung unterworfen. Es wurden 22.9 mg Lignin erhalten.

<sup>3)</sup> Eigene Versuche, noch nicht veröffentlicht.

Das Hydrolysat enthielt 78 mg reduzierenden Zucker. Da die Pentosenbestimmung 6.75 mg Pentosen ergab, die bei der Zuckerbestimmung als 8.1 mg Hexosen in Erscheinung treten, enthält das Hydrolysat tatsächlich nur 69.9 mg Hexosen und 6.75 mg Pentosen. Im Holz liegen diese vor als 63 mg Hexosan und 5.95 mg Pentosan, zusammen 68.95 mg Polysaccharide.

Von der Einwaage von 94.8 mg wurden also erfaßt 68.95 mg + 22.9 mg = 91.85 mg Substanz, das sind 97%.

Da der Abbaurückstand 7.20%  $\text{OCH}_3$  enthält und das daraus in einer Menge von 24.2% erhältliche Lignin 20.36%  $\text{OCH}_3$ , sind 68.4% des  $\text{OCH}_3$  des Abbaurückstandes an Lignin gebunden. Der Rest muß Kohlenhydraten zugehören.

Der Abbaurückstand der Fraktion F konnte, wie schon erwähnt, nur bezüglich seines Kohlenhydratgehaltes mit Sicherheit erfaßt werden. 99.3 mg TS (aschefrei) der Substanz wurden mit der 60-proz. Schwefelsäure behandelt. Die Säure enthielt dann 52 mg red. Zucker, wovon 7.3 mg Pentosen waren. Da diese als 8.5 mg red. Zucker in die Zuckerbestimmung eintreten, betragen die richtigen Werte 43.5 mg Hexosen + 7.3 mg Pentosen. In der Holzprobe sind demnach 39 mg Hexosan + 6.5 mg Pentosan, zusammen 45.5 mg Polysaccharide.

Da ein Teil des Lignins bei der Aufarbeitung verloren ging, konnte hier nur der theoretische Differenzwert von 53.8 mg (erhalten 39.6 mg) eingesetzt werden. Die genaue bilanzmäßige Durchrechnung ergibt aber, daß diesem Wert große Wahrscheinlichkeit zukommt.

#### 14. Alfred Dornow: Über einige in $\beta$ -Stellung substituierte $\alpha$ -Picoline.

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

(Eingegangen am 16. Dezember 1939.)

Nach einer vor kurzem<sup>1)</sup> beschriebenen Synthese lassen sich 2.3-Derivate des Pyridins leicht durch Umsetzung des  $\beta$ -Äthoxyacrolein-diäthylacetals  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$  mit Verbindungen vom Ketimin-amin-Typus der allgemeinen Formel  $\text{R}' \cdot \text{C}(:\text{NH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{R}'' \rightleftharpoons \text{R}' \cdot \text{C}(\text{NH}_2) : \text{CH} \cdot \text{R}''$  erhalten. Dabei tritt, wie gezeigt werden konnte, die Ketiminform<sup>2)</sup> in Reaktion.

Der unter Verwendung von Amino-crotonsäureester hergestellte 2-Methyl-nicotinsäureester ist nun besonders geeignet, durch Abwandlung der Carboxylgruppe weitere bisher unbekannte in der benachbarten  $\beta$ -Stellung substituierte  $\alpha$ -Picoline zu gewinnen.

Wegen der großen physiologischen Bedeutung des Nicotinsäureamids wurde zum Vergleich das 2-Methyl-nicotinsäureamid durch Umsetzung des Esters mit Ammoniak dargestellt. Eine Prüfung<sup>3)</sup> dieses Amids

<sup>1)</sup> P. Baumgarten u. A. Dornow, B. **72**, 563 [1939].

<sup>2)</sup> A. Dornow, B. **72**, 1548 [1939].

<sup>3)</sup> Für die pharmakologischen Untersuchungen bin ich der I.-G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld, zu großem Dank verpflichtet.