

WOLFGANG FLAIG, ULRICH SCHOBINGER¹⁾ und HANS DEUEL

Umwandlung von Lignin in Huminsäuren bei der Verrottung von Weizenstroh

Aus dem Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft,
Braunschweig-Völkenrode, und dem
Agrikulturchemischen Institut der Eidg. Techn. Hochschule Zürich
(Eingegangen am 6. März 1959)

Weizenstroh wurde 410 Tage der Verrottung ausgesetzt. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und daraus nach verschiedenen Methoden Lignin und Huminsäuren extrahiert. Mit der Verrottung nimmt in den Ligninen der Gehalt an C und an OCH₃-Gruppen ab, der Gehalt an O und N, an C=O-Gruppen, an titrierbaren sauren Gruppen und an decarboxylierbaren Gruppen nimmt zu. Die IR-Spektren zeigen entsprechende Veränderung. Ein Vergleich dieser Daten mit denen der Huminsäuren läßt den Schluß zu, daß sich das Lignin bei der Verrottung des Strohs allmählich in Huminsäuren umwandelt.

Die Ergebnisse zahlreicher infrarotspektroskopischer Arbeiten²⁾ deuten darauf hin, daß Lignin und Huminsäuren aus ähnlichen Atomgruppen aufgebaut sind. Auch ergeben natürliche Huminsäuren bei verschiedenen Abbaureaktionen zum Teil die gleichen Spaltprodukte wie Lignin, so z. B. Protocatechusäure und Brenzcatechin³⁾, Vanillin⁴⁾ und Cyclohexanolderivate⁵⁾. Obwohl Lignin durch alkalische Oxydation im Autoklaven in huminsäureähnliche Produkte übergeführt werden kann⁶⁾, ist es bisher nicht gelungen, schonend isoliertes Lignin auf biologischem Wege in Huminsäuren umzuwandeln⁷⁾. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich das Lignin in der Pflanze bei der Verrottung verändert.

GEWINNUNG DER LIGNINE UND HUMINSÄUREN

Weizenstroh wurde in einem thermokonstanten Raum bei 28° unter Zusatz einer Nährlösung 410 Tage der aeroben Verrottung unterworfen. Das Lignin wurde in verschiedenen Zeitabständen isoliert und mit den neugebildeten Huminsäuren verglichen. Bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen über die Zersetzung von Pflanzenresten verschiedenster Herkunft wurde die Ligninfaktion vor allem nach dem Schwefelsäureverfahren⁸⁾ isoliert. Da diese Methode sehr grob ist, haben wir

¹⁾ Auszug aus der Dissertat. U. SCHOBINGER, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich 1958.

²⁾ I. A. BREGER, Fuel 30, 204 [1951]; M. CEH und D. HADZI, ebenda 35, 77 [1956]; R. M. ELOFSON, Canad. J. Chem. 35, 926 [1957]; K. KUMADA und K. AIZAWA, Soil and Plant Food [Tokyo] 3, 152 [1958]; ref. in C. A. 52, 13165c [1958].

³⁾ S. S. DRAGUNOW, N. N. SCHELOCHOWTZEWA und E. T. STRELKOWA, Pedologija 7, 409 [1948]; ref. W. FLAIG, Landw. Forsch. Sonderheft 6, 94 [1955].

⁴⁾ H. STACH, Brennstoff-Chem. 22, 170 [1941]. ⁵⁾ E. GANZ, Ann. Chimie 19, 202 [1944].

⁶⁾ F. FISCHER und H. SCHRADER, Brennstoff-Chem. 2, 37 [1921].

⁷⁾ J. WEHRMANN, Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 70, 34 [1955].

⁸⁾ G. J. RITTER, R. M. SEBORG und R. L. MITCHELL, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 4, 202 [1932].

daneben auch die viel milder Dioxanextraktion nach BJÖRKMAN⁹⁾ angewandt. Die mit der BJÖRKMAN-Methode im Laufe der Verrottung erhaltenen Produkte wiesen indessen einen für Lignin zu hohen Stickstoff- und zu niedrigen Methoxylgehalt auf, so daß man diese Substanzen streng genommen nicht mehr als Lignin, sondern eher als ligninähnliche Fraktion bezeichnen sollte.

Mit heißem Wasser konnten aus dem verrotteten Stroh bis zu 25% der organischen Substanz extrahiert werden. 30–40% dieser dunkelbraun gefärbten, organischen Stoffe konnten durch Ansäuern mit HCl auf p_{H} 1 ausgeflockt werden. Diese Stoffe fallen definitionsgemäß nicht mehr unter den Begriff Lignin, sondern eher unter den Begriff Huminsäuren. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß vor kurzem aus Rhododendronblättern Huminsäuren in wasserlöslicher Form isoliert wurden¹⁰⁾.

ELEMENTARANALYSE UND GRUPPENBESTIMMUNG

Aus Tab. 1 geht hervor, daß sich die Elementarzusammensetzung der Lignine und der Huminsäuren bei der Verrottung des Strohs ähnlich verändert. Der in den Schwefelsäureligninen vorhandene Schwefel ist auf die Einführung von Sulfonsäuregruppen bei der Schwefelsäurebehandlung zurückzuführen. Die hohen Aschegehalte der Schwefelsäurelignine dürften vor allem der starken Anreicherung an Kieselsäure zuzuschreiben sein. Am auffallendsten bei den Ligninen sind die Abnahme des Kohlenstoff- und des Methoxylgehalts und der Anstieg des Stickstoffgehalts. Die hohen

Tab. 1. Elementarzusammensetzung, Methoxyl- und Aschegehalt der Schwefelsäure- und Björkman-Lignine und der Huminsäuren aus Stroh nach verschiedener Rottezeit
(in % der aschefreien Trockensubstanz)

Rottezeit in Tagen	C %	H %	N %	O %	S %	$-\text{OCH}_3$ %	Asche %
Schwefelsäurelignin							
0	58.59	5.60	0.54	31.37	3.9	15.33	14.22
70	58.78	5.93	2.01	29.48	3.8	11.14	26.73
180	58.67	5.91	2.37	29.15	3.9	9.06	40.62
260	58.00	5.83	3.14	29.93	3.9	7.84	37.40
340	54.97	5.96	3.08	32.09	3.9	8.57	38.64
410	54.29	5.86	2.97	32.88	4.0	7.32	32.71
Björkman-Lignin							
0	60.68	5.79	0.42	33.11		16.76	1.11
70 *)	59.75	7.35	1.97	30.93		10.84	21.91
180	58.81	6.56	3.36	31.27		8.19	9.32
340 *)	57.37	6.95	4.54	31.14		7.50	49.36
Huminsäuren							
70	55.02	5.26	2.75	36.97		8.48	2.16
70 **)	56.20	5.59	1.91	36.30		10.80	3.19
180	55.65	5.22	3.38	35.75		8.47	2.10
260	53.74	5.19	3.44	37.63		7.66	2.89
340	52.92	5.21	2.94	38.93		8.31	3.87

*) bei höherer Temperatur isoliert **) mit 0.5-proz. Natronlauge isoliert

9) A. BJÖRKMAN, Nature [London] 174, 1057 [1954]; A. BJÖRKMAN, Svensk Papperstidn. 59, 477 [1956].

10) H. RAUDNITZ, Chem. and Ind. 1957, 1650.

Methoxylgehalte der Huminsäuren deuten auf die Herkunft aus Lignin hin. Die Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte sind z. T. bedeutend niedriger als in den Ligninen, die Sauerstoffwerte sind dagegen höher. Dies ist mit einem höheren Oxydationsgrad der Huminsäuren erklärbar und dürfte die Ursache ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit sein.

Der Carbonylgehalt der Björkman-Lignine wurde aus der Zunahme des Stickstoffgehalts bei der Reaktion mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin nach der Methode von PH. TRAYNARD und A. EYMBRY¹¹⁾ bestimmt. Hydroxylgruppen in α -Stellung zu Carbonylgruppen können unter diesen Bedingungen ebenfalls reagieren. Im Verlauf der Verrottung nimmt der Carbonylgehalt von 0.36% auf 0.47% (nach 70 Tagen) und 0.59% (nach 410 Tagen Rotte mit zusätzlicher Nährsalzbeigabe) zu. Dies dürfte mit der Bildung von C=O-Gruppen in der Phenylpropanseitenkette oder auch mit der Oxydation phenolischer OH-Gruppen zu Chinonen zusammenhängen. Der für Björkman-Lignin aus frischem Stroh ermittelte Carbonylgehalt von 0.36% kann wohl zum Teil auf die für die charakteristischen Farbreaktionen des Lignins verantwortliche Aldehydgruppe in der Phenylpropanseitenkette zurückgeführt werden¹²⁾.

SÄUREHYDROLYSE UND ALKALISCHMELZE

Zur Aufklärung der Bindungsart des Stickstoffs in den Ligninen und Huminsäuren wurden die Proben mit 6 n HCl hydrolysiert. Dabei wird ein Teil des Stickstoffs als α -Amino-Stickstoff abgespalten. Bei Björkman-Lignin aus frischem Stroh konnten im Hydrolysat papierchromatographisch 4 Aminosäuren nachgewiesen werden. Diese Zahl erhöhte sich nach 70 Tagen Rotte auf 13 und sank nach 410 Tagen auf 12. Björkman-Lignin aus frischem Stroh zeigte auch nach mehrmaligem Reinigen durch Auflösen in Dioxan und Ausfällen in Wasser stets einen Stickstoffgehalt von 0.4%. Diese Tatsache erhärtet die von A. BONDI und H. MEYER¹³⁾ aufgestellte Behauptung, wonach der Stickstoff eine charakteristische Komponente der aus Gramineen und Leguminosen isolierten Lignine darstellt.

Der Hydrolysenrückstand wird in einem Gemisch von KOH und Natriumacetat im Eisentiegel unter reduzierenden Bedingungen auf 250–270° erhitzt¹⁴⁾. Dabei wird Ammoniak abgespalten; seine Herkunft ist noch ungewiß. Modelluntersuchungen lassen vermuten, daß ein Teil davon aus solchen Aminosäuren stammt, die sich mit 6 n HCl nicht abspalten lassen.

Tab. 2 enthält die Ergebnisse dieser Stickstoffbestimmungen an den Schwefelsäure-ligninen; die Björkman-Lignine weisen die gleiche Tendenz auf. Mit zunehmender Rottezeit nimmt der Anteil des α -Amino-Stickstoffs am Gesamtstickstoff von 60% auf etwa 20% ab. Gleichzeitig nimmt der „Reststickstoff“ im Hydrolysenrückstand von 0.4 auf 1.4% zu. Der Gehalt an „Reststickstoff“ in den Huminsäuren lag zwischen 0.3 und 0.4%. Man darf annehmen, daß es sich bei diesem „Reststickstoff“ zum größten Teil um heterocyclisch gebundenen Stickstoff handelt. Tatsächlich konnten im

¹¹⁾ Holzforschung 10, 6 [1956].

¹²⁾ E. ADLER und L. ELLMER, Acta chem. scand. 2, 839 [1948]; J. C. PEW, J. Amer. chem. Soc. 74, 2850 [1952].

¹³⁾ A. BONDI und H. MEYER, Biochem. J. 43, 248 [1948].

¹⁴⁾ TH. BREYHAN, Z. analyt. Chem. 152, 412 [1956].

Rückstand der Schmelze, der in verdünnter Kalilauge löslich ist, nach Ansäuern und Ausäthern papierchromatographisch Indolverbindungen nachgewiesen werden, die zum Teil den gleichen R_F -Wert (0.41) aufweisen wie die bei der Alkalischmelze von Boden-Huminsäuren erhaltenen Verbindungen¹⁵⁾. Interessanterweise bildet *N*-Phenyl-glycin unter diesen Bedingungen der Schmelze keine nachweisbaren Mengen

Tab. 2. Menge und Natur des Stickstoffs in den Schwefelsäureligninen aus Stroh nach verschiedener Rottezeit (in % der aschefreien Trockensubstanz)

Rottezeit in Tagen	Ursprüngliches Lignin		Hydrolysat		Hydrolysenrückstand		
	Gesamt-N *) in %	α-Amino-Stickstoff in % des ursprüngl. Lignins	α-Amino-Stickstoff in % des Gesamt-N des ursprüngl. Lignins		Gesamt-N in %	NH ₃ -N in %	„Rest-N“ in %
			Gesamt-N des ursprüngl. Lignins	Gesamt-N des ursprüngl. Lignins			
0	0.55	0.32	58.1	0.22	0.22	0.22	0
70	2.09	0.82	39.2	0.97	0.58	0.58	0.39
180	2.46	0.52	21.1	1.08	0.62	0.62	0.46
260	3.26	0.68	20.8	1.38	0.56	0.56	0.82
340	3.20	0.65	20.3	1.67	0.82	0.82	0.85
410 **)	2.97	0.52	17.5	1.77	0.37	0.37	1.40

*) N in % der organ. Substanz, bestimmt nach DUMAS **) Mit zusätzlichen Nährsalzen verrottet

von Indolverbindungen¹⁴⁾. Somit kann man annehmen, daß die auf Indolnachweis positiv reagierenden Verbindungen keine Kunstprodukte sind, sondern als Bausteine der oxydierten Lignine bzw. der Huminsäuren anzusehen sind.

Ein deutlicheres Bild von der Veränderung in den Ligninen und Huminsäuren erhält man, wenn man die Zusammensetzung der Hydrolysenrückstände untersucht, aus denen Aminosäuren und Peptide entfernt sind (Tab. 3). Im Laufe der Verrottung nimmt der Kohlenstoffgehalt ab, der Gehalt an nichthydrolysierbarem Stickstoff und an Sauerstoff nimmt zu. Dies deutet darauf hin, daß Oxydations- oder Spaltprodukte des Lignins mit den hydrolysierbaren Aminosäuren bzw. Peptiden reagiert haben. Schwefel konnte in den Schwefelsäureligninen nach der Hydrolyse mit 6 n HCl nicht mehr nachgewiesen werden.

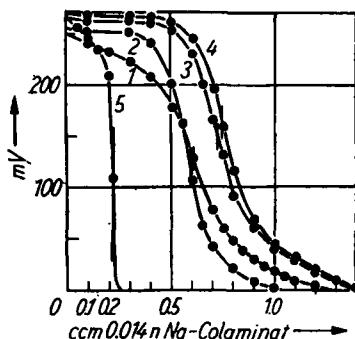
Tab. 3. Elementarzusammensetzung des Hydrolysenrückstandes der Schwefelsäurelignine und Huminsäuren aus Stroh nach verschiedener Rottezeit (in % der aschefreien Trockensubstanz)

Rottezeit in Tagen	C %	H %	N %	O %	Asche %
Schwefelsäurelignine					
0	63.39	5.41	0.22	30.98	14.85
70	60.15	5.68	0.97	33.20	28.55
180	60.40	5.66	1.08	32.86	43.70
260	58.86	5.61	1.38	34.15	40.15
340	56.66	5.62	1.67	36.05	42.08
Huminsäuren					
260	57.53	4.58	0.95	36.94	2.89
340	56.70	4.56	0.96	37.78	3.98

(15) W. FLAIG und TH. BREYHAN, Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 75, 132 [1956].

TITRATION UND DECARBOXYLIERUNG

Die durch die Zunahme der Sauerstoffwerte angedeutete Oxydation der Lignine (s. Tab. 3) lässt sich auch titrimetrisch nachweisen. Nach 70 und mehr Rottetagen ergeben die Björkman-Lignine bei der potentiometrischen Mikrotitration in Äthylen-diamin mit Na-Colaminat nach H. BROCKMANN und E. MEYER¹⁶⁾ steilere Kurven (Abbild. 1). Daraus und aus Untersuchungen an Modellsubstanzen, wie Benzoësäure, Vanillin usw., kann man auf die Bildung stärker saurer Gruppen, vornehmlich wohl Carboxylgruppen, eventuell auch Hydroxygruppen von Hydroxychinonen¹⁷⁾ schließen.



Abbild. 1.
Potentiometrische Titration
von Björkman-Lignin
aus Stroh in Äthylen-diamin
mit 0.014 n Na-Colaminat
nach 0 Tagen (1),
70 Tagen (2),
180 Tagen (3)
und 340 Tagen (4).
Einwaage entsprechend
3 mg organ. Substanz.
Kurve 5 Blindwert

Außerdem wurden die decarboxylierbaren Gruppen bestimmt. Die bis zum Wendepunkt verbrauchten Mengen Na-Colaminat und die Werte der sauren Decarboxylierung sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die titrierbaren und die decarboxylierbaren Gruppen nehmen mit der Verrottung zu. Das abgespaltene CO₂ kann aus α,β-ungesättigten Carbonsäuren der Phenylpropanseitenkette oder aus den bei der oxydativen Aufspaltung des aromatischen Kerns entstehenden ungesättigten Carbonsäuren stammen¹⁸⁾.

Tab. 4. Saure und decarboxylierbare Gruppen in den Björkman-Ligninen aus Stroh nach verschiedener Rottezeit (Titration mit 0.014 n Na-Colaminat und Decarboxylierung mit 12-proz. Salzsäure; Werte bezogen auf aschefreie Trockensubstanz)

Rottezeit in Tagen	Saure Gruppen mÄquiv./100 g	Decarboxylierbare Gruppen mMol CO ₂ /100 g	CO ₂ -Abspaltung in % der sauren Gruppen
0	178	10.6	6
70	173	14.5	8
180	233	30.4	13
340	243	—	—

Die leichte Decarboxylierbarkeit ist eine allgemeine Eigenschaft sowohl der natürlichen als auch der synthetischen Huminsäuren¹⁹⁾. Die für die leichte Decarboxylierbarkeit dieser Verbindungen verantwortlichen Gruppen konnten bisher nicht iden-

¹⁶⁾ Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

¹⁷⁾ W. FLAIG, H. BEUTELSPACHER und H. SÖCHTING, Kalium Symposium 1954, 81 [1955].

¹⁸⁾ R. B. WOODWARD, Nature [London] 162, 155 [1948]; Angew. Chem. 68, 13 [1956]; R. Y. STANIER, J. Bacteriol. 55, 477 [1948]; O. HAYASHI, M. KATAGIRI und S. ROTHEBERG, J. Amer. chem. Soc. 77, 5450 [1955]; W. FLAIG, Holzforschung 9, 1 [1955].

¹⁹⁾ H. DEUEL und P. DUBACH, Helv. chim. Acta 41, 1310 [1958]; H. DEUEL, P. DUBACH und R. BACH, Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 81, 189 [1958].

tifiziert werden. Nach DEUEL und DUBACH¹⁹⁾ könnte es sich dabei um Ketocarbon-säuren, α . β - und β . γ -ungesättigte, heterocyclische und aromatische Hydroxycarbon-säuren handeln. Zahlreiche Verbindungen ohne freie Carboxylgruppen, wie Lactone oder Polycarbonylverbindungen, können ebenfalls leicht CO₂ abspalten²⁰⁾.

INFRAROTSPEKTREN

Die nach verschiedenen Verfahren aus frischem Weizenstroh isolierten Lignine (Björkman-Lignin, Brauns-Lignin, Thioglykolsäurelignin, Schwefelsäurelignin) stimmten in den IR-Spektren weitgehend überein¹⁾. Die geringen Unterschiede dürften vor allem durch Nebenreaktionen bei der Isolierung verursacht sein. Im folgenden werden nur die IR-Spektren der Björkman-Lignine und einiger Huminsäuren im Bereich zwischen 5 und 13.5 μ wiedergegeben.

Björkman-Lignin aus frischem Weizenstroh zeigt im IR-Spektrum (Abbild. 2) im Gegensatz zu den Ligninen aus verschiedenen Holzarten²¹⁾ eine Schulter im Bereich von 1700 bis 1720/cm. D. C. C. SMITH²²⁾ schreibt eine Bande in diesem Bereich (1697/cm) Estergruppierungen zu. In dieser Gegend (1695–1724/cm) liegt jedoch auch die COOH-Absorptionsbande von α -Amidosäuren (*N*-acylierten Aminosäuren)²³⁾. Nach Methylierung des Lignins mit CH₂N₂ trat bei 1740/cm eine neue Bande in Erscheinung, was mit der Veresterung einer Carboxylgruppe erklärt werden kann; dabei stieg der Methoxylgehalt von 16.76% auf 21.76%. Nach der Hydrolyse von Björkman-Lignin aus frischem Stroh mit 6 n HCl konnte bei 1720/cm eine deutliche Bande beobachtet werden. Die bei 1639/cm liegende Bande, die ebenfalls nur bei Weizenstrohlignin festgestellt wird, entspricht nach Untersuchungen an Modellsubstanzen wie Zimtsäure, Cumarsäure und *p*-Methoxy-zimtsäure-methylester vermutlich einer C=C-Doppelbindung, die mit einer C=O-Gruppe konjugiert ist. Diesem Bereich entsprechen jedoch auch C=N-Valenzschwingungen heterocyclischer Aromaten, NH-Deformations-schwingungen von primären und sekundären Aminen und NH₂-Deformationsschwingungen primärer Amide²³⁾. Obwohl der N-Gehalt im Lignin aus frischem Stroh klein ist, müssen auch diese Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Die Banden bei 1042–1030/cm stehen vermutlich im Zusammenhang mit der Bande bei 845/cm, die einem Benzolkern mit zwei benachbarten Wasserstoffatomen zugeordnet wird²³⁾.

Die Spektren der Lignine aus verrottetem Stroh (Abbild. 3) zeigen eine verbreiterte Bande zwischen 1639 und 1600/cm. Diese kann mit dem Einbau von Stickstoff in das Lignin erklärt werden. Die zunehmende Absorption der Bande im Bereich von 1725/cm bei Abbild. 3 ist auf die Zunahme der Carboxylgruppen zurückzuführen.

Die Banden, die dem aromatischen System (1600 und 1500/cm), den CH-Deformations-schwingungen (1460 und 1370/cm), den C—O-Valenz- bzw. OH-Deformationsschwingungen von Phenolen, möglicherweise auch von Hydroxychinonen (1408/cm), sowie den OH-Defor-mationsschwingungen von Alkoholen oder Phenolen, bzw. den C—O-Valenzschwingungen von Aryl- oder Alkylläthern zuzuordnen sind (1266 bis 1124/cm), zeigen mit zunehmender Rottezeit eine Abnahme der Intensität.

²⁰⁾ H. DAHN und H. HAUTH, Helv. chim. Acta **39**, 1366 [1956]; TH. POSTERNAK, R. HUGUENIN und W. ALCALAY, ebenda **39**, 1564 [1956].

²¹⁾ W. J. SCHUBERT und F. F. NORD, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3835 [1950]; S. F. KUDZIN und F. F. NORD, ebenda **73**, 690 [1951]; R. M. DE BAUN und F. F. NORD, ebenda **73**, 1358 [1951]; K. KRATZL und H. TSCHAMLER, Mh. Chem. **83**, 786 [1952].

²²⁾ D. C. C. SMITH, Nature [London] **176**, 267 [1955].

²³⁾ L. J. BELLAMY, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Verlag von Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt 1955.

Die Huminsäuren, die nach 70 Tagen Rottezeit mit 0.5-proz. Natronlauge extrahiert wurden, lassen auch im IR-Spektrum noch deutlich ihre Herkunft aus Lignin erkennen (Abbildung 4). Beim IR-Spektrum der Huminsäuren, die nach 70 Tagen

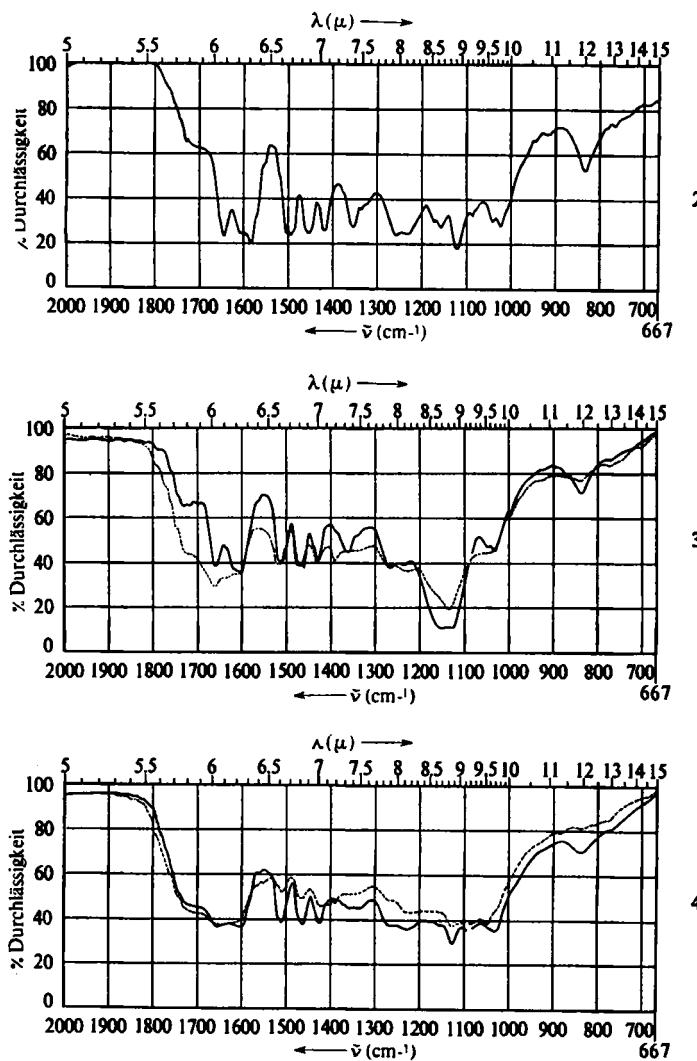


Abbildung 2-4. IR-Spektren
2. Björkman-Lignin aus frischem Stroh

3. Björkman-Lignin aus verrottetem Stroh nach 70 Tagen Rottezeit (—) und 180 Tagen Rottezeit (---)
4. Huminsäuren aus Stroh nach 70 Tagen Rottezeit, extrahiert mit 0.5-proz. Natronlauge (—), extrahiert mit heißem Wasser (---)

Rottezeit mit heißem Wasser extrahiert wurden (Abbildung 4), sind die Banden dagegen weniger zahlreich und weniger deutlich. Im Laufe der weiteren Verrottung treten nur

noch unbedeutende Änderungen auf. Wie die Lignine aus dem während längerer Zeit verrotteten Stroh weisen auch die Huminsäuren eine breite Bande zwischen 1639 und 1600/cm auf. Auch die natürlichen Huminsäuren aus verschiedenen Bodentypen zeigen im IR-Spektrum nur wenige und unscharfe Banden, die zudem nur wenige Unterschiede aufweisen²⁴⁾.

Trotz der Schwierigkeiten der infrarotspektroskopischen Charakterisierung der Huminsäuren läßt der Vergleich der Spektren der Lignine mit denen der Huminsäuren den Schluß zu, daß ein Übergang von Lignin in Huminsäuren stattfindet. Unser Versuch dürfte jedoch nur einen der möglichen Wege zur Bildung von Huminsäuren darstellen.

Einem von uns (Sch.) wurde vom DEUTSCHEN AKADEMISCHEN AUSTAUSCHDIENST und dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN ein Stipendium gewährt, wofür wir herzlich danken.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Verrottung des Strohs: Sommerweizenstroh (Sorte Peko) wurde in Mitscherlich-Gefäßen unter aeroben Bedingungen bei 28° und bei 95.—98% relativer Luftfeuchtigkeit der Rotte unterworfen. Je Mitscherlich-Gefäß wurden 300 g lufttrockenes, gehäckseltes Stroh (3—5 cm Länge) eingewogen und 900 ccm Nährlösung von folgender Zusammensetzung beigegeben: 2.05 g KH₂PO₄, 8.5 g NaNO₃, 0.5 g MgSO₄·7 H₂O, 0.3 g KCl. Mit NaOH wurde der pH-Wert der Nährlösung auf 7.5 gebracht. Das Stroh wurde zusätzlich mit 10 ccm einer Bodensuspension beimpft. Zu deren Herstellung wurde eine bestimmte Menge Komposterde mit Wasser aufgeschlämmt, im Homogenisator fein verteilt und nach 3 Min. Sedimentationszeit beigegeben. Das Sickerwasser wurde in bestimmten Zeitäbständen wieder in die Gefäße zurückgegossen, wobei es mit zunehmender Zersetzung des Strohs meist völlig absorbiert wurde.

Isolierung von Björkman-Lignin: Die Proben wurden zuerst mit einer Condux-Mühle fein gemahlen. Das frische Stroh extrahierte man sodann im Soxhlet mit Äther, die verrotteten Proben 40 Std. mit Äthanol/Benzol (1:1). Das frische Strohmehl extrahierte man außerdem 12 Tage bei Raumtemperatur mit 96-proz. Äthanol (Bestimmung von Nativlignin nach BRAUNS²⁵⁾). In zwei 4-l-Porzellangefäße einer Schwingmühle „Vibratom“ füllte man sodann je 60 g Strohmehl und 250 ccm reinstes Toluol ein, gab eine größere Anzahl Porzellankugeln zu, verschloß die Gefäße gut und schüttelte 65 Std. auf einer Schwingmühle. Aus dem staubfeinen Strohmehl extrahierte man sodann das Lignin 3 Tage mit Dioxan und arbeitete es genau nach den Vorschriften von A. BJÖRKMAN¹⁾ auf. Die verrotteten Proben wurden zum Teil unter schonendem Erwärmen (60—70°) auf dem Wasserbad extrahiert, wobei das Lignin nach unseren Erfahrungen keine nennenswerten Veränderungen erleidet¹⁾. Bezogen auf Schwefelsäurelignin betrug die Ausbeute an Björkman-Lignin:

Nach 0 Tagen Rottezeit:	2.5 %
Nach 70 Tagen Rottezeit:	3.8 %
Nach 180 Tagen Rottezeit:	13.5 %
Nach 410 Tagen Rottezeit:	7.2 %

Wurde das Stroh vor dem Mahlen mit heißem Wasser vorextrahiert, so sank die Ausbeute an Björkman-Lignin auf fast die Hälfte. Die Björkman-Lignine aus verrottetem Stroh konnten

²⁴⁾ M. M. KONONOWA und N. P. BELTSCHIKOWA, Vie Congr. Int. Sci. Sol, Paris, B, 557 [1956]; vgl. M. M. KONONOWA, Die Humusstoffe des Bodens, Berlin 1958.

²⁵⁾ F. E. BRAUNS, J. Amer. chem. Soc. 61, 2120 [1939].

im Gegensatz zu jenen aus frischem Stroh nicht mehr oder nur teilweise in absoluten Äther ausgeflockt werden. Oft blieb dabei eine schmierige Masse zurück. Die eingegangten Dioxanlösungen wurden deshalb nur in Wasser ausgefällt, zentrifugiert, mit Benzol und Petroläther gewaschen und gefriergetrocknet. Die so extrahierten Lignine waren etwas dunkler (orangebraun) als die Björkman-Lignine aus frischem Stroh.

Extraktion der „Huminsäuren“ mit Heißwasser: Die Heißwasserbehandlung bei der Isolierung der Schwefelsäurelignine ergab schwarzbraune Extrakte. Diese säuerte man mit HCl auf p_{H} 1 an, worauf ein voluminöser dunkelbrauner Niederschlag, die „Huminsäuren“, ausfiel. Man zentrifugierte sie ab, wusch mit dest. Wasser und elektrodialysierte, bis keine Cl^- -Ionen mehr nachzuweisen waren. Die dialysierten Proben trocknete man auf dem Wasserbad unter schonendem Erwärmen, wobei man schwarze glänzende Plättchen, ähnlich den aus Boden isolierten Huminsäuren, erhielt. Durch Gefriertrocknung i. Hochvak. erhielt man ein braunes Pulver.

Extraktion der „Huminsäuren“ mit Natronlauge: 18.6 g Stroh, das 70 Tage verrottet war, wurde bei Raumtemperatur 20 Stdn. mit 1 l 0.5-proz. Natronlauge behandelt. Die ungelösten Bestandteile zentrifugierte man ab, säuerte die überstehende Lösung auf p_{H} 1 an, zentrifugierte den ausgefallenen Niederschlag ab, wusch mit dest. Wasser gut und gefriertrocknete. Die Ausbeute an Huminsäuren war ungefähr doppelt so hoch wie bei der Heißwasserextraktion.

Hydrolyse der Lignine und „Huminsäuren“: Die Präparate erhitzte man mit 6 n HCl (20 ccm HCl pro g Trockensubstanz) auf dem Sandbad unter Rückfluß 16 Stdn. auf 116°. Anschließend filtrierte man durch einen Filtertiegel I G 4 und wusch den Rückstand so lange mit dest. Wasser, bis im Waschwasser keine Cl^- -Ionen mehr nachzuweisen waren. Die hydrolysierten Lignine wurden hierauf bei 105° getrocknet. Zur Entfernung der HCl dampfte man die Filtrate dreimal bis fast zur Trockne ein, füllte mit dest. Wasser auf 10 ccm auf und bestimmte nach der titrimetrischen Ninhydrinmethode von D. D. VAN SLYKE, D. A. MAC FADYEN und P. HAMILTON²⁶⁾ den α -Amino-Stickstoff. Die Aminosäuren trennte man mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (70:20:10) nach dem aufsteigenden Verfahren auf Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 b und entwickelte die Chromatogramme mit einer 0.4-proz. Lösung von Ninhydrin in Methanol.

Alkalischmelze der Lignine und „Huminsäuren“²⁷⁾: 30—50 mg hydrolysiertes Material wurden in ein kleines Eisenkölbchen eingesogen und mit 0.7 g fein zerriebener KOH und 0.1 g krist. Natriumacetat gut vermischt. Man erhitzte 7 Min. auf ca. 270°, fing das im Stickstoffstrom übergetriebene Ammoniak in 10 ccm 0.02 n H_2SO_4 auf und titrierte mit 0.02 n NaOH unter Verwendung von Tashiro-Indikator zurück. Nach der Alkalischmelze nahm man die Rückstände mit Wasser auf, säuerte mit 2 n HCl auf p_{H} 4 an, extrahierte mit Äther, engte die Extrakte ein und chromatographierte mit Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser (10:1:1) auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b nach der aufsteigenden Methode. Zur Untersuchung auf Indolverbindungen besprührte man die Chromatogramme mit einer 1-proz. Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in 1 n HCl (Ehrlichs Reagens) und entwickelte die Färbung bei 65°. Die bei den Schwefelsäureligninen und „Huminsäuren“ aus verrottetem Stroh in Erscheinung tretenden blauvioletten Flecken wiesen die R_f -Werte 0.33, 0.41 und 0.91 auf.

Potentiometrische Mikrotitration der Lignine: Die Mikrotitration der Björkman-Lignine in Äthylendiamin mit Na-Colaminat erfolgte nach den Vorschriften von H. BROCKMANN und

²⁶⁾ D. D. VAN SLYKE, D. A. MAC FADYEN und P. HAMILTON, J. biol. Chemistry 141, 671 [1941].

²⁷⁾ Diese Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise von Herrn Dr. T. BREYHAN, Chem. Untersuchungslaboratorium der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, ausgeführt.

E. MEYER¹⁶⁾. Der Titer des Na-Colaminats wurde mit Benzoesäure bestimmt. Die Einwaagen, bez. auf organische Substanz, betrugen 3 mg.

Decarboxylierung der Lignine: Die Björkman-Lignine wurden in 12-proz. Salzsäure 4½ Std. bei 140° Ölbadtemperatur in der von P. DUBACH²⁸⁾ beschriebenen Apparatur decarboxyliert. Das dabei abgespaltene CO₂ fand man in 0.02 n Ba(OH)₂ auf und titrierte das überschüss. Ba(OH)₂ mit 0.1 n HCl gegen Phenolphthalein zurück.

Methylierung der Lignine: Die Präparate wurden in Aceton unter Zusatz einer Spur Wasser gelöst und in der Kälte 12 Std. mit überschüss. Diazomethan behandelt. Die methylierten Lignine waren nahezu farblos.

Aufnahme der IR-Spektren: Die IR-Spektren wurden mit einem vollautomatischen Infrarotspektrographen „Leitz“ aufgenommen. Die Substanzen zermahlte man zuerst fein (zum Teil in Alkoholsuspension), vermischte dann eine bestimmte Menge davon mit KBr (1 mg Substanz auf 400 mg KBr) und preßte sie zu Tabletten.

Die *Mikroanalysen* wurden im Untersuchungslaboratorium der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode, ausgeführt.

Lignin-Modellsubstanzen: Benzoesäure, Vanillin und Zimtsäure waren handelsübliche Präparate p. a.; *p*-Cumarsäure und *p*-Methoxy-zimtsäure-methylester wurden selbst hergestellt und auf ihre Reinheit geprüft.

²⁸⁾ P. DUBACH, Dissertat. Eidg. Techn. Hochschule, Zürich 1958.

BERICHTIGUNG

Jahrg. 91 [1958], S. 2353, Tab. 3:

In Tab. 3 sind die ersten beiden k_1 -Werte ($1.7 \cdot 10^{-2}$ und $4.0 \cdot 10^{-2}$) in „min⁻¹“ statt in „sec⁻¹“ zu verstehen.

S. 2358, Kopf d. Tab. 4, lies:

„ $k_1 \cdot 10^2$ (min⁻¹)“ statt „ $k_1 \cdot 10^2$ (sec⁻¹)“.

E. S. Lewis, H. Suhr

© Verlag Chemie, GmbH. 1959

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Rudolf Criegee, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Wilhelm Merz, München. Verantwortlich für den Anzeigenteil: W. Thieli. Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage), Weinheim/Bergstr., Pappelallee 3 · Fernsprecher Sammelnummer 3635 · Fernschreiber 04 65516 chemieverl wnh. Telegramm-Adresse: Chemieverlag Weinheimbergstr.

Gesetzt aus der Monotype-Times-Schrift; Druck: Buchdruckerei Dr. Alexander Krebs, Weinheim/Bergstr. Printed in Germany. Alle Rechte, auch die der Übersetzung sowie der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photoprint, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. — Preis jährlich DM 190.— zuzügl. Versandgebühren; Einzelheft DM 16.—. Die Bezugabedingungen für die Mitglieder der Gesellschaft Deutscher Chemiker werden auf Anfrage von der Geschäftsstelle, Frankfurt/M., Haus der Chemie, Karlstraße 21, mitgeteilt. — Zahlungen an: Verlag Chemie, GmbH., Weinheim/Bergstr. — Postscheckkonten: Frankfurt a. M. Nr. 145314, Berlin-West Nr. 7430, Wien 108750, Zürich VIII 47055, Stockholm 741 37. Banken: Dresdner Bank AG., Mannheim, P 2, 10/13, Volksbank eGmbH., Deutsche Bank AG., Weinheim/Bergstr. — Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf des Kalenderjahrs. Gerichtsstand und Erfüllungsort: Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.