GÖTTINGER BODENKUNDLICHE BERICHTE

24

B. Hinney

Photochemische Reaktion der 4-Hydroxyzimtsäure

1972

Im Selbstverlag der Anstalten für
Bodenkunde der Universität Göttingen

Herausgeber: B. Meyer und B. Ulrich

Schriftleitung: P. Hugenroth

Bestellungen über:

Institut für Bodenkunde, Göttingen, von Siebold-Str. 4

Institut für Bodenkunde und Waldernährung,
Göttingen, Büsgenweg 2

oder den Buchhandel (Gewährung von Wiederverkäufer-Rabatt)

Selbstkostenpreis **DM**

GÖTTINGER BODENKUNDLICHE BERICHTE

24

B. Hinney

Photochemische Reaktion der 4-Hydroxyzimtsäure

1972

Hinney, B.

Photochemische Reaktionen der 4 - Hydroxyzimtsäure

Göttinger Bodenkundliche Berichte 24, 1 - 122
(1972)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Ligninkonservierung	6
1.2. Tannin-Protein-Komplexe	8
1.3. Huminstoffbildung aus nichtaromatischen Vorstufen	1o
1.4. Huminstoffbildung aus aromatischen Vorstufen	13
1.4.1. Herkunft der Aromaten	13
1.4.1.1. Ligninabbau	13
1.4.1.2. Abbau von Tanninen und flavonoiden Verbindungen	18
1.4.1.3. Aromatensynthese durch Mikroorganismen	2o
1.4.2. Mögliche Reaktionen zum Aufbau polymerer Substanzen aus aromatischen Vorstufen	21
1.4.2.1. Reaktionen ohne Stickstoff	21
1.4.2.2. Reaktionen unter Beteiligung von Stickstoff	26
1.5. Sichtung der Theorien und Problemstellung	29
2. Methoden und Ergebnisse	36
2.1. Analytische Untersuchungen an einem Waldboden	38
2.2. Photochemische Versuche	46
2.3. Mikrobiologische Untersuchungen	77
3. Diskussion der Ergebnisse	82
4. Zusammenfassung	93
5. Beschreibung der Versuche	95
6. Literaturverzeichnis	1o3

1. EINLEITUNG

Gegenüber älteren Auffassungen zur Humusbildung, die mehr vom Abbau der organischen postmortalen Substanz im Boden ausgehen und den Humus als deren unter den jeweiligen Standortbedingungen am schwersten zersetzbaren Anteil betrachten (KUBIENA 1948), scheint sich der Aspekt einer Huminstoffsynthese mehr und mehr durchzusetzen, d.h. die dem Boden eigentümlichen dunkelgefärbten höhermolekularen und im allgemeinen sauren Verbindungen werden als das Produkt bodeneigener, ja bodenspezifischer Synthesevorgänge gedeutet (z. B. SCHEFFER und ULRICH 196o, FLAIG 1966, KONONOVA 1966).

In den letzten Jahren sind Einblicke in die allgemeine Struktur dieser Verbindungen gelungen, aus denen hervorgeht, daß es sich bei ihnen um höchst verwickelt gebaute organische Spezies handelt, in denen die unterschiedlichsten Struktureinheiten in überaus heterogenen Verknüpfungstypen vorliegen (KICKUTH 1959, HURST und BURGES 1967, CHESHIRE et al. 1967). Es darf als geradezu kennzeichnend für diese Verbindungsklasse angesehen werden, daß in ihr kein einheitliches Strukturprinzip verwirklicht ist, wenngleich bestimmte Baugruppen und bestimmte Verknüpfungstypen häufig wiederkehren. Ein irreguläres Strukturmuster dieser Art ist in der gesamten belebten Welt nicht verwirklicht, obwohl sich viele Einzelbezirke als unmittelbare Folge- und Umwandlungsprodukte pflanzlicher und tierischer Inhaltsstoffe erkennen lassen.

Diese Eigentümlichkeiten machen nicht nur die strukturelle Erforschung der Huminstoffe zu dem vielleicht schwierigsten Problem der analytischen Chemie, sondern sie legen es zugleich nahe, die sogenannte biologische Bildung von Huminstoffen im eigentlichen Sinne in Zweifel zu ziehen.

Es wird nämlich in vielen Arbeiten, die sich mit der Chemie und der Bildungsweise von Huminstoffen befassen, ein mehr oder weniger scharfer Unterschied zwischen einer biologischen und einer abiologischen Huminstoffbildung gemacht (z. B. KONONOVA 1968), und es steht auch fest, daß die Degradation der postmortalen organischen Substanz im wesentlichen ein biologischer Vorgang ist und daß somit Geschwindigkeit und Ausmaß der Zersetzungsvorgänge eng mit der biologischen Aktivität des jeweiligen Standortes zusammenhängen; für die eigentliche, sich daran anschließende Synthesefolge, die zum Aufbau von Huminstoffen führt, ist die Beteiligung von biologischen Phasen des Bodens in nennenswertem Umfang jedoch durchaus zu bezweifeln, und man kennt keinen wie immer gearteten organisierten Enzymapparat, der in der Lage wäre, ein derartiges Struktur- und Verknüpfungsmuster herzustellen.

Dabei besagt der Ausdruck "organisiert", daß hier an voll integrierte und regulierte Systeme innerhalb einer lebenden Zelle gedacht ist. Daß außerhalb der zellulären Regulation befindliche Enzyme (Exoenzyme oder nach Beschädigung oder Mikrolyse austretende oder desintegrierte Enzyme) solche Reaktionen an komplexen Substraten durchführen können, ist mehrfach bewiesen worden (z. B. BEHR 193o, BOSE und SARKAR 1937, KÜSTER 1952, FELBECK 1971), sollte aber von biochemischen Reaktionen im engeren Sinne aus guten Gründen unterschieden werden.

Man darf vielleicht geradezu sagen, daß sich in diesen Mustern das Wesen postbiologischer oder abiologischer Prozesse charakteristisch offenbart.

Es gibt indes einige Stoffe im Tier- und Pflanzenreich, die sich durch bemerkenswerte Strukturanalogien zu den Huminstoffen auszeichnen. Sie haben von jeher das besondere Interesse der Huminstoff-Forscher gefunden. Da es sich bei ihnen zweifellos um Bildungen der belebten Natur handelt, hat ihre Existenz nicht wenig zum Postulat einer "biologischen Humifizierung" beigetragen. Es fällt jedoch auf, daß es sich im allgemeinen bei diesen Verbindungen

gewissermaßen um "umweltorientierte Bildungen" handelt, die offensichtlich in der Auseinandersetzung mit permanenten oder transitorischen Belastungen und Noxen im Verlaufe der Evolution entwickelt wurden.

So finden wir auffällige Parallelen zur Struktur von Huminstoffen bei den nach Verletzung und Infektion von Pflanzenteilen entstehenden dunkelgefärbten Polyphenolpolymerisaten ebenso wie bei den melanoiden Pigmenten in Haaren und Haut; überraschenderweise auch bei den Ligninen, die sich jedoch ebenfalls als spezielle Stoffwechselprodukte zur Kompensation von Gravitation und lateraler mechanischer Belastung auffassen lassen.

Die große Ähnlichkeit, die sich zwischen der Struktur von Ligninen und strukturellen Bezirken von Huminstoffen ergab, und die Tatsache, daß mit dem absterbenden pflanzlichen Material große Mengen von Ligninen in den Boden gelangen, hat dazu geführt, mögliche Übergänge aus einer Ligninstruktur in Huminstoffstrukturen besonders intensiv zu untersuchen. Wenn auch, wie oben dargelegt, die unterschiedlichsten Strukturen im Huminstoffmolekül verankert sind (Aminosäuren, Kohlenhydrate, organische Säuren etc.), so scheinen doch hydroxylfunktionelle aromatische Kerne die essentiellen Bausteine sowohl von Huminstoffen als auch von Ligninen zu sein (z. B. HURST und BURGES 1967, MANSKAYA und KODINA 1968, FREUDENBERG 1968).

So gesehen lassen sich natürlich auch andere Inhaltsstoffe aus Pflanzen und Tieren, in denen phenolische Baueinheiten vorkommen, als direkte Ausgangssubstanzen für die Huminstoffsynthese auffassen. Es ist daher verständlich, daß die meisten theoretischen Studien und praktischen Untersuchungen zur Huminstoffbildung von präformierten Phenolkörpern ausgehen. Wie aus der Tabelle 1 über die wichtigsten bisher studierten und vorgeschlagenen Reaktionen zur Huminstoffbildung hervorgeht, wurden auch einige an-

dere Bildungsweisen diskutiert, von denen nicht mit Sicherheit zu sagen ist, ob auch sie nicht beim Aufbau von Huminstoffen eine Rolle spielen.

Die der Arbeit zugrunde liegende Problemstellung läßt sich aus dem Stand der bisherigen Untersuchungen zum Thema "Organische Substanz der Böden und Huminstoffbildung" ableiten. Die wichtigsten Ergebnisse der Huminstoff-Forschung und die heute allgemeiner diskutierten und im Vordergrund des Interesses stehenden Theorien zur Huminstoffbildung sollen deshalb zunächst dargestellt werden; dabei werden allerdings nicht alle in der Tabelle 1 erwähnten Reaktionen im Text behandelt.

Tab. 1: Ausgangsmaterial für Huminstoffsynthesen

	PROTEINE	AMINOSÄUREN	AMMONIAK	NITRIT	OHNE N
LIGNINE	DEHERAIN 1888 WAKSMAN u. JYER 1932		MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943	BREMNER 1955 STEVENSON et al. 197o	FISCHER u. SCHRADER 1921
TANNINE	COULSON et al. 196o HANDLEY 1961		MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943		
FLAVONE (A-RING)		STEIN u. TENDELOO 1959	MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943	STEVENSON et al. 197o	HATHWAY 1958
PHENYL-PROPAN-DERIVATE			MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943	STEVENSON et al. 197o	ERDTMANN 1933 FREUDENBERG 1968* LIM 1965
1,2- U. 1,4-FUNKTIONELLE AROMATEN	FLAIG 1966 BREMNER 1967 BRUNET 1967*	FLAIG 1966 BREMNER 1967	MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943 LINDBECK u. YOUNG 1965	STEVENSON et al. 197o	ERDTMANN 1934 SCHEFFER et al. 1958 FLAIG 1966
NICHTAROMATISCHE STRUKTUREN		ENDERS 1942,1	MATTSON u. KOUTLER-ANDERSON 1943 TRIPETT et al. 196o		MARCUSSON 1925 ENDERS 1942,1
OHNE BETEILIGUNG ANDERER STRUKTUREN		EVANS u. RAPER 1937* BUTENANDT 1957*			

*Nicht unter dem Aspekt der Huminstoffbildung untersucht.

1.1. Ligninkonservierung

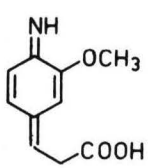
Eine Entstehung der Huminstoffe durch geringfügige chemische Umwandlung der Lignine vermuten FISCHER und SCHRADER (1921) u.a. deshalb, weil sich die Lignine wegen ihrer schweren Zersetzbarkeit im Boden relativ anreichern müßten. In Huminstoffen soll danach die gleiche Grundkonstitution vorliegen wie in Ligninen.

Von einem Zusammenwirken der Lignine und Proteine bei der Huminstoffbildung gehen andere Arbeiten aus:

DEHERAIN (1888) betrachtet den Humus als eine Mischung aus pflanzlichen Ligninen und Proteinen mikrobieller Herkunft. WAKSMAN und IYER (1932) stellen Lignin-Protein-Komplexe aus verschiedenen Ligninen, Casein, Gliadin und Ei-Albuminen her.

Die Bildung dieser Komplexe erhöhte die Basenaustauschkapazität des Materials und die Resistenz der Proteine gegenüber mikrobiellem Angriff. Es erwies sich, daß diese Hemmung nicht auf toxische Eigenschaften der Lignine zurückzuführen war, sondern daß sie auf der Wechselwirkung der Lignine mit den Proteinen beruhte. Die Art der Wechselwirkung konnte nicht geklärt werden.

MATTSON und KOUTLER-ANDERSON (1943) stellen andererseits fest, daß Lignine im Boden einer raschen Oxydation unterliegen und daß sie dabei Ammoniak und möglicherweise auch andere Proteinabbauprodukte wie z. B. aromatische Amine in einer nicht austauschbaren Form fixieren. Die Verfasser finden Beziehungen sowohl zwischen dem Stickstoff- und dem Carboxylgehalt verschiedener Streu- und Humusarten als auch zwischen dem Gehalt an mehrwertigen Phenolen und der Fähigkeit zur Ammoniumfixierung. Daher halten sie Chinonimid-Carbonsäuren für Zwischenstufen der Huminstoffbildung:



Reaktionsprodukte aus Ligninen und Ammoniak erwiesen sich chemischen Angriffen gegenüber als sehr stabil. Das führte zu der Annahme, daß im sogenannten "Humus-Kern" derartige Bausteine vorliegen.

Bestätigen konnte BENNET (1949) die Ergebnisse von MATTSON und KOUTLER-ANDERSON. Er fand, daß Oxydation und N-Fixierung an den phenolischen Hydroxylgruppen der Lignine stattfinden.

LAATSCH und SCHLICHTING (1953) überprüften die Resistenz verschiedener Lignoproteine gegenüber saurer Hydrolyse, während BREMNER und SHAW (1957), LYNCH und LYNCH (1958) und ESTERMANN et al. (1959)deren Beständigkeit gegenüber mikrobiellem bzw. enzymatischem Zersatz untersuchten; die Ergebnisse waren z. T. widersprüchlich.

Parallel zu diesen Untersuchungen bemühte man sich darum, derartige Lignin-Protein- und Lignin-Ammonium-Komplexe aus Böden und sich zersetzendem Pflanzenmaterial zu isolieren. So extrahierten SOWDEN und ATKINSON (1949) ein Material aus Bodenhumusfraktionen, das zwar Ähnlichkeit mit Pflanzenligninen aufwies, andererseits aber charakteristische Unterschiede erkennen ließ; so war z.B. der Methoxylgehalt geringer, der Stickstoffgehalt höher als bei natürlichen Ligninen. Die Verfasser kamen zu dem Schluß, daß es sich bei den erhaltenen Substanzen nicht um einfache Lignoproteine handeln könne.

Andererseits konnten ZIN (1955) und JENKINSON und TINSLEY (1959) sowohl aus Mineralböden als auch aus Kompost mit einer modifizierten SEVAG-Technik grenzflächenadsorbiertes Material erhalten, das als Lignoprotein zu bezeichnen war. Bis zu 7o % des darin enthaltenen Stickstoffs wurde als α-Aminostickstoff bestimmt. Der Methoxylgruppengehalt des Materials aus Mineralböden war allerdings niedriger als der des Materials aus dem Kompost. Aus Mineralböden konnten 4 - 1o % des durch Extraktion mit wässrigen Lösungen von Natriumsulfit und Pyrophosphat gewonnenen organischen Materials mit dieser Methode abgetrennt werden; größere Mengen erhielten die Autoren aus Kompost.

Eine dritte Möglichkeit der direkten Reaktion von Ligninen mit Stickstoff untersuchen vor allem BREMNER u. Mitarbeiter (BREMNER 1955, BREMNER und SHAW 1957, FÜHR u.BREMNER 1964 und STEVENSON et al. 197o). Sie stellen fest, daß Salpetersäure und salpetrige Säure mit Ligninen reagieren und daß durch diese Reaktion der Stickstoffgehalt der Lignine zunimmt. Der so "fixierte" Stickstoff ist bemerkenswert stabil gegenüber saurer und alkalischer Hydrolyse; er scheint vornehmlich in Form von Nitrosogruppen vorzuliegen.

Die Reaktion führt darüber hinaus zu einem auffallenden Verlust an Methoxylgruppen in den Ligninen. Allerdings sind diese Produkte weniger resistent gegen mikrobiellen Zersatz als Lignin-Protein- und Lignin-Ammonium-Komplexe.

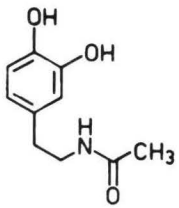
1.2. Tannin-Protein-Komplexe

In Analogie zur Ledergerbung vermutet man, daß auch im Boden Proteine durch ähnliche Reaktionen stabilisiert werden können (COULSON et al. 196o).

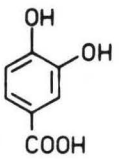
Für die Lederherstellung erwiesen sich Tannine mit Molekulargewichten zwischen 5oo und 3.ooo und einer großen Zahl von phenolischen Hydroxylgruppen als am wirksamsten (WHITE 1957). LAATSCH und SCHLICHTING (1953) stellten zwar fest, daß Komplexe aus Tanninen und Gelatine keine verstärkte Resistenz gegenüber hydrolytischer Spaltung zeigen; sie vermuteten jedoch eine erhöhte Stabilität im Hinblick auf den biologischen Abbau. HANDLEY (1961) benutzte die von Birkenkeimlingen aus Tannin-Protein-Komplexen aufgenommene Stickstoffmenge als Maß für die Stabilität dieser Komplexe. Es erwiesen sich die Komplexe, die unter Beteiligung von Tanninen aus Rohhumus-bildenden Pflanzen (Calluna vulgaris) entstanden waren, als besonders resistent.

Tannine aus verschiedenen Pflanzen verglichen DAVIES et al. (1964) in ihrer Wirkung auf Gelatine unter Berücksichtigung unterschiedlicher pH-Werte. Es zeigte sich, daß die in Bezug auf mikrobiellen Angriff stabilsten Verbindungen bei den niedrigsten bodenüblichen pH-Werten gebildet werden.

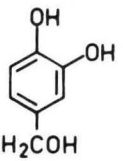
Eine interessante Parallele zu diesen Komplexen zeigt das Material der Insektenpanzer (Sclerotine) und verschiedener Kapselsubstanzen im Insektenreich (BRUNET 1967). Diese Strukturen bestehen aus Proteinen, die durch "Insektengerbstoffe" vernetzt sind. Dazu scheint vor allem Acetyldopamin zu gehören. 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzylalkohol bewirken die Vernetzung der Proteine in Kakerlaken-Eikapseln; der Kokon des Seidenspinners wird durch 2-Amino-3-hydroxybenzoesäure stabilisiert.



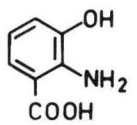
Acetyldopamin



3,4-Dihydroxybenzoesäure

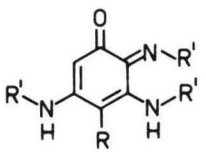


3,4-Dihydroxybenzylalkohol



2-Amino-3-hydroxybenzoesäure

Der Mechanismus der Vernetzung ist noch nicht völlig geklärt. Aus entsprechenden Versuchen geht jedoch hervor, daß die Phenole zu 1,2-Chinonen oxydiert werden und sich daraufhin mit den freien Aminogruppen der verschiedenen Proteine verbinden:



R = „Gerbstoff"-Rest
R' = Protein-Rest

Die bisher beschriebenen Humifizierungskonzepte besagen, daß durch Reaktionen N-freier Inhaltsstoffe aus Pflanzen und Tieren mit N-haltigen Substanzen Komplexe entstehen, die relativ stabil gegen mikrobiellen Abbau sind und daher gegenüber anderen, leichter zersetzlichen Produkten im Boden angereichert werden. Damit ist eine Anreicherung wenig veränderter postmortaler Substanz im Sinne KUBIENAS (s.o.) durchaus gegeben.

Zweifellos haben diese Vorgänge im Boden eine gewisse Bedeutung; besonders dort, wo die mikrobielle Zersetzung der Pflanzensubstanz durch ungünstige Verhältnisse gehemmt ist, z.B. an Moorstandorten.

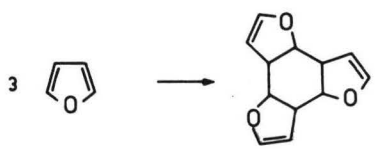
Andererseits ist es aber offensichtlich nicht möglich, die Huminstoffe allein als konservierte und relativ geringfügig veränderte postmortale Substanz zu betrachten. Zahlrei-

che Untersuchungen zeigen, daß die Hauptmasse der Huminstoffe des Bodens gegenüber den Ausgangsprodukten vielfältig verändert ist und daß deshalb weitere Möglichkeiten, insbesondere Synthesereaktionen, für ihren Aufbau und ihre Bildung in Betracht gezogen werden müssen.

1.3. Huminstoffbildung aus nichtaromatischen Vorstufen

Im gleichen Zeitraum, in dem die vorgenannten Theorien entwickelt werden, findet man auch Hinweise darauf, daß Huminstoffe aus Kohlenhydraten und aus niedrigmolekularen Abbauprodukten der unterschiedlichsten Herkunft durch bodeneigene Synthesen gebildet werden können.

So nimmt MARCUSSON (1925) an, daß Huminstoffe im wesentlichen aus polymerisierten Furankörpern bestehen, die ihrerseits aus Kohlenhydraten entstanden sein sollen:

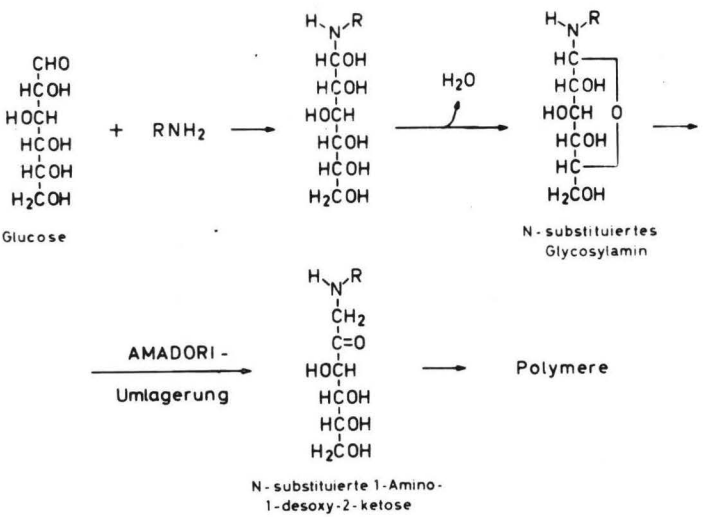


Kritiker dieser Theorie bezweifeln jedoch, daß Vorgänge dieser Art bei bodenüblichen Temperaturen und pH-Werten ablaufen können, und wenden sich deshalb Reaktionen zu, die nach ihrer Ansicht unter natürlichen Bedingungen mit relativ großer Geschwindigkeit im Sinne einer Huminstoffbildung verlaufen könnten. Unter diesem Aspekt untersucht vor allem ENDERS die sogenannte Melanoidin-Bildung.

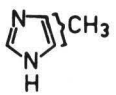
Melanoidine entstehen unter bodenüblichen Bedingungen aus Carbonyl- und primären Aminoverbindungen. Wie ENDERS (1942, 1) zeigen konnte, hat dabei die Art der Aminoverbindung keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, wesentlich ist jedoch die Struktur der Carbonylverbindung. Die schnellste Melanoidinbildung wurde mit Methylglyoxal (CH_3COCHO)

und Glycerinaldehyd beobachtet, es folgten Xylose, Arabirose, Mannose, Galactose, Fructose, Glucose und schließlich Disaccharide. Da ENDERS und SIGURDSSON (1948) in unterschiedlich stark humifiziertem Material Methylglyoxal nachweisen konnten, nahmen sie an, daß zumindest ein Teil der Huminstoffe auf diesem Wege gebildet wird. Die Methylglyoxalbildung wurde z.T. abiologisch als Gleichgewichtsreaktion der Zucker formuliert (ENDERS 1942,2), z.T. aber auch durch Katalyse von Enzymsystemen autolysierter Zellen erklärt (ENDERS 1943). Aus der Tatsache, daß die Melanoidinbildung unter bodenüblichen Bedingungen nur bei Beteiligung von Aminoverbindungen mit genügender Geschwindigkeit erfolgt, ohne Aminoverbindungen jedoch nur bei erhöhten Temperaturen oder hohen Drücken, schließt ENDERS (1942,1), daß damit der relativ hohe Stickstoffgehalt der Bodenhuminstoffe und der im Vergleich dazu geringe Stickstoffgehalt der unter geologischen Bedingungen entstandenen Materialien (z.B. Braunkohlen) hinreichend erklärt werden kann.

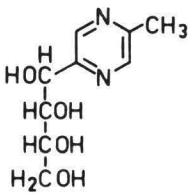
Da derartige Vorgänge auch für die Lagerung von Nahrungsmitteln von Bedeutung sind, wurden sie von verschiedenen Autoren eingehend untersucht. HODGE (1955), ELLIS u. HONEYMAN (1955) und ELLIS (1959) stellten fest, daß Bräunungsreaktionen über die Bildung N-substituierter Glycosylamine verlaufen, aus denen dann durch eine AMADORI-Umlagerung polymerisationsfähige Strukturen entstehen:



Als Reaktionsprodukte von Glucose und Ammoniak konnten HOUGH et al. (1952) gefärbte Produkte nachweisen, die Imidazole und Pyrazine, z.B. 4(5)-Methylglyoxalin und 2-Methyl-5-tetrahydroxybutylpyrazin enthielten.

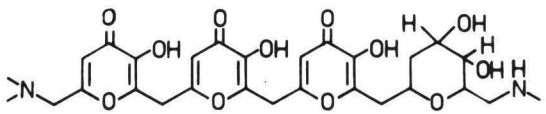


4(5)-Methylglyoxalin

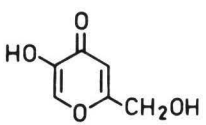


2-Methyl-5-tetrahydroxy-butylpyrazin

Eine interessante Auffassung zur Bildung und Struktur von Humusstoffen vertritt FELBECK (1965): Durch Hochdruck-Hydrogenolyse werden aus der nichthydrolysablen organischen Substanz von "muck soils" Verbindungen erhalten, die auf folgende Struktureinheiten hinweisen:



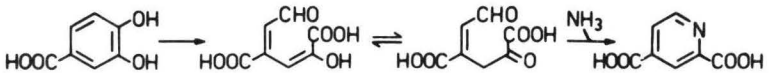
Bei den endständigen Gruppen soll es sich um Aminosäuren handeln. Ein derartiges Skelett kann durch α,α-Kondensation von γ-Pyronen entstehen; u.a. aus Kojisäure, die z.B. durch Aspergillus oryzae aus Kohlenhydraten gebildet wird.



Kojisäure

Eine Reaktion, die u.U. für die Stickstoffixierung der organischen Substanz des Bodens von Bedeutung sein kann, ist die Bildung von Pyridinderivaten aus mikrobiellen Spaltprodukten verschiedener 1,2-Dihydroxybenzolderivatein An-

wesenheit von Ammoniak. So entsteht z.B. aus γ-Carboxy-α-hydroxymuconsäuresemialdehyd, dem Spaltprodukt der 3,4-Dihydroxbenzoesäure, Pyridin-2,4-dicarbonsäure (TRIPETT et al. 196o):



3,4-Dihydroxy-benzoesäure — γ-Carboxy-α-hydroxymucon-säuresemialdehyd — Pyridin-2,4-di-carbonsäure

1.4. Huminstoffbildung aus aromatischen Vorstufen

Ein Konzept zur Huminstoffbildung, welches in neuerer Zeit die größte Beachtung findet, geht von der Annahme aus, daß niedermolekulare Aromaten unterschiedlicher Herkunft, z.T. unter Beteiligung nichtaromatischer Substanzen, durch Polymerisationsreaktionen zu hochmolekularen, bodeneigenen Strukturen umgeformt werden. Als Ausgangsprodukte kommen Abbauprodukte höhermolekularer aromatischer Verbindungen (Lignine, Tannine, Flavone etc.), Wurzel- und Blattexudate und Syntheseprodukte der Bodenmikroorganismen in Betracht.

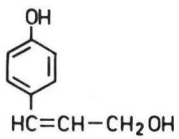
Die Synthesen können sowohl in lebenden und toten Zellen als auch extrazellulär, an Oberflächen und in der Bodenlösung stattfinden.

1.4.1. Herkunft der Aromaten

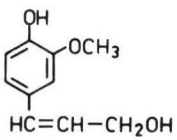
1.4.1.1. Ligninabbau

Lignine werden als Polymerisationsprodukte dehydrierter Phenylpropylalkohole angesehen (FREUDENBERG 1968). Offenbar sind drei Substitutionsmuster in unterschiedlichem

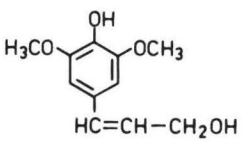
Verhältnis am Aufbau der Lignine beteiligt, es sind dies der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propen(2)ol(1) (Cumaryl-Typ), der 3-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-propen(2)ol(1) (Coniferyl-Typ) und der 3-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-propen(2)-ol(1) (Syringyl-Typ).



3-(4-Hydroxyphenyl)-propen(2)ol(1)

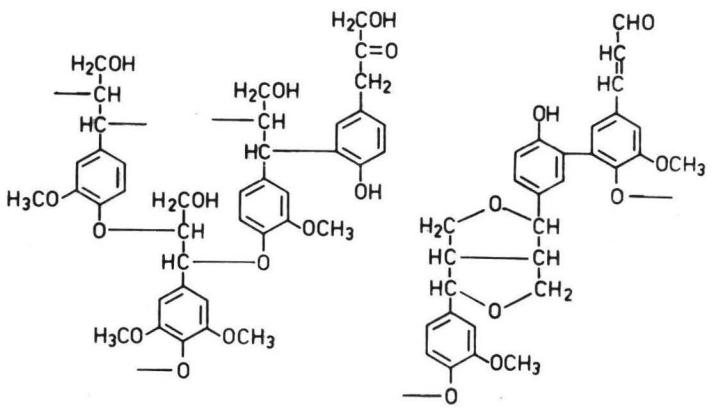


3-(3-Methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propen(2)ol(1)



3-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-phenyl)-propen(2)ol(1)

Es ist anzunehmen, daß diese Bausteine etwa in folgender Weise vernetzt sind (nach FREUDENBERG 1968):



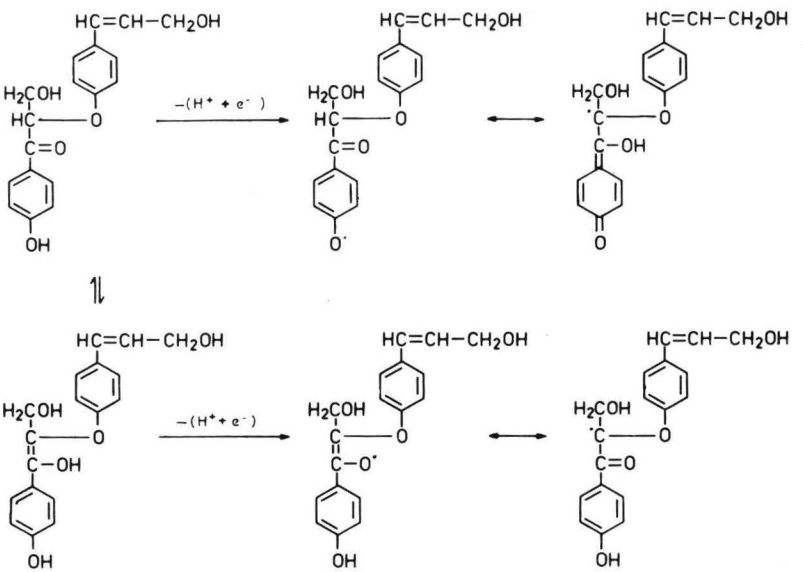
Die Lignine verschiedener Pflanzenarten unterscheiden sich hinsichtlich des Verhältnisses der beteiligten Alkohole: Koniferenlignine bestehen zum überwiegenden Teil aus Einheiten des Coniferyl-Typs, während Cumaryl- und Syringyleinheiten nur geringfügig beteiligt sind. Laubholzlignine sind dagegen zu etwa gleichen Teilen aus Coniferyl- und Syringyleinheiten aufgebaut, und in Gramineenligninen sind alle drei Alkohole nahezu gleichmäßig vertreten.
Zum Ligninabbau sind viele Basidiomyceten, Ascomyceten und Bakterien befähigt. Am besten untersucht ist bisher der Abbau der Holzlignine durch bestimmte Basidiomyceten; die so-

genannten Weißfäulepilze. Diese zersetzen zunächst vornehmlich Lignine und lassen die weiße Zellulose zurück.

Da die großen Ligninmoleküle nicht ohne weiteres von den Zellen aufgenommen werden können, ist anzunehmen, daß der erste Angriff durch Exoenzyme erfolgt, die in der Lage sind, die Vernetzung der Phenylpropaneinheiten zu lösen. Nach Schätzungen von ADLER (1961) handelt es sich dabei zu über einem Drittel um Ätherbindungen und zu etwa zwei Dritteln um C-C-Verknüpfungen.

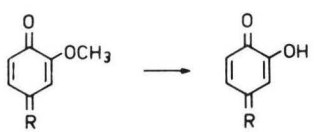
Auf der Suche nach den wirksamen Exoenzymen fand man bei über 96 % der ligninabbauenden Pilze eine positive (BAVENDAMM-)Reaktion auf Phenoloxydasen (BAVENDAMM 1928, DAVIDSON et al. 1938, HIGUCHI 1954). Es lag nahe, extrazellulär verlaufende Spaltungen auf die Wirkungen dieser Enzyme zurückzuführen.

So könnten z.B. Ketone des folgenden Typs durch Phenoloxydasen sowohl an der Phenolgruppe als auch an der enolisierten Seitenkette oxydiert werden. Anschließende Enolisierung und Disproportionierung würde zur Oxydation der β-C-Atome führen und damit eventuell die Spaltung der Ätherbindung einleiten (HARKIN 1967):

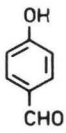


Andererseits ist jedoch in Modellreaktionen gefunden worden (BROWN und BOCKS 1963, FREUDENBERG 1968), daß Phenoloxydasen eher zur Polymerisation niedermolekularer Phenole führen und es somit fraglich ist, ob sie tatsächlich eine wesentliche Rolle beim Ligninabbau spielen. Nach Ansicht von LYR (1962) werden sie u.U. nur ausgeschieden, um im Holz vorkommende, fungizid wirkende niedrigmolekulare Phenole zu entgiften. Auf der gleichen Ebene liegt die Beobachtung von MALMSTRÖM et al. (1958). Danach werden Phenoloxydasen von Polystictus versicolor erst dann exkretiert, wenn dem Nährmedium die Substanzen für den BAVENDAMM-Test zugesetzt werden. Es ist daher nicht sicher, daß sie auch während des Ligninabbaues ausgeschieden werden.

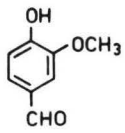
Um so größere Aufmerksamkeit verdienen daher die von FUKUZUMI und SHIBAMOTO (1965) und ISHIKAWA und OTI (1966) publizierten Hinweise für die Ausscheidung von Ätherasen durch ligninabbauende Pilze. Unspezifische Enzyme dieses Typs wären nicht nur in der Lage, die Spaltung der Seitenkettenäther durchzuführen, sie könnten u.U. auch Methyläther spalten und damit den beobachteten Verlust an Methoxylgruppen beim Ligninabbau bewirken. Andererseits kann dieser Vorgang auch durch Phenoloxydasen eingeleitet werden: In oxydativ gebildeten Diphenochinonen, Oxepinen und Phenoxazonen liegt die Methylgruppe als leicht säurespaltbarer Vinyläther vor (HARKIN 1967):



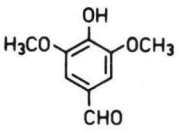
Als Spaltprodukte des biologischen Ligninabbaus konnten bisher die folgenden phenolischen Verbindungen isoliert werden (HAIDER et al. 1964, HURST und BURGES 1967):



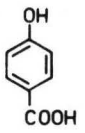
4-Hydroxy-benzaldehyd



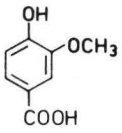
3-Methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd



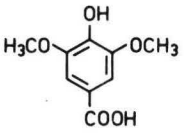
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-benzaldehyd



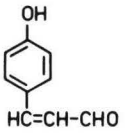
4-Hydroxy-benzoesäure



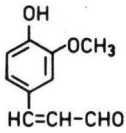
3-Methoxy-4-hydroxy-benzoesäure



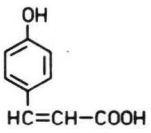
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-benzoesäure



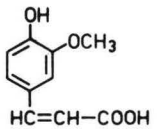
4-Hydroxy-zimtaldehyd



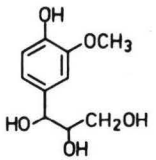
3-Methoxy-4-hydroxy-zimtaldehyd



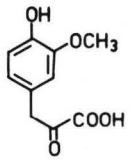
4-Hydroxy-zimtsäure



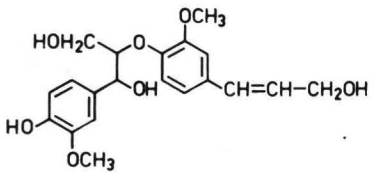
3-Methoxy-4-hydroxy-zimtsäure



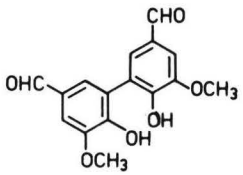
3-(3-Methoxy-4-hydroxy-benzyl)-glycerin



3-(3-Methoxy-4-hydroxy-benzyl)-brenztraubensäure



Guajacylglycerin-ß-coniferyläther



5,5'-Diformyl-3,3'-dimethoxy-2,2'-dihydroxy-diphenyl (Dehydrodivanillin)

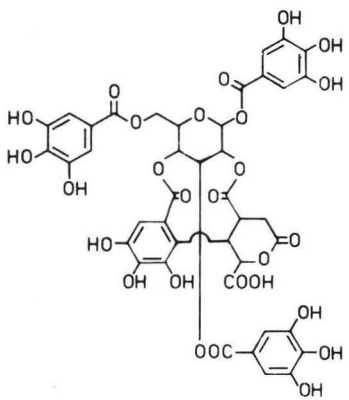
Ob das dargestellte Dehydrodivanillin als natives Ligninabbauprodukt anzusehen ist, muß nach Ansicht von HURST und BURGES (1967) bezweifelt werden, da ISHIKAWA et al. (1963) feststellten, daß die Bildung dieses Dimeren als oxydative Synthese während des pilzlichen Ligninabbaues erfolgt.

Die Art der identifizierten Ligninabbauprodukte deutet darauf hin, daß der Abbau tatsächlich in der beschriebenen Weise zunächst zu Phenylpropaneinheiten führt, die dann weiter abgebaut werden. Der Abbau der C_3-Seitenkette verschiedener Phenylpropanderivate wurde in gesonderten Untersuchungen studiert (ISHIKAWA et al. 1963, HALVORSON 1961, TOWERS 1969).

1.4.1.2. Abbau von Tanninen und flavonoiden Verbindungen

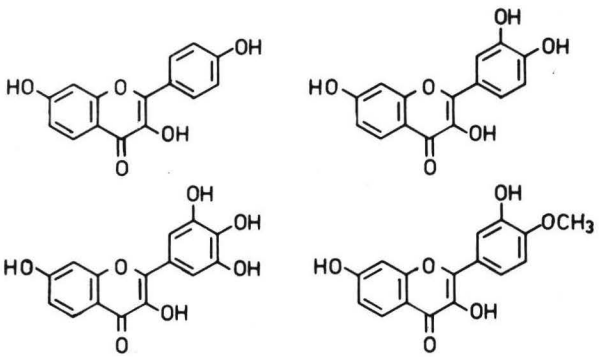
Tannine sind keine einheitlichen Substanzen. Eine Einteilung wird nach ihrer Herkunft vorgenommen. Davon abgesehen, können sie unter chemischen Gesichtspunkten nur in hydrolysierbare und kondensierte Tannine eingeteilt werden (FREUDENBERG 192o). Diese Gliederung beruht darauf, daß eine saure oder alkalische Hydrolyse oder die Einwirkung von Enzymen (Tannasen) die hydrolysierbaren Tannine in Zucker und phenolische Carbonsäuren spaltet, während kondensierte Tannine auf diese Weise nicht gespalten werden können und auch keine Zucker enthalten.

Im Myrobalanextrakt (Extrakt aus getrockneten Früchten von Terminalia chebula) finden sich hydrolysierbare Tannine; die Struktur der Chebulasäure ist nachstehend angegeben:

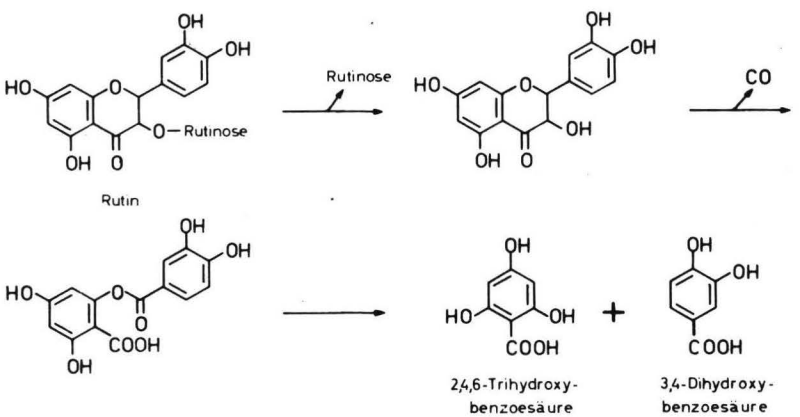


Chebulasäure

Als Spaltstücke der kondensierten Tannine, z.B. aus dem Quebrachoextrakt, dem Extrakt des Hartholzes von Schinopsis lorentzii, können vornehmlich flavonoide Verbindungen isoliert werden, und es wird angenommen, daß kondensierte Tannine Dimere, Trimere und Tetramere dieser Verbindungen sind (WHITE 1957):



Als Beispiel für den mikrobiellen Abbau flavonoider Verbindungen soll der Abbau des Rutins durch Aspergillus flavus dargestellt werden (TOWERS 1964):



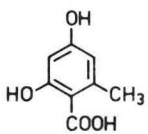
Ebenso wie beim mikrobiellen Abbau der Lignine treten auch hier einfache Phenolcarbonsäuren als Metabolite auf.

In diesem Zusammenhang muß jedoch betont werden, daß der Abbau zu einfachen aromatischen Verbindungen keineswegs eine Endstufe darstellt; zahlreiche Bodenmikroorganismen sind ohne weiteres in der Lage, den Benzolkern zu spalten und ihn als einzige C-Quelle zu nutzen (Literaturübersicht bei DAGLEY 1967).

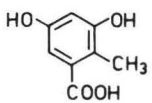
1.4.1.3. Aromatensynthese durch Mikroorganismen

Sehr viele Mikroorganismen, sowohl Pilze als auch Actinomyceten und Bakterien, bilden aus nichtaromatischen Vorstufen aromatische Verbindungen und exkretieren sie.

KONONOVA und ALEKSANDROVA (1956, 1958) und ALEKSANDROVA (1962) lassen Aspergillus niger, Penicillium und Actinomyces globisporus roseus auf Zucker als einziger C-Quelle wachsen. In der Kulturlösung können anschließend 1,2-Dihydroxybenzol und 3,4-Dihydroxybenzoesäure nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse beschreiben HAIDER und MARTIN (1967). Der Pilz Epicoccum nigrum bildet 2-Methyl-4,6-dihydroxybenzoesäure und 2-Methyl-3,5-dihydroxybenzoesäure, wenn er allein auf Glucose und Asparaginsäure wächst. Diese primären Aromaten können dann mikrobiell in etwa zwanzig weitere Phenole überführt werden.



2-Methyl-4,6-dihydroxybenzoesäure



2-Methyl-3,5-dihydroxybenzoesäure

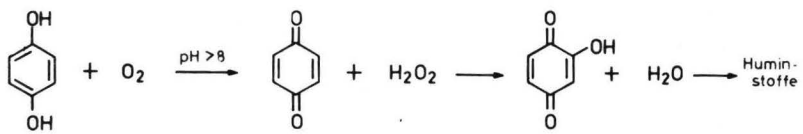
HENNEQUIN und BLACHERE (1966) untersuchen die Phenolbildung an zwanzig Stämmen von Azotobacter chroococcum und A. vinelandii, sowie Alcaligenes sp., Arthrobacter sp. und an acht Stämmen aus der Weizenrhizosphäre. Sämtliche Stämme sind zur Bildung von Phenolen befähigt.

1.4.2. Mögliche Reaktionen zum Aufbau polymerer Substanzen aus aromatischen Vorstufen

1.4.2.1. Reaktionen ohne Stickstoff

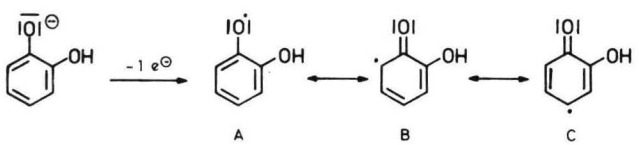
Ihren vielfältigen Bildungsmöglichkeiten im Boden entsprechend wurden Modellreaktionen zur Bildung von Huminstoffen vor allem mit reaktionsfähigen mehrwertigen Phenolen durchgeführt (z.B. ELLER 1921, ERDTMANN 1934, JAMES und WEISSBERGER 1938, WELTE et al. 1954, FLAIG et al. 1955, SCHEFFER et al. 1958).

Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß vor allem solche Phenole, die in der Lage sind, in Chinone überzugehen - also z. B. 1,2- und 1,4-Dihydroxybenzole - zur oxydativen Polymerisation neigen. Es wird daher vermutet, daß die Polymerisation eine Oxydation zu Chinonen voraussetzt, wie es z.B. in dem Schema nach ELLER (1921) zum Ausdruck kommt:



Andere Autoren halten die Chinonbildung für eine Nebenreaktion und betrachten semichinoide Radikale als Zwischenstufen (SCHEFFER et al. 1958, KICKUTH 1959):

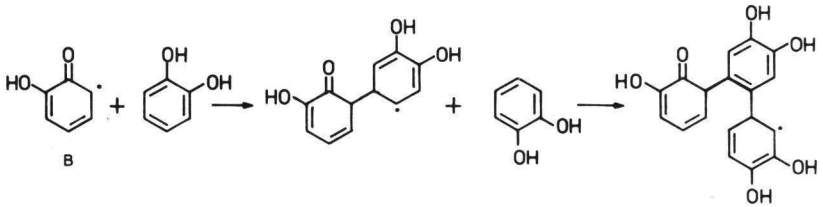
Das Phenoxyradikal steht in mesomerer Beziehung zu verschiedenen möglichen C-Radikalen:



Die einzelnen Radikale können nun sowohl miteinander als auch mit unveränderten Phenolen reagieren. Im erstgenannten Fall kommt die Reaktion zum Stillstand, d.h. es entstehen Tetrahydroxydiphenyle, die erst durch erneute Oxydation

oder durch Reaktion mit einem anderen Radikal in weitere Polymerisationsreaktionen einbezogen werden können.

Reagiert jedoch ein Radikal mit einem unveränderten Phenol, so entsteht ein Zweikernradikal, welches wieder in der gleichen Weise mit einem weiteren Phenol reagieren kann usw.:

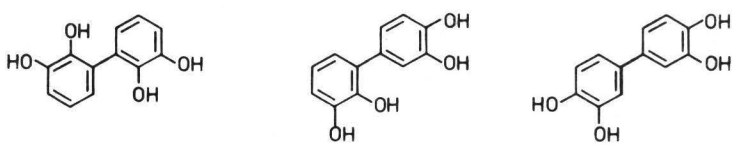


B

Auch diese Reaktion kommt zum Stillstand, weil das ungepaarte Elektron an einem sich vergrößernden Resonanzsystem anteilig wird, wodurch seine Reaktionsfähigkeit ständig abnimmt (KICKUTH 1959).

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß mit Hilfe der Elektronenspinresonanzmessung freie Radikale in Huminstoffen nachgewiesen werden konnten (STEELINK und TOLLIN 1967, ATHERTON et al. 1967, CHESHIRE et al. 1967, SCHNITZER 197o, HAWORTH 1971).

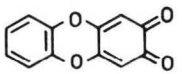
FORSYTH und QUESNEL (1957) erhalten z.B. bei der Oxydation von 1,2-Dihydroxybenzol in Gegenwart von Polyphenoloxydasen alle drei möglichen Tetrahydroxydiphenyle, entsprechend den Radikalen B und C (S. 21). Die weitere Oxydation führt zu dunkelbraunen, polymeren Produkten:



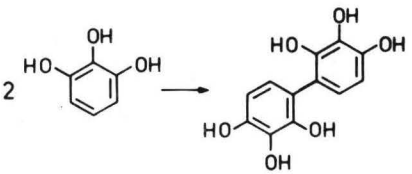
B+B B+C C+C

Diphenyläther können nicht isoliert werden, der Nachweis von Diphenylendioxidochinon-(2,3) spricht jedoch dafür, daß neben C-C-Bindungen bei dieser Reaktion auch C-O-Bin-

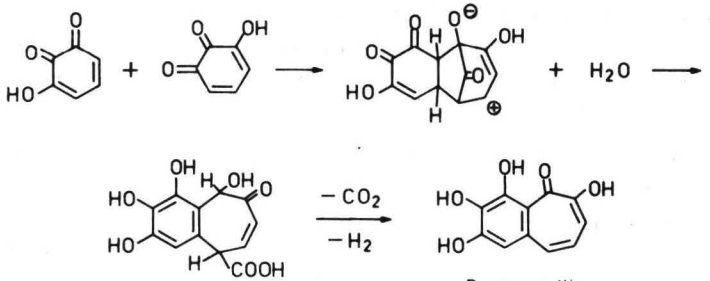
dungen geknüpft werden (FORSYTH et al. 196o):



1,2,3-Trihydroxybenzol könnte zu verschiedenen Strukturen dimerisieren; 2,3,4,2',3',4'-Hexahydroxy-diphenyl findet FLAIG (1966) nach alkalischer Oxydation:

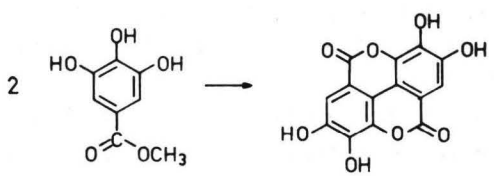


Es kann aber auch über 3-Hydroxybenzochinon-(1,2) zu Purpurogallin, einem Tropolonderivat oxydiert werden (SALFELD 1957, Formelschema nach RUSKE 1968):

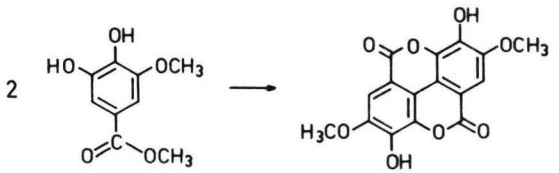


Purpurogallin

Aus 3,4,5-Trihydroxybenzoesäuremethylester entsteht unter Einwirkung von Polyphenoloxydasen Ellagsäure (STEINMETZ 1956):



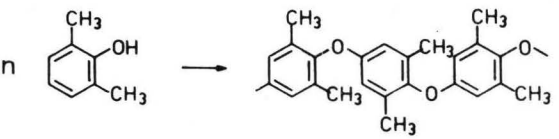
Eine Dimerisierung der O-methylierten Ester in verdünnten Laugen erfolgt nach HATHWAY (1957) aber nur dann, wenn mindestens zwei freie Hydroxylgruppen einander benachbart sind. Methylierung in 4-, in 4,5- oder in 3,5-Stellung verhindert die Entstehung von Dimeren. Aus 3,4-Hydroxy-5-methoxybenzoesäuremethylester entsteht dagegen die in 5,5'-Stellung methylierte Ellagsäure:



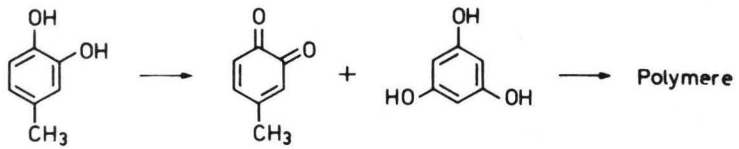
Als mögliche Ligninabbauprodukte wurden auch weitere partiell methylierte Phenole untersucht:

Bei der Oxydation von 2-Methoxyphenol sowohl mit einer Laccase als auch mit Eisen-III-Chlorid findet WALTER (1960) die drei möglichen Dimethoxy-dihydroxy-diphenyle; auch in diesem Fall führt die weitere Oxydation zu dunkelgefärbten Substanzen.

Selbst 2,6-Dimethylphenol polymerisiert durch Einwirkung des Luftsauerstoffs unter der katalytischen Wirkung von Kupfer-I-Komplexen:

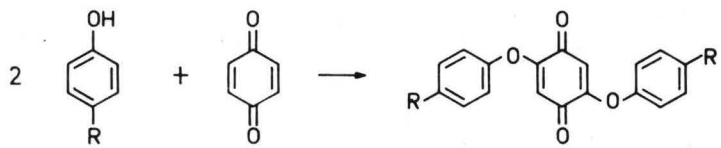


1,3,5-Trihydroxybenzol bildet bei der Luftoxydation mit äquimolaren Mengen 1,2-Dihydroxy-4-methylbenzol dunkelgefärbte Polymere.
HATHWAY (1958) nimmt an, daß dabei 1,2-Dihydroxy-4-methylbenzol zu 4-Methylbenzochinon-(1,2) oxydiert und oxydativ an 1,3,5-Trihydroxybenzol addiert wird:

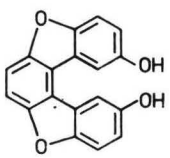


Die gleiche Reaktion ist jedoch auch aus einer semichinoiden Zwischenstufe formulierbar.

Eine Möglichkeit zur Entstehung von Ätherbrücken beschreibt MUSSO (1963): Chinone werden von Phenolen bevorzugt in 2- oder in 4-Stellung substituiert, in neutraler Lösung gewinnt jedoch die Reaktion über den Phenoxylsauerstoff an Bedeutung, und es können Strukturen der nachstehend dargestellten Art auftreten:

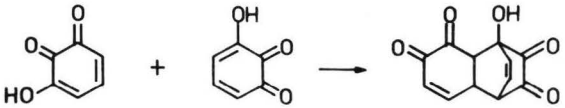


Auch durch saure Polymerisation von Benzochinon-(1,4) können ERDTMANN und STJERNSTRÖM (1959) ein Trimeres mit Ätherbrücken herstellen:



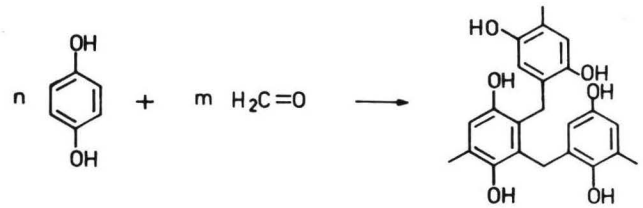
Neben den vielfältigen Möglichkeiten zur oxydativen Verknüpfung phenolischer Monomerer können aber auch andere Reaktionen zum Aufbau höhermolekularer Grundgerüste führen. Einige seien im folgenden kurz erwähnt:

3-Hydroxybenzochinon-(1,2) ist nach SALFELD (196o) leicht einer Diels-Alder-Reaktion zugänglich:

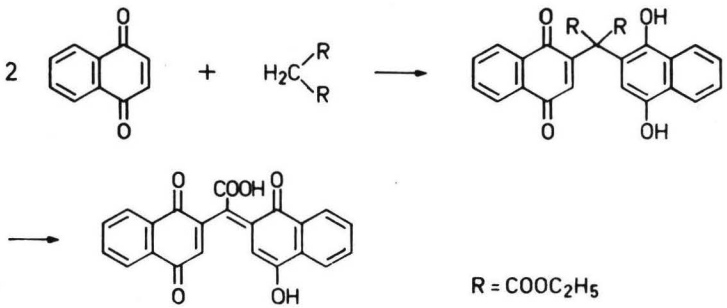


Die Verknüpfung aromatischer Ringe über C-Brücken soll an den folgenden Beispielen gezeigt werden:

Formaldehyd und 1,4-Dihydroxybenzol kondensieren unter der Wirkung von Hydroxylionen zu sphärokolloidalen Polymeren. Diese Reaktion ist auch für die Kunststoffherstellung von Bedeutung (HULTZSCH 195o, 1962):



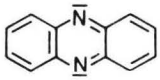
Ein weiteres Beispiel ist die Reaktion von Naphthochinon-(1,4) mit Malonsäureester (PRATT und BOEHME 1951):



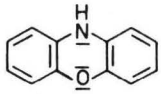
1.4.2.2. Reaktionen unter Beteiligung von Stickstoff

In Anbetracht des relativ hohen Stickstoffgehalts der Huminstoffe (ca. 3 - 5 %) werden Polymerisationsreaktionen auch unter Beteiligung von Stickstoff untersucht.

Es entstehen dabei u.a. Phenazin- (HORNER und STURM 1957, LINDBECK und YOUNG 1965) und Phenoxazinderivate (MUSSO et al. 1957, MURPHY und MOORE 196o, BEECKEN et al. 1961).



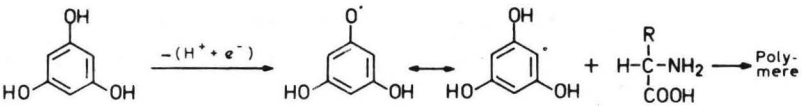
Phenazin



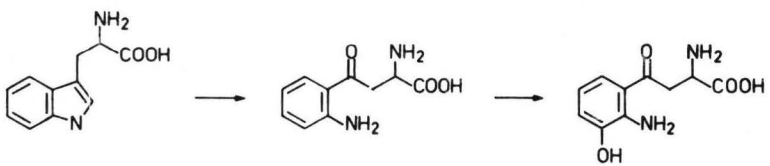
Phenoxazin

Eine der möglichen Reaktionen mit Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen wurde bereits auf S. 9 dargestellt. Nach BREMNER (1967) können bei derartigen Reaktionen auch Polymere entstehen, in denen der Aminostickstoff das Brükkenatom darstellt:

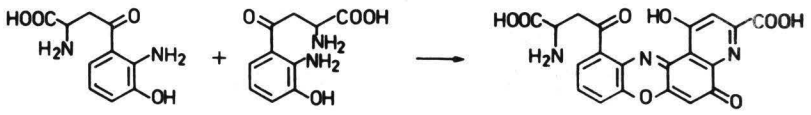
Bemerkenswerterweise können STEIN und TENDELOO (1959) bei der Reaktion von 1,3,5-Trihydroxybenzol mit Aminosäuren ebenfalls Polymerisation beobachten. Diese Reaktion verdient besonderes Interesse, weil hier die intermediäre Bildung von Chinonen ausgeschlossen ist und die Reaktion notwendigerweise an der Semichinonstufe einsetzen muß:



Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Reaktionen aromatischer Aminosäuren, die im Organismus zur Bildung dunkelgefärbter Substanzen führen. Ein Beispiel dafür sind die als Augen-, Haut- und Flügelpigmente bei Insekten weit verbreiteten Ommochrome, die sich oxydativ aus 3-Hydroxykynurenin, einem Tryptophanabkömmling bilden:



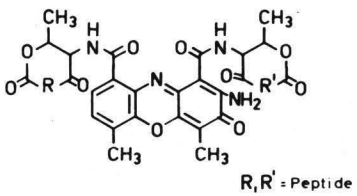
Tryptophan Kynurenin 3-Hydroxykynurenin



Xanthommatin

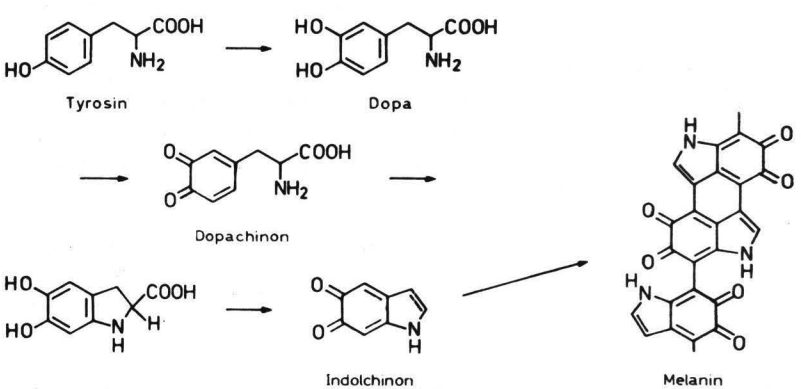
Das Xanthommatin wurde aus dem Schlupfsekret des Kleinen Fuchses (Vanessa urticae) isoliert (BUTENANDT 1957).

Einen ähnlichen Chromophor, ebenfalls ein Phenoxazonderivat, besitzen auch die Actinomycine, die antibiotisch wirkenden Stoffwechselprodukte einiger Actinomyceten der Streptomyces-Gruppe. Bemerkenswerterweise ist dieses Ringsystem mit verschiedenen Peptiden substituiert (BROCKMANN 196o):



R, R' = Peptide

Unter katalytischer Wirkung einer Phenoloxydase entsteht aus Tyrosin Dopachinon, welches spontan zu einem Indolderivat kondensiert. Letzteres polymerisiert zu den Melaninen, wichtigen tierischen Pigmenten (EVANS und RAPER 1937, Formelschema nach KARLSON 1967):



Tyrosin

Dopa

Dopachinon

Indolchinon

Melanin

1.5. Sichtung der Theorien und Problemstellung

Die vorausgegangene Zusammenfassung läßt folgendes erkennen: Mit zunehmender Einsicht in den Aufbau von Huminstoffen haben sich die Untersuchungen zur Aufklärung ihrer Entstehungsweisen ungeachtet, ob mit oder ohne Beteiligung von Stickstoffverbindungen auf einfache mehrwertige Phenole als Ausgangskörper konzentriert. Weiterhin ist deutlich zu bemerken, daß auf der Reaktionsseite das Konzept der radikalischen oxydativen Polymerisation in den Vordergrund gerückt ist.

Im Hinblick auf den ersten Punkt stellt sich die Frage, ob überhaupt im Boden hinreichend große Mengen freie, insbesonders mehrwertige Phenole gebildet werden, um auf dieser Substratbasis eine Synthese zu ermöglichen. Daß es auf der Reaktionsseite im Boden zahlreiche Ein-Elektrontransfers gibt, kann von vornherein als sicher unterstellt werden. Möglichkeiten sind z.B. folgende:

a) Der Valenzwechsel von Schwermetallionen, vor allem des Eisens (Fe^{III} zu Fe^{II}) und des Mangans (Mn^{IV} zu Mn^{III})

b) Übergang des molekularen Sauerstoffs in das Hydroperoxid-Anion

c) Heterogene Katalyse durch Elektronenübergänge auf die feste Bodenmatrix

d) Enzyme mit Ein-Elektrontransfer

e) Photochemisch induzierte Elektronenübergänge

Zur Klärung der ersten Frage haben sich viele Autoren bemüht, freie Phenole in der Bodenlösung nachzuweisen und zu identifizieren; im folgenden sollen diese Arbeiten kurz dargestellt werden:

Als "frei" können nur die mit relativ milden Methoden aus dem Boden extrahierbaren Phenole angesehen werden. Die von verschiedenen Autoren (GUENZI und McCALLA 1966, MORITA 1965,

WANG et al. 1967, LI et al. 197o) angewandte alkalische Hydrolyse führt sehr wahrscheinlich bereits zum Abbau höhermolekularer organischer Substanz.

In einem schwach alkalischen Extrakt verschiedener Böden findet WHITEHEAD (1964) 4-Hydroxybenzoesäure, 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyzimtsäure und 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure. Die gefundenen Mengen sind in der Tabelle 2 angegeben.

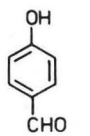
Tab. 2: Aus verschiedenen Böden isolierte freie Phenole (nach WHITEHEAD 1964)

Bodenart	Calcareous loam	Sand	Clay with flints	Clay loam
Vegetation	Grasland	Farnkraut	Buchenwald	Schwarze Johannisbeeren
Nachgewiesene Phenole in Prozent der organischen Substanz				
4-Hydroxybenzoesäure	o,oo11	o,oo24	o,oo34	o,oo12
3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure	o,ooo9	o,oo36	o,oo21	o,oo12
4-Hydroxyzimtsäure	o,oo23	o,oo3o	o,oo25	o,oo15
3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure	o,oo23	o,ooo3	o,ooo1	o,ooo5
Insgesamt:	o,oo66	o,oo93	o,oo81	o,oo44
Molarität in der Bodenlös.				
4-Hydroxybenzoesäure	$1{,}9 \times 10^{-5}$	$3{,}9 \times 10^{-5}$	$3{,}2 \times 10^{-5}$	$0{,}8 \times 10^{-5}$
3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure	$1{,}4 \times 10^{-5}$	$4{,}9 \times 10^{-5}$	$1{,}7 \times 10^{-5}$	$0{,}7 \times 10^{-5}$
4-Hydroxyzimtsäure	$3{,}8 \times 10^{-5}$	$4{,}2 \times 10^{-5}$	$2{,}0 \times 10^{-5}$	$0{,}9 \times 10^{-5}$
3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure	$3{,}2 \times 10^{-5}$	$0{,}4 \times 10^{-5}$	$0{,}07 \times 10^{-5}$	$0{,}3 \times 10^{-5}$

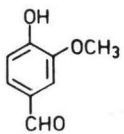
Unter Anwendung einer gleichartigen Extraktionsmethode finden MARTINEZ und DE PETRE (1965) dieselben Phenole in verschiedenen Böden.

In wässrigen Bodenextrakten finden JAQUIN und BRUCKERT (1965) 4-Hydroxybenzoesäure und 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure; zusätzlich zu diesen Phenolen können GUENZI und McCALLA (1966) noch 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyzimtsäure nach Extraktion von "silty clay loam soils" mit schwach alkalischen und schwach sauren wässrigen Lösungen sowie mit Methanol und Aceton nachweisen.

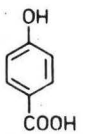
HENNEQUIN und JUSTE (1967) extrahieren mit o,2 N Natronlauge 4-Hydroxyzimtsäure, 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzoesäure aus verschiedenen Böden; die Mengen nehmen in der genannten Reihenfolge ab. Aus dem Heißwasserextrakt verschiedener Waldböden isoliert KUNZE (1969) 4-Hydroxyzimtsäure, 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd.



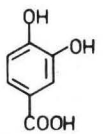
4-Hydroxybenzaldehyd



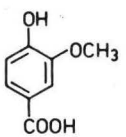
3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd



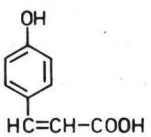
4-Hydroxybenzoesäure



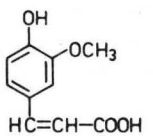
3,4-Dihydroxybenzoesäure



3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure



4-Hydroxyzimtsäure

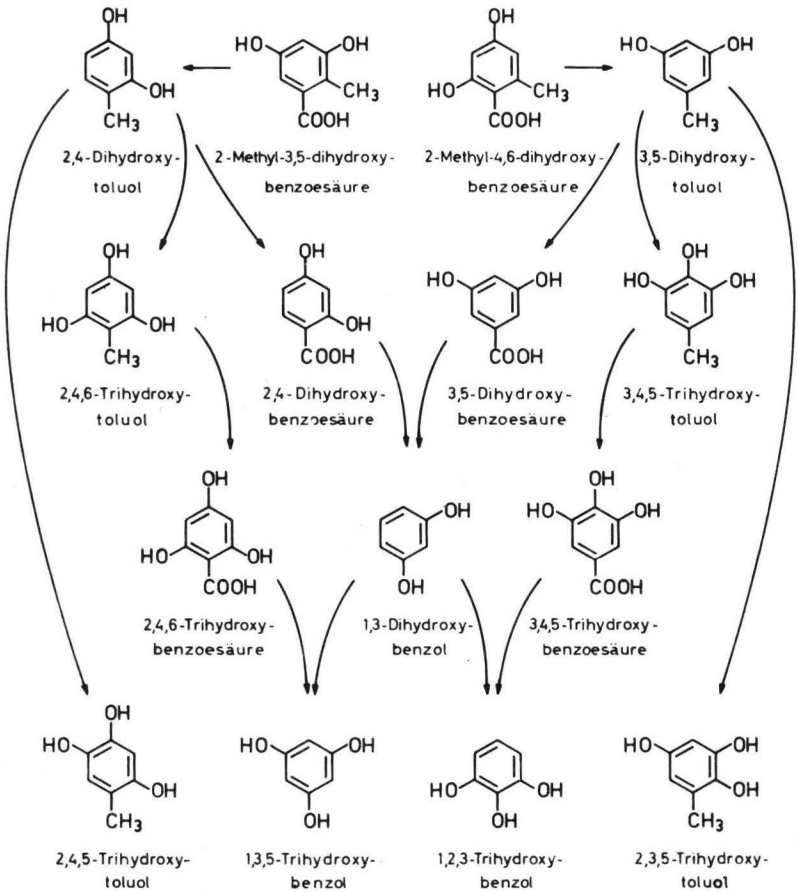


3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure

Im Methanolextrakt zweier Waldböden findet HINNEY (1969) fünf phenolische Verbindungen, die zwar nicht identifiziert werden können, aber auch nicht mit den zuvor genannten identisch sind; auf die Isolierung von Phenolen, die nicht mit bekannten Inhaltsstoffen aus Pflanzen und Tieren identifiziert werden können, weisen auch die meisten der zuvor genannten und andere Autoren hin (POHL 1968). Es liegt nahe anzunehmen, daß es sich bei diesen Phenolkörpern um neu erzeugte mikrobielle Metabolite handelt, eine Auffassung, die vor allem von FLAIG und seiner Schule vertreten und experimentell geprüft wurde (HAIDER und MARTIN 1967, MARTIN und HAIDER 1969).

So beschreiben HAIDER und MARTIN (1967) in der bereits auf Seite 2o erwähnten Arbeit, daß die von dem Pilz Epicoccum nigrum während des Wachstums auf Glucose und Asparaginsäure gebildeten Phenole (2-Methyl-4,6-dihydroxybenzoesäure und 2-Methyl-3,5-dihydroxybenzoesäure) anschließend in über zwanzig Phenole umgewandelt werden. Ein Teil dieser Umwandlungsprodukte ist in der folgenden Übersicht zusammengestellt (S. 33).

Die Bildung von Ausgangsstoffen für die Huminstoffsynthese aus nichtaromatischen Vorstufen untersucht MATSCHKE (197o). Alle 14 geprüften Bodenstreptomyceten sind zur Bildung von derartigen Vorstufen in der Lage, besonders aktiv sind Str. phaeochromogenes, Str. scabies, Str. violaceus und Str. aureus. Bei den von Str. aureus gebildeten Substanzen handelt es sich nach Ansicht des Verfassers um Derivate des tricyclischen Kohlenwasserstoffs Anthracen. 28 Verbindungen dieser Art können in den ersten 25 Kultivierungstagen aus dem Kulturmedium des Pilzes isoliert werden.



Neben der experimentell belegten biologischen Bildung von Phenolen aus aromatischen und nichtaromatischen Vorstufen besteht die Möglichkeit, daß auch d u r c h a b i o l o g i s c h e P r o z e s s e i m B o d e n

aus vorgegebenen organischen Verbindungen, insbesondere solchen mit präformiertem Aromatenskelett neue Phenole entstehen, unter ihnen auch solche, die als biochemische Syntheseprodukte unbekannt sind. Dieser Aspekt stellt keinen Gegensatz, sondern ein echtes Komplement zur Aromatensynthese durch Bodenorganismen dar. Er ist der zentrale Gedanke dieser Arbeit.

Die Konkretisierung dieser Vorstellung geht davon aus, daß in der Fraktion der freien Bodenphenole bestimmte Zimtsäurederivate, besonders die monomeren Bausteine der Lignine regelmäßig anzutreffen sind. Zusammen mit der Tatsache, daß man bei der durchgreifenden Hydrogenolyse von Huminsäuren n-Propyl-cyclohexanole (GANZ 1944) erhält, legt es dieser Befund nahe, Zimtsäurederivate als Ausgangsmaterial für die abiologische Entwicklung eines Spektrums von Folgeverbindungen im Experiment zu wählen, und diese darüber hinaus auch als eine mögliche "Austrittsstelle" für die abiologische Huminsäuresynthese zu betrachten; jedenfalls nicht unbedingt ein C_6-C_1-Phenol oder Brenzkatechin und Hydrochinon selbst.

Darüber hinaus beinhaltet das Konzept einer de novo Huminstoffsynthese aus Monomeren zwangsläufig, daß der Huminstoffaufbau im Boden als Konkurrenzreaktion zur Endkatabolisierung von Aromaten ablaufen muß (GREILICH 1971). Auch unter diesem Blickwinkel gewinnt die Stufe der substituierten Zimtsäure beim Abbau von Ligninen besondere Bedeutung. Einerseits ist mit dieser Stufe ein erstes Maximum bakteriostatischer Wirkung erreicht, d.h. die konkurrierend verlaufende Endmetabolisierung kann eingeschränkt werden, andererseits verlaufen die Abbaureaktionen an den Ligninen nur bis zu dieser Stufe als exoenzymatische Reaktionen au-

ßerhalb der Zelle, alle weiteren Katabolite können intrazellulär verarbeitet werden und haben somit nur geringe Chancen, für einen Huminstoffaufbau zur Verfügung zu stehen.

Zusammenfassend waren die oben angeführten Gesichtspunkte der Anlaß, das Verhalten von Zimtsäuren aus dem Ligninabbau unter abiologischen Reaktionsbedingungen zu studieren, um in dreierlei Hinsicht eine Wissenslücke zu füllen:

a) Ist es durch bodenmögliche abiologische Radikalreaktionen möglich, aus einfachen Zimtsäurederivaten ein Stoffspektrum niedermolekularer Phenole zu entwickeln?

b) Läßt sich eine Zimtsäure durch bodenmögliche Ein-Elektronreaktionen in huminstoffartige Körper überführen?

c) Ist es ggf. möglich, diese Verbindungen bestimmten, aus Böden isolierten Aromaten (Phenolen) zuzuordnen?

2. METHODEN UND ERGEBNISSE

Die aus den vorangegangenen Überlegungen abgeleitete Problemstellung dieser Arbeit legt auch den Gang der experimentellen Untersuchungen verhältnismäßig eindeutig fest.

Es galt zunächst, durch eine weitgehende Erfassung der löslichen niedermolekularen Verbindungen aus einem reich entwickelten und gut beschriebenen natürlichen Boden den Nachweis zu erbringen, daß tatsächlich außer den allgemein vorkommenden und zuzuordnenden phenolischen Substanzen zahlreiche andere Verbindungen auftreten, deren allgemeines Verhalten und Reaktionen auf eine phenolische bzw. aromatische Struktur hindeuten.

Es galt ferner, diese Verbindungen durch ihre analytischen Parameter (Laufverhalten im Chromatogramm, Anfärbereaktionen, Spektren) möglichst genau zu fixieren, damit sie in Beziehung zu Verbindungen gesetzt werden konnten, die man in vitro durch eine abiologische chemische Reaktion aus einem einfachen, im Boden vorkommenden Grundkörper gegebenenfalls gewinnen konnte. Darin bestand demgemäß auch der zweite und wesentliche Teil der experimentellen Arbeit.

Es galt dann zu zeigen, daß durch einen chemischen Prozeß in vitro aus einer vorgegebenen natürlichen Vorstufe ein Kollektiv von Folgesubstanzen gewonnen werden kann, das zu den im Boden vorkommenden nieder- und höhermolekularen Stoffen Beziehungen aufweist, oder sogar mit diesen z.T. identisch ist.

Es ist selbstverständlich, daß diese Aussagen für die Realität an Wert gewinnen, wenn dieser Prozeß nach einem zumindest bodenmöglichen Reaktionsschema vollzogen wird

und wenn andererseits ein Ausgangsmaterial verwendet wird, dessen häufiges Vorkommen im Boden gesichert ist.

Uns schien die erste Forderung experimentell am günstigsten durch einen photochemischen Prozeß erfüllbar zu sein, der gewissermaßen als integrierende Modellreaktion für alle im Boden nachgewiesenen oder möglichen Ein-Elektronreaktionen gelten kann, der möglicherweise sogar als solcher bei der Umwandlung der organischen Substanz an der Bodenoberfläche eine Rolle spielt. Experimentell bietet dieses Verfahren insofern besondere Vorteile, als man nicht andere chemische Verbindungen in das Geschehen einzubringen hat, wodurch sich die Aufarbeitungsverfahren etc. wesentlich vereinfachen.

Als Muttersubstanz haben wir die 4-Hydroxyzimtsäure gewählt, was sich aus dem eingangs dargelegten häufigen Vorkommen im Boden als Ligninabbauprodukt zwanglos ergibt. Außerdem ist die 4-Hydroxyzimtsäure beträchtlich mikrobizid; auch zu diesem Punkt wurden eingangs Überlegungen angestellt. Es mußte durchaus damit gerechnet werden, daß sich in dem aus der 4-Hydroxyzimtsäure abiologisch entwickelten Stoffspektrum noch andere und vielleicht stärker mikrobizide Verbindungen befinden konnten. Auch ein solcher Befund würde zweifellos die Hypothese von der abiologischen Evolution eines Stoffspektrums in Konkurrenz zu den biologischen Umsetzungen als mögliche Ausgangsbasis für einen Huminstoffaubau im Boden weiter stützen. Auch diese Frage wurde daher - wenn auch nur kursorisch - experimentell geprüft.

So läßt sich die experimentelle Arbeit, diesen Gedanken folgend, in drei Abschnitte gliedern:

a) Isolierung und analytische Aufgliederung der mobilen organischen Komponenten eines genau beschriebenen Bodens unter besonderer Berücksichtigung der Phenole und

anderer Aromaten.

b) Photochemische Reaktionen der 4-Hydroxyzimtsäure, Isolierung und Identifizierung der Reaktionsprodukte und deren Zuordnung zu den unter a) gewonnenen Stoffen.

c) Prüfung des Verhaltens der unter b) gewonnenen Substanzen gegenüber Mikroorganismen aus dem Boden.

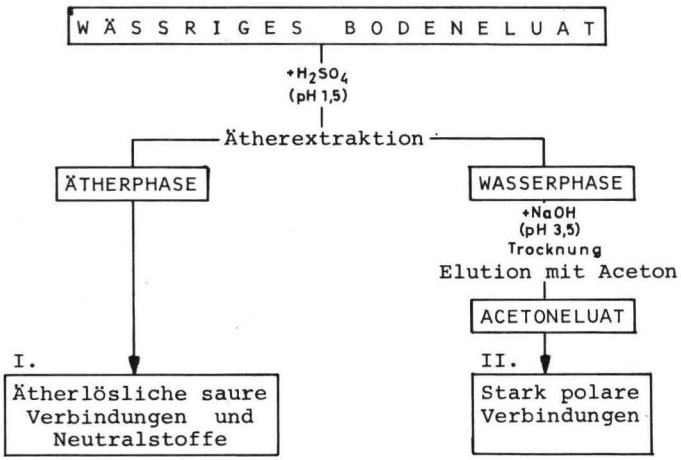
2.1. Analytische Untersuchungen an einem Waldboden

Die Untersuchungen wurden an einem Boden durchgeführt, der sich unter einem ca. 25jährigen Buchenbestand im Göttinger Wald befindet. Der mittlere Muschelkalk weist in diesem Gebiet Mulden auf, die mit entkalkten pleistozänen Lößablagerungen ausgefüllt sind, auf denen sich saure Braunerden entwickelten. Eine genaue Standortbeschreibung findet sich bei KICKUTH et al. (1969).

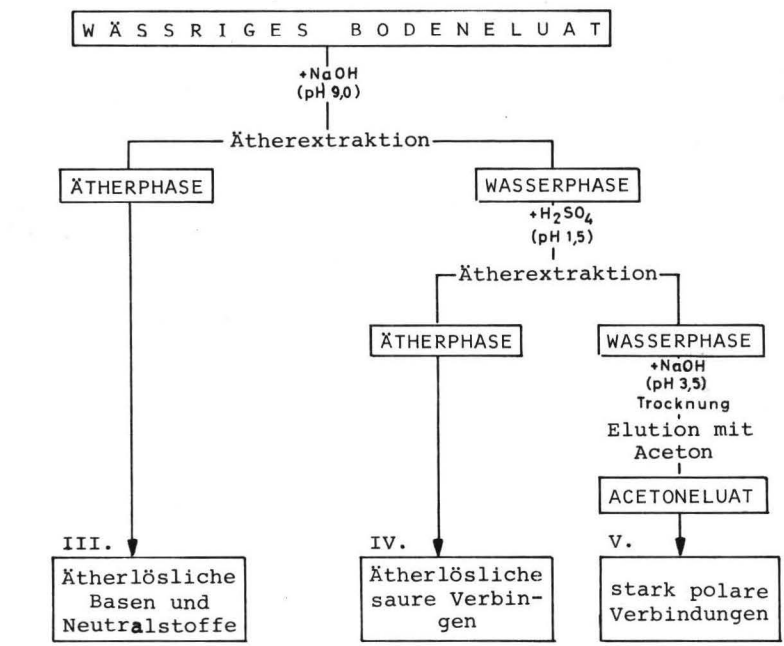
Die Aufarbeitung des im November dem A_h-Horizont entnommenen Materials fand sofort nach der Probeentnahme statt. Strukturiertes organisches Material wurde mit einer Pinzette weitgehend entfernt.

Das wässrige Bodeneluat, das durch zehnstündiges Schütteln von 1,5 kg natürlich feuchtem Boden mit 3 Ltr. Wasser bei Zusatz von 1 g Citronensäure und o,2 g Ascorbinsäure gewonnen worden war (Citronensäure soll die in komplexer Bindung vorliegenden Phenole freisetzen, Ascorbinsäure soll die Oxydation empfindlicher Phenole unterbinden), wurde nach dem Abzentrifugieren der Feinbodenanteile und Einengen bei 4o°C im Vakuum nach den Trennungsgängen 1 und 2 aufgetrennt. Dabei wiederholt der Trennungsgang 2 im grundsätzlichen den Trennungsgang 1, er enthält jedoch eine vorgeschaltete Stufe zur Entfernung von Neutrallipiden:

Trennungsgang 1:



Trennungsgang 2:



Wenn man eine Behandlung mit Säuren oder Laugen ausschließt, durch die niedermolekulare Verbindungen hydrolytisch aus größeren Molekülen abgespalten werden können, so kommen für die Extraktion der freien Bodenphenole grundsätzlich zwei Methoden in Betracht:

a) Die Extraktion der Bodenprobe mit Wasser, gegebenenfalls unter Zusatz eines Chelators.

b) Die Extraktion der Bodenprobe mit organischen Lösungsmitteln.

Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln bringt gewisse Vorteile; Quellung und Peptisation treten in wesentlich geringerem Umfange auf als bei der Extraktion mit Wasser, wodurch Perkolations- und Filtrationsvorgänge technisch leichter zu handhaben sind. Zudem sind häufig auch höhermolekulare organische Verbindungen des Bodens recht gut wasserlöslich, so daß durch Wasserextraktion Proteine, polymere Kohlenhydrate und Huminstoffe miterfaßt werden. Je nach Art eines zu verwendenden organischen Lösungsmittels läßt sich das mehr oder weniger unterbinden; dabei müssen allerdings die sehr wasserähnlichen, stark polaren organischen Lösungsmittel wie Dimethylformamid oder Pyridin ausgeschaltet werden (ihre besondere Eignung zur Elution großer Teile der gesamten organischen Matrix ist bekannt (ZIECHMANN und PAWELKE 1959)). Indes haben organische Lösungsmittel den Nachteil, daß sie die Lipidphase des Bodens mit erfassen; bei anschließenden Trennungsoperationen erweist sich diese erfahrungsgemäß immer als störend. Die Extraktion mit Wasser beläßt die Menge der Lipidkörper ungelöst, jedoch werden stattdessen anorganische Salze aus dem Boden mit erfaßt. Auch diese können die Abtrennung einiger Fraktionen erschweren. Außerdem wird durch eine Wasserextraktion auch das Übertreten von Lipiden ins Eluat nicht gänzlich ausgeschlossen. Es ist bekannt, daß Lipide als "Cosolvate" mit polaren Verbindungen in wässrige Phasen übertreten können. Das konnten wir auch in unseren Untersuchungen bestätigen.

Alles in allem erhielten wir mit Wasser als Extraktionsmittel günstigere Ergebnisse bei den anschließenden Trennungen, so daß wir ihm für die Herauslösung der freien Bodenphenole den Vorzug gaben. Sicherlich bleibt ein Teil der niedermolekularen Phenole mit dieser Methode unerfaßt, was z.T. mit der geringen Wasserlöslichkeit mancher Verbindungen zusammenhängt, zum größeren Teil aber damit, daß

Wasser kaum in der Lage ist, freie Phenole aus Verbänden zu lösen, in denen sie an hydrophobierten Oberflächen adsorbiert im Verband mit Lipiden vorliegen.

Bis heute ist auch kein Verfahren vorgeschlagen worden, das eine befriedigende Trennung der freien Phenole aus Bodenproben gestattet. Man muß dabei berücksichtigen, daß ein Phenol von seiner chemischen Konstitution her zugleich eine hydrophile und eine lipophile Verbindung ist und daß nach Maßgabe der Substitution mit funktionellen Gruppen die eine oder die andere Eigenschaft besonders stark ausgeprägt sein kann. Selbst die saure Funktion der Hydroxylgruppe kann nicht zu einer eindeutigen Überführung in die Gruppe saurer, lipophiler Verbindungen verwendet werden; so ist z.B. die Acidität hoch alkylierter Phenole derart gering, daß sie regelmäßig im Trennungsgang bei den Neutralstoffen zu finden sind. Bei voll methylierten Phenolen gilt dies ohnehin. Phenole mit starker Hydroxyl- oder Carboxylsubstitution lösen sich hingegen kaum in lipophilen organischen Lösungsmitteln (Äther usw.), sondern verbleiben in den wässrigen Phasen, in denen sich nach den klassischen Trennungsgängen organische Säuren, Kohlenhydrate und Aminosäuren finden. Dieses unterschiedliche Verhalten der einzelnen Phenole bietet andererseits eine Handhabe, sie bei der Trennung in bestimmte Gruppen aufzuteilen, wovon auch der Trennungsgang nach STAUDINGER (1968) Gebrauch macht. Für diese Fraktionierungen gilt natürlich auch das bereits oben Gesagte, und es ist somit keine saubere Trennung zu erwarten. Hinzu kommt im gegebenen Falle, daß die Menge der aus dem Boden extrahierbaren Phenole sehr gering ist und diese häufig ein nicht eindeutiges Phasenverhalten zeigen, das auf die Anwesenheit zahlreicher phasenvermittelnder Substanzen (Fette, Wachse, Harze, Steroide etc. im Eluat zurückzuführen ist).

Was auf Grund der obigen Überlegungen zu erwarten war, trat ein. Es fanden sich in allen Endfraktionen phenolpositive Verbindungen, so daß jede Fraktion einzeln weiter untersucht werden mußte. Es zeigte sich aber doch, daß sie in einzelnen Gruppen erheblich angereichert vorlagen, während andere Fraktionen nur geringe nachweisbare Mengen enthielten. In der Hoffnung, daß entsprechend den Vorstellungen STAUDINGERs eine Vortrennung in bestimmte funktionelle Klassen erfolgt sein konnte, wurden grundsätzlich alle Fraktionen in der gleichen Weise weiter untersucht; ein

Teil des Eluats wurde jedoch auch ohne eine Vortrennung den folgenden Trennungen unterzogen. Die Isolierung einzelner Verbindungen erfolgte durch zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung auf Kieselgelplatten der Firma Schleicher & Schüll; als Laufmittel wurden benutzt:

System 1: Toluol, Äthylformiat, Ameisensäure = 5 : 4 : 1
System 2: Chloroform, Eisessig, Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase).

Zum Nachweis der interessierenden Verbindungen dienten folgende Methoden:

a) Lokalisierung der im Tageslicht sichtbaren Verbindungen

b) Lokalisierung der im UV-Licht bei 254 und 35o nm sichtbaren Verbindungen

c) Besprühen der Chromatogramme mit phenolspezifischen Reagenzien; diazotierter Sulfanilsäure, Echtblausalz B und Eisen-III-Chlorid

d) Verbindungen, die anscheinend in größeren Mengen vorlagen, wurden mit dem Adsorptionsmaterial abgeschabt und eluiert. Von dem Eluat wurde ein Ultraviolett-Absorptionsspektrum angefertigt.

Zu den angewandten Methoden sind einige Anmerkungen erforderlich:

- Den geringsten diagnostischen Wert besitzt die Lokalisierung von Substanzen auf dem Chromatogramm durch Eigenfarbe im Tageslicht oder Fluoreszenzfarbe im UV-Licht. Es sind hieraus keinerlei Schlüsse auf eine eventuelle aromatische Struktur möglich. Trotzdem mußten diese Eigenschaften mit herangezogen werden, weil es Phenole gibt, die nicht mit den sogenannten phenolspezifischen Reagenzien darzustellen sind, sich jedoch durch ihre Fluoreszenz zu erkennen geben.

- Farbreaktionen mit diazotierter Sulfanilsäure und Echtblausalz lassen ebenfalls keine eindeutigen Aussagen zu. Diazoniumverbindungen kuppeln mit solchen Aro-

maten, die durch starke Elektronendonator-Gruppen substituiert sind; dazu gehören vor allem Hydroxyl- und Aminogruppen.

Eine positive Farbreaktion bedeutet daher, daß es sich bei der betreffenden Verbindung um ein Phenol oder ein aromatisches Amin handeln kann (wobei berücksichtigt werden muß, daß aromatische Amine im Boden nur in sehr geringem Umfange vorkommen); negative Reaktion spricht jedoch andererseits nicht unbedingt für nichtphenolischen Charakter, da voll methylierte Phenole z.B. nicht immer kuppeln (s.o.).

- Eisen-III-Chlorid bildet mit vielen Phenolen, vor allem mit solchen, die mindestens zwei vicinale Sauerstoff-Funktionen besitzen, farbige Komplexe; findet jedoch keine Farbkomplexbildung statt, kann deshalb ebenfalls nicht das Vorliegen einer phenolischen Verbindung ausgeschlossen werden.

- Alle phenolischen Verbindungen absorbieren ultraviolette Strahlen im Bereich zwischen 2oo und 35o nm. Die Spektren sind für die Identifizierung unbekannter Verbindungen sehr wertvoll. Bei der von uns angewandten Methode erfordert die Erzielung aussagekräftiger Spektren jedoch Mindestmengen von ca. 5 µg.

Da, wie bereits erwähnt, nur sehr geringe Mengen organischer Substanz extrahiert wurden, konnte leider keine Substanz so weit angereichert werden, daß die Anfertigung eines brauchbaren UV-Absorptionsspektrums möglich war . Es wurden daher die bodenbürtigen Phenole über ihre R_f-Werte in zwei Systemen, die Farben im Tages- und UV-Licht und das Anfärbeverhalten gegenüber den genannten Reagenzien identifiziert; dies geschah in Übereinstimmung mit vielen anderen Autoren, die diese Kriterien ebenfalls für die Zuordnung als ausreichend erachteten.

Mit Hilfe der genannten Methoden gelang es, 51 Verbindungen zu isolieren; die Anzahl der mit den verschiedenen Reagenzien darstellbaren Substanzen geht aus dem VENN-Diagramm der Abb. 1 hervor.

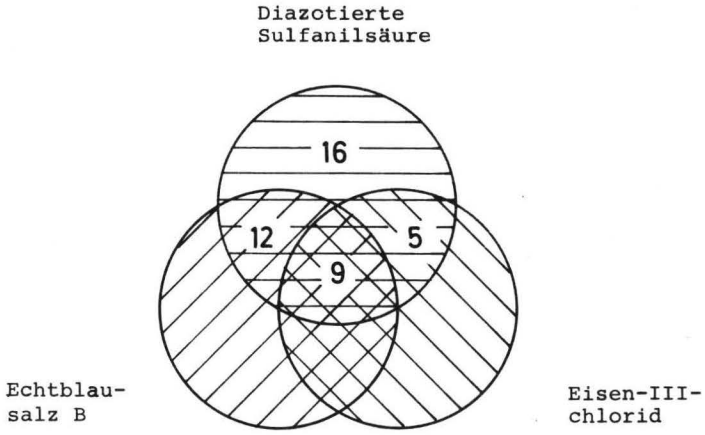
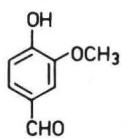
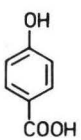


Abb. 1: VENN-Diagramm für drei Reaktionen an einem aus dem Boden isolierten Stoffkollektiv

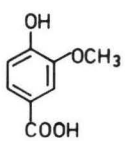
Nur fünf von diesen Verbindungen waren mit den Phenolen identisch, die bisher aus Böden isoliert werden konnten (s. S. 31), es handelt sich dabei um 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxybenzoesäure, 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxyzimtsäure und 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure.



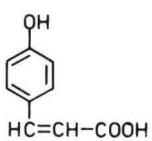
3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd



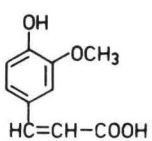
4-Hydroxybenzoesäure



3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure



4-Hydroxyzimtsäure



3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure

Eine genaue Beschreibung der isolierten Verbindungen findet sich zusammen mit den durch die Bestrahlung der 4-Hydroxyzimtsäure gewonnenen Substanzen in der Tabelle 6 auf den Seiten 66 - 69.

Im Hinblick auf die eingangs angestellten Überlegungen ist es interessant, die Verteilung der identifizierten Phenole in den verschiedenen Fraktionen der beiden auf der Seite 39 dargestellten Trennungsgänge zu betrachten; in Übereinstimmung damit sind diese Phenole weder in der Fraktion I noch in der Fraktion IV zu finden, obwohl sie gerade dort auftreten müßten (s. Tab. 3).

Tab. 3: Verteilung von Phenolen auf die verschiedenen Fraktionen der Trennungsgänge von S. 39

	Fraktionen der Trennungsgänge von S. 39					
	I	II	III	IV	V	Gesamteluat
3-Methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd		+				
4-Hydroxybenzoe-säure		+	+		+	+
3-Methoxy-4-hydroxy-benzoesäure		+			+	+
4-Hydroxyzimtsäure		+	+			+
3-Methoxy-4-hydroxy-zimtsäure			+		+	+

Quantitative Auswertungen waren nur bedingt möglich, da, wie bereits betont wurde, insgesamt nur sehr geringe Mengen organischer Substanz eluiert werden konnten. Hervorzuheben ist jedoch das deutliche Überwiegen der 4-Hydroxybenzoesäure; es folgt die 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure, während die anderen Verbindungen in äußerst geringen Mengen auftraten.

2.2. Photochemische Versuche

Drei mehrfach im Boden nachgewiesene Hydroxyzimtsäuren, 4-Hydroxyzimtsäure, 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure und 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure wurden jede für sich in kristalliner Form und in wässriger Suspension in Glasgefäßen dem Tageslicht ausgesetzt.

Nach zehntägiger Bestrahlung ergab die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Proben, daß sich im Falle der 4-Hydroxyzimtsäure eine neue Verbindung gebildet hatte, die sowohl ein deutlich anderes chromatographisches Verhalten, als auch andere Löslichkeitseigenschaften aufwies. Bei den beiden anderen Hydroxyzimtsäuren konnte nur eine verstärkte cis-Isomerisierung beobachtet werden, andere Veränderungen fanden offenbar nicht statt.

Nach zwanzigtägiger Bestrahlung hatte sich ein größerer Teil der 4-Hydroxyzimtsäure in die neue Substanz umgewandelt, während sich bei den anderen Proben auch weiterhin keine Veränderungen zeigten.

Entsprechende Versuche mit dem Licht von Leuchtstofflampen (Emissionsspektrum siehe Abb. 2) führten zu gleichen Ergebnissen; nach ca. 100 stündiger Bestrahlung war eine in 10 cm Abstand von der Lampe befindliche, etwa 1 mm starke Schicht kristalliner 4-Hydroxyzimtsäure vollständig in die neue Substanz umgewandelt, während die anderen beiden Substanzen unverändert blieben.

Die für die Umwandlung wirksamen Wellenlängen konnten mit Hilfe von Lichtfiltern ermittelt werden; bestrahlt wurde dabei mit einer Xenon-Hochdrucklampe, deren Spektrum in dem in Frage kommenden Bereich relativ linear ist (Emissionsspektrum der Xenon-Hochdrucklampe und Transmissionskurven der Filter siehe Abb. 3).

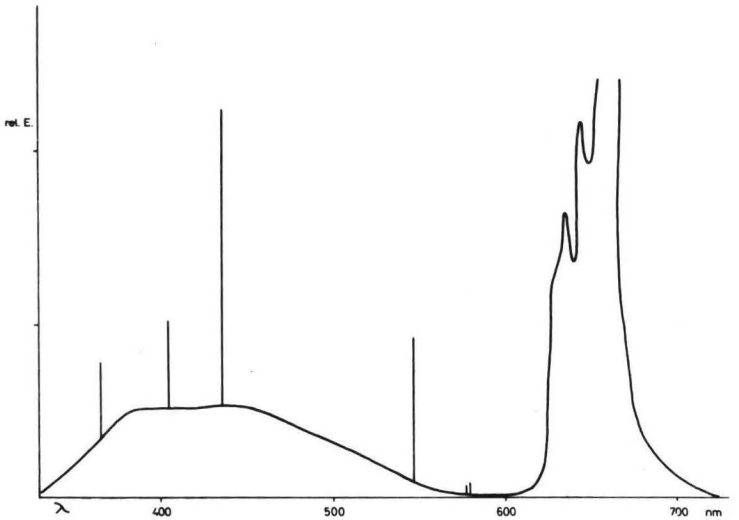


Abb. 2: Emissionsspektrum der Leuchtstofflampe OSRAM-L-FLUORA L 4o W/77

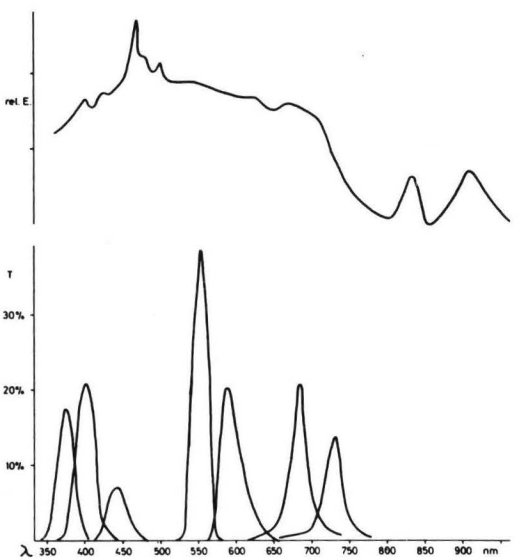


Abb. 3: Oben: Emissionsspektrum der Xenon-Hochdrucklampe
Unten: Transmissionskurven der 7 benutzten Farbfilter

Es stellte sich heraus, daß allein die Wellenlängen unter 4oo nm für die Umwandlung der 4-Hydroxyzimtsäure von Bedeutung sind.

Tab. 4: Dünnschichtchromatographisches Verhalten und Farbreaktionen der durch Bestrahlung mit UV-Licht aus kristalliner 4-Hydroxyzimtsäure entstandenen Verbindungen

Adsorptionsmaterial: Kieselgel
Laufmittel: Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure = 5 : 4 : 1

R_f-Wert	Farbe im UV-Licht		Farbreaktion mit		
	254 nm	35o nm	Diazot.Sulfanilsäure	Echtblausalz B	Eisen-III-chlorid
o	absorbiert	-	gelb	gelb	-

Adsorptionsmaterial: Kieselgel
Laufmittel: Chloroform/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase)

R_f-Wert	Farbe im UV-Licht		Farbreaktion mit		
	254 nm	35o nm	Diazot.Sulfanilsäure	Echtblausalz B	Eisen-III-chlorid
o	absorbiert	-	gelb	gelb	-

Adsorptionsmaterial: Polyamid
Laufmittel: Chloroform/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase)

R_f-Wert	Farbe im UV-Licht		Farbreaktion mit		
	254 nm	35o nm	Diazot.Sulfanilsäure	Echtblausalz B	Eisen-III-chlorid
o	absorbiert	-	gelb	gelb	-
4	absorbiert	-	erst gelb, dann violett	gelb	-
15	absorbiert	-	erst gelb dann violett	gelb	-

Wie aus der Tab. 4 hervorgeht, handelt es sich bei der entstandenen Substanz nicht um eine einheitliche Verbindung; bei der Trennung an Polyamid im System Chloroform/ Eisessig/Wasser überwiegt jedoch quantitativ eindeutig die Verbindung mit dem R_f-Wert 0, es folgt die Substanz mit dem R_f-Wert 4, während bei R_f 15 nur ein sehr schwacher Fleck erscheint.

Zur weiteren Charakterisierung dienten UV-Absorptionsspektren. Auf Grund der gegebenen Mengenverhältnisse konnten nur von den beiden Substanzen bei R_f 0 und R_f 4 getrennte Spektren aufgenommen werden (Spektren siehe Abb.4).

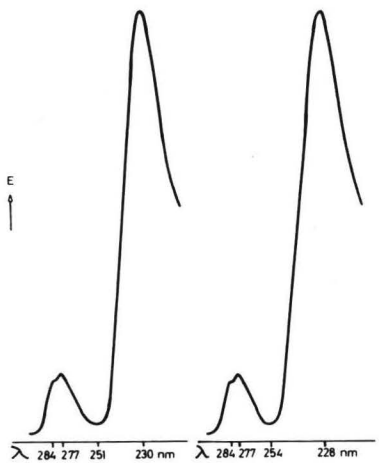


Abb. 4:
UV-Absorptionsspektren der 4,4'-Dihydroxytruxillsäuren nach Trennung auf Polyamid-dünnschichtplatten im System Chloroform/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase) in Methanol
links : Substanz mit dem R_f-Wert 0
rechts: Substanz mit dem R_f-Wert 4

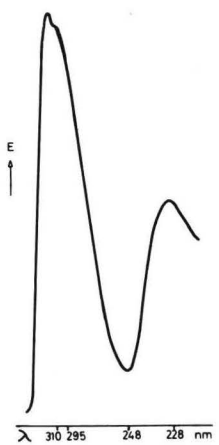


Abb. 5:
UV-Absorptionsspektrum der 4-Hydroxyzimtsäure in Methanol

Es zeigte sich, daß die Spektren nahezu identisch sind.

Die nachstehend angegebenen Daten gelten für das Substanzgemisch:

- Schmelzpunkt: ca. 3oo°C unter Zersetzung
- Elementaranalyse (ausgeführt durch das Mikroanalytische Labor Beller Göttingen):

  66,o6 % C, 4,94 % H, als Differenz 29 % O.

  Für die 4-Hydroxyzimtsäure berechnete Werte:

  65,9o % C, 4,88 % H, 29,22 % O.
- Infrarot-Spektrum: siehe Abb. 6.
- NMR-Spektrum (freundlicherweise von Herrn Dr. Lackner, Org. Chem. Institut Göttingen aufgenommen und interpretiert): siehe Abb. 8.
- Massenspektrum (freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Spitteller, Org. Chem. Institut Göttingen aufgenommen und interpretiert): Es kann nur 4-Hydroxyzimtsäure nachgewiesen werden.
- Molekulargewichtsbestimmung: Die MG-Bestimmung nach RAST in Campher gelingt auf Grund der geringen Löslichkeit der unbekannten Substanz nicht. Aus dem gleichen Grunde kann auch keine osmometrische MG-Bestimmung durchgeführt werden.
  Nach der Methylierung mit Diazomethan ergibt die osmometrische MG-Bestimmung (7,11 mg Substanz in o,5 ml Aceton) den Wert 374 (durchgeführt vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen).

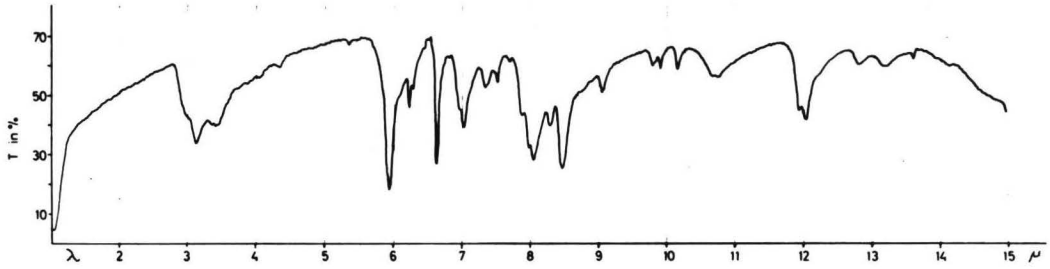


Abb. 6:

IR-Absorptions-spektrum der 4,4'-Dihydroxytruxill-säure

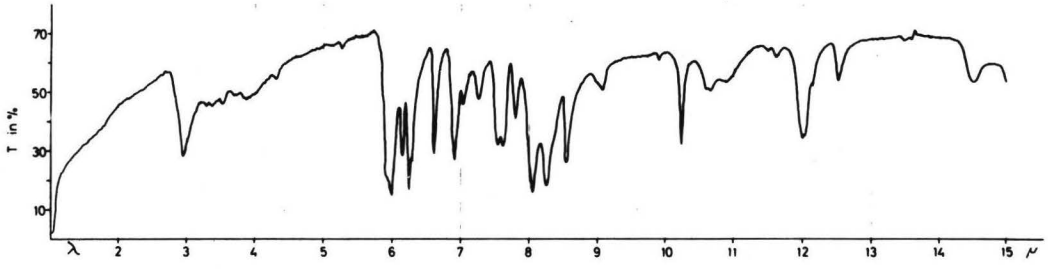


Abb. 7:

IR-Absorptions-spektrum der 4-Hydroxyzimtsäure

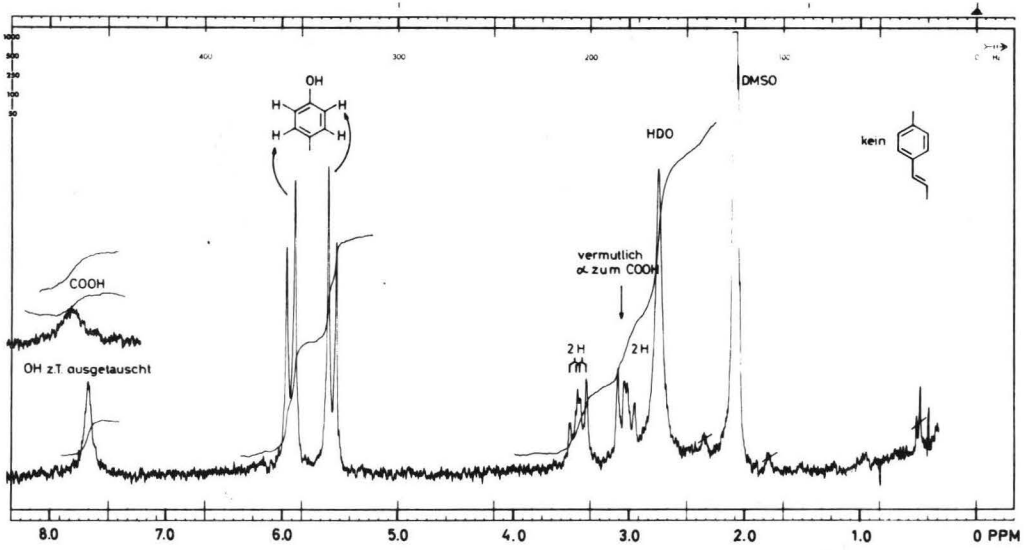


Abb. 8: NMR-Spektrum der 4,4'-Dihydroxytruxillsäure
(Bezugssubstanz: Tetramethylsilan)

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Molekulargewichtsbestimmung und Elementaranalyse sprechen dafür, daß es sich bei der neuen Substanz um ein Dimeres der 4-Hydroxyzimtsäure handelt.

Aus dem Vergleich des UV-Absorptionsspektrums mit dem der 4-Hydroxyzimtsäure (Abb. 5) kann geschlossen werden, daß der Chromophor der unbekannten Substanz gegenüber dem der 4-Hydroxyzimtsäure verkleinert ist (das Absorptionsmaximum ist hypsochrom verschoben).

Aus dem Vergleich des IR-Spektrums mit dem der 4-Hydroxyzimtsäure (Abb. 7) ergibt sich, daß die neue Substanz keine Äthylen-Doppelbindung besitzt (Interpretation nach SILVERSTEIN und BASSLER 1967) (s. Tab. 5).

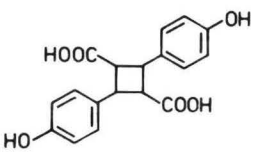
Tab. 5: Vergleich einiger Infrarot-Absorptionsbanden der 4-Hydroxyzimtsäure und der 4,4'-Dihydroxytruxillsäure

Herkunft der Bande	angegebener Bereich in µ	Genaue Lage in µ	
		4-Hydroxyzimtsäure	unbekannte Substanz
Disubstituierte trans-Olefine, tri- und tetraalkylsubstituierte Olefine	6,- - 6,1	6,-	-
Konjugation zwischen olefinischer Doppelbindung und Aromaten	5,99	6,-	-
disubstituierte trans-Olefine	6,o2 - 6,15	6,15	-
disubstituierte cis-Olefine	1o,2 - 1o,42 13,7 - 15,4	1o,22 14,5	- -

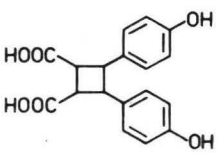
Das NMR-Spektrum läßt außerdem erkennen, daß der Aromat, genau wie im Falle der 4-Hydroxyzimtsäure, 1,4-disubstituiert ist.

Aus dem Gesagten folgt, daß es sich bei der neuen Substanz um eine Truxillsäure handelt. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung von LEHFELD (1922).

Von dieser Struktur sind zwei Isomere, und von diesen im einen Falle fünf und im anderen Falle sechs Konfigurationen formulierbar. Darauf dürfte das uneinheitliche chromatographische Verhalten der untersuchten Substanz zurückzuführen sein; weitere Arbeiten zur Strukturaufklärung unterblieben jedoch, weil die Entstehung von Truxillsäuren aus Zimtsäuren für die eigentliche Frage nach der Entwicklung differenzierter Stoff-Kollektive aus Zimtsäuren von untergeordneter Bedeutung ist (siehe Seite 36).



4,4'-Dihydroxytruxillsäure



4,4'-Dihydroxyisotruxillsäure
(4,4'-Dihydroxytruxinsäure)

Da die Hydroxyzimtsäuren im Boden vorwiegend in Lösung vorliegen, war es erforderlich, auf die in Lösung stattfindenden Reaktionen besonders ausführlich einzugehen. Auf Grund dessen wurde nun eine wässrige Lösung (2oo ppm) der 4-Hydroxyzimtsäure in einem Quarzgefäß dem Tageslicht ausgesetzt. Nach 3otägiger Bestrahlung konnte bei der chromatographischen Aufarbeitung der Lösung festgestellt werden, daß neue Substanzen entstanden waren; die erhaltenen Mengen waren jedoch sehr gering.

Zur Gewinnung größerer Mengen von Bestrahlungsprodukten wurden daher die folgenden Modellversuche mit einer Quecksilberniederdrucklampe durchgeführt (Emissionsspektrum siehe Abb. 9), die vornehmlich energiereiche UV-Strahlen emittiert.

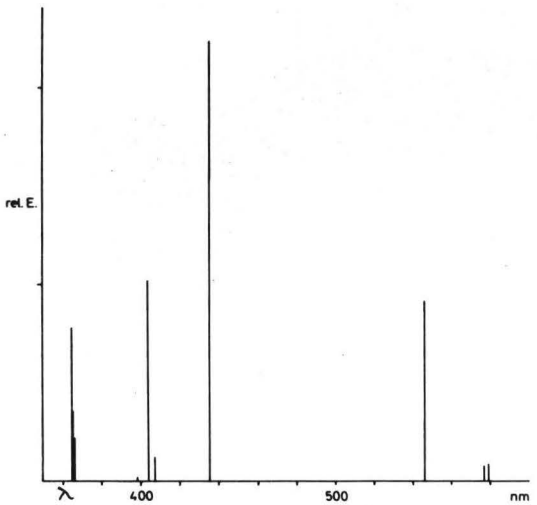
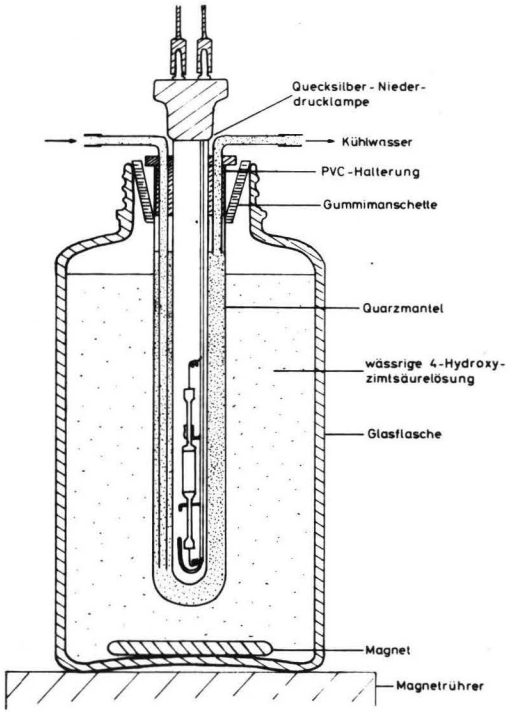


Abb. 9: Emissionsspektrum der Quecksilberniederdrucklampe S 81 der Firma Hanau

Als Ultraviolett-Lichtquelle diente die Labortauchlampe S 81 der Firma Hanau. Um thermische Reaktionen auszuschalten, wurde die Lampe mit einem wasserdurchströmten Kühlmantel aus Quarz umgeben. Die gesamte Vorrichtung befand sich innerhalb einer Dreiliter-Flasche und tauchte in die zu bestrahlende Lösung ein. Ein Magnetrührer sorgte für die kontinuierliche Durchmischung der Flüssigkeit. Die Anordnung des Versuchs ist in der Abb. 1o dargestellt.



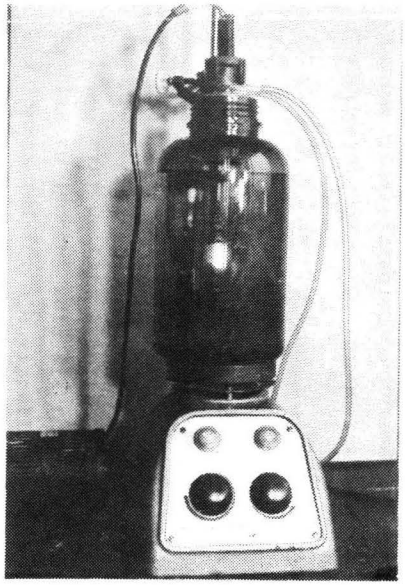


Abb. 1o: Versuchsanordnung für die Bestrahlung molekular disperser 4-Hydroxyzimtsäure

Bestrahlt wurden jeweils 2,5 Liter wässriger 4-Hydroxyzimtsäurelösung. Die Konzentration der Lösung wurde mehrfach variiert, vor allem sollte zunächst festgestellt werden, ob durch eine derartige Bestrahlung eine so gering konzentrierte Lösung, wie sie z.B. von WHITEHEAD (1964) als bodenmöglich angesehen wird (4×10^{-5} molar, d.h. ca. 6,4 ppm), Veränderungen unterliegt. Nachdem diese Frage positiv beantwortet war, erfolgte eine Konzentrationserhöhung; schließlich wurde mit einer 250 ppm-Lösung gearbeitet, da eine Anreicherung der Bestrahlungsprodukte auf diese Weise am besten erreicht werden konnte.

Die Bestrahlungsdauer wurde ebenfalls variiert; nachdem die ersten Bestrahlungen von 15 und 30 Minuten Dauer nur geringe Mengen Umwandlungsprodukte erbracht hatten, betrug schließlich die Reaktionszeit 75 Stunden.

Die Aufarbeitung der Bestrahlungsprodukte erfolgte in Anlehnung an die auf Seite 39 beschriebene Trennung des Bodeneluats, da Wert darauf gelegt wurde, die Bedingungen in beiden Fällen möglichst gleich zu halten.

Ergebnisse:

(Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Versuche mit 75stündiger Bestrahlung der 250 ppm-Lösungen).

Bereits während des Einengens der Lösung auf ca. 500 ml konnte die Bildung dunkelgefärbter Flocken beobachtet werden. Die Abtrennung dieser Flocken gelang mit Hilfe eines Blaubandfilters. Nach mehrtägiger Trocknung im Exsikkator über Phosphorpentoxid erhielten wir 1,8 mg (das sind rd. 0,29 % der eingesetzten 4-Hydroxyzimtsäure) Substanz, deren Infrarot-Spektrum darauf hindeutet, daß es sich um ein huminstoffähnliches Polymeres handelt (siehe Abb. 11).

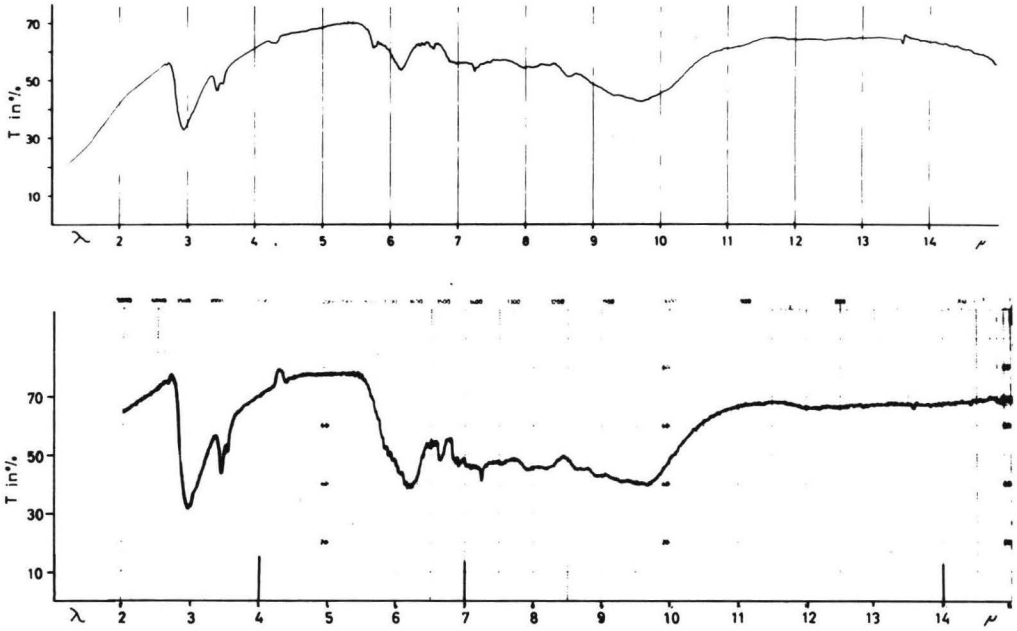


Abb. 11:

oben:
IR-Absorptionsspektrum des durch UV-Bestrahlung molekular disperser 4-Hydroxyzimtsäure erhaltenen Polymeren

unten:
IR-Absorptionsspektrum einer Niedermoortorf-Huminsäure

Damit ist bereits eine der eingangs gestellten Fragen positiv beantwortet: Aus einer Hydroxyzimtsäure können durch bodenmögliche abiologische Reaktionen huminstoffähnliche Körper entstehen.

Zur weiteren Auftrennung wurde der Lösung eine Menge entnommen, die von der Anfangskonzentration her berechnet, o,2 mg 4-Hydroxyzimtsäure enthielt. Nach Einengung dieser Menge auf o,1 ml und zweidimensionaler dünnschichtchromatographischer Auftrennung konnte die verbliebene 4-Hydroxyzimtsäure, nach cis- und trans-Form getrennt, photometrisch quantitativ bestimmt werden. Innerhalb des geprüften Zeitraums wurden danach nicht mehr als 4o % der eingesetzten 4-Hydroxyzimtsäuremenge umgesetzt, dabei lag sie zu 58 % in trans- und zu 42 % in cis-Form vor. Offenbar ist mit dieser Umsetzungsrate unter diesen Bedingungen ein Gleichgewichtszustand erreicht. (Auch nach 5o Stunden Bestrahlungsdauer sind bereits ca. 4o % umgesetzt.)

Da auch in diesem Falle nach einer den Schemata auf Seite 39 entsprechenden Vortrennung die Reaktionsprodukte in verschiedenen Fraktionen beobachtet werden konnten, sollen die aus allen Fraktionen hergestellten Chromatogramme im Anschluß gemeinsam behandelt werden.

Zu den dünnschichtchromatographischen Trennungen muß vorab bemerkt werden, daß sich zwei Verbindungsklassen von vornherein deutlich unterscheiden lassen:

a) Definierte, eindeutig isolierte und beschreibbare Verbindungen

b) In der Nähe des Startpunkts befindliche, nicht näher definierte Umsetzungsprodukte

Die folgenden Ausführungen betreffen nur die unter a) genannten Verbindungen.

Mit Hilfe der bereits auf Seite 42 beschriebenen zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Trennung lie-

ßen sich aus den Bestrahlungsansätzen 74 verschiedene Verbindungen isolieren. Da in dieser Zahl die cis- und trans-4-Hydroxyzimtsäure mit erfaßt sind, ist also festzustellen, daß aus der 4-Hydroxyzimtsäure durch energiereiche UV-Bestrahlung mindestens 72 Verbindungen neu gebildet werden; die Anzahl der mit den verschiedenen Reagenzien darstellbaren Substanzen ist wiederum aus einem VENN-Diagramm zu ersehen (s. Abb. 12).

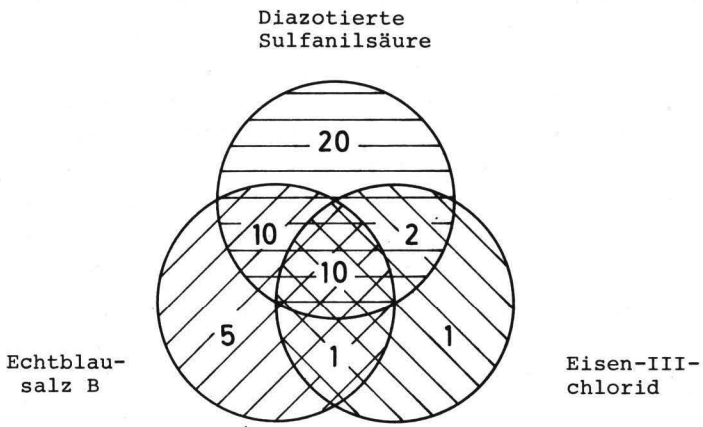


Abb. 12: VENN-Diagramm für drei Reaktionen an dem durch UV-Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure erhaltenen Stoffkollektiv

In diesem Zusammenhang erscheint es notwendig, auf das Problem der Auswertung zweidimensionaler Chromatogramme etwas näher einzugehen.

Auch bei weitgehender Konstanthaltung aller für die Trennung wichtigen Faktoren (Dünnschichtplatte, Laufmittel, Laufstrecke, Temperatur) sind die Trennergebnisse nicht völlig reproduzierbar, d.h. die R_f-Werte sind unterschiedlich. In den meisten Fällen kann jedoch eine eindeutige Zuordnung gleicher Substanzen dadurch erreicht werden, daß

alle R_f-Werte auf den einer Standardsubstanz bezogen werden, d.h. die an sich bereits relativen R_f-Werte werden noch einmal systemspezifisch relativiert.

Aber auch dieses Verfahren führt nur dann zu eindeutigen Ergebnissen, wenn die Anzahl der zu trennenden Verbindungen relativ gering ist und die einzelnen Verbindungen dementsprechend weite Abstände aufweisen. Ist die Anzahl der getrennten Verbindungen jedoch sehr groß, kann es schwierig werden, die auf zwei nacheinander von demselben Stoffgemisch angefertigten Chromatogrammen befindlichen Substanzen eindeutig einander zuzuordnen. Noch schwieriger wird es, wenn die Stoffgemische nicht gleich sind, sondern nur einige Substanzen gemeinsam enthalten.

Die eindeutige Zuordnung gleicher Substanzen auf verschiedenen Chromatogrammen gewinnt aber besonders dann an Bedeutung, wenn die Verbindungen nur in sehr geringen Mengen auftreten und deshalb über ihr Laufverhalten, ihre Farbe im UV-Licht und ihr Anfärbeverhalten mit verschiedenen Reagenzien charakterisiert werden müssen. Besonders der letzte Gesichtspunkt, die Prüfung des Verhaltens gegenüber verschiedenen Chemikalien, bereitet im Falle der zweidimensionalen Chromatogramme besondere Schwierigkeiten, da jedes einzelne Chromatogramm nur mit einem Reagenz besprüht werden kann.

Vergleichsweise einfach ist die Zuordnung nur in solchen Fällen, in denen die Färbungen im Tages- oder UV-Licht so charakteristisch sind, daß keine Verwechslungen vorkommen können.

Die einzelnen Identitätskriterien waren deshalb in zeitraubenden und mühsamen Vergleichen zu sichern, da im Rahmen der gestellten Aufgabe versucht werden mußte, unter alleiniger Anwendung der genannten Kriterien einen Vergleich der aus dem Boden isolierten organischen Substanzen mit denen vorzunehmen, die durch die UV-Bestrahlung aus der 4-Hydroxyzimtsäure entstanden waren.

Zur Zuordnung der auf verschiedenen zweidimensionalen Chromatogrammen isolierten Substanzen wurde in der folgenden Weise vorgegangen:

a) Die R_f-Werte aller Verbindungen wurden relativ zur trans-4-Hydroxyzimtsäure angegeben, wobei diese für beide Trennsysteme die Werte 1oo erhielt.

Für die Wahl der trans-4-Hydroxyzimtsäure als Bezugssubstanz war maßgebend, daß sie einerseits durch ihre deutliche UV-Absorption bei 254 nm deutlich zu erkennen, andererseits auf jedem Chromatogramm zu finden war und schließlich auch auf Grund ihrer in beiden Systemen im Hinblick auf die anderen Verbindungen relativ hohen R_f-Werte als Bezugssubstanz brauchbar erschien.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Entfernung vom Start zum Fleckenmittelpunkt} \times 100}{\text{Entfernung vom Start zur Mitte der trans-4-Hydroxyzimtsäure}} = R_{f\text{-}tr}$$

b) Unter Benutzung der errechneten $R_{f\text{-}tr}$-Werte wurden die isolierten Substanzen in ein Koordinatensystem eingetragen, in dem die Ordinate dem Trennsystem Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure und die Abszisse dem System Chloroform/Eisessig/Wasser entsprachen.

c) Die in dem Koordinatensystem benachbarten Verbindungen wurden dann an Hand der zusätzlich verfügbaren Kriterien miteinander verglichen und - bei Übereinstimmung - als identisch angesehen.
Die Streuung der $R_{f\text{-}tr}$-Werte geht in zwei Fällen gegen Null: Am Startpunkt ($R_{f\text{-}tr}$ o/o) und im Falle der trans-4-Hydroxyzimtsäure selbst ($R_{f\text{-}tr}$ 100/100). Je weiter sich die Werte von diesen beiden entfernen, desto größer ist die Streuung; das war bei $R_{f\text{-}tr}$ 50/50 und in "Frontnähe" der Fall. Bei der Auswertung mußte dieser Gesichtspunkt berücksichtigt werden; das geschah im wesentlichen durch Vergleich mit der Streuung von Testverbindungen.

Die Ergebnisse für zwei willkürliche Stichprobenkollektive aus 6 und 13 Spezies sind in zwei Abbildungen wiedergegeben. In der Abbildung 13 ist jede Verbindung einzeln mit ihren genauen Koordinaten dargestellt. Aus dem Boden isolierte Verbindungen sind durch ein Fünfeck, durch Bestrahlung aus der 4-Hydroxyzimtsäure entstandene durch einen Kreis gekennzeichnet. Alle Verbindungen, die nach dem erwähnten Verfahren als identisch anzusehen sind, wurden mit der gleichen Zahl bezeichnet.

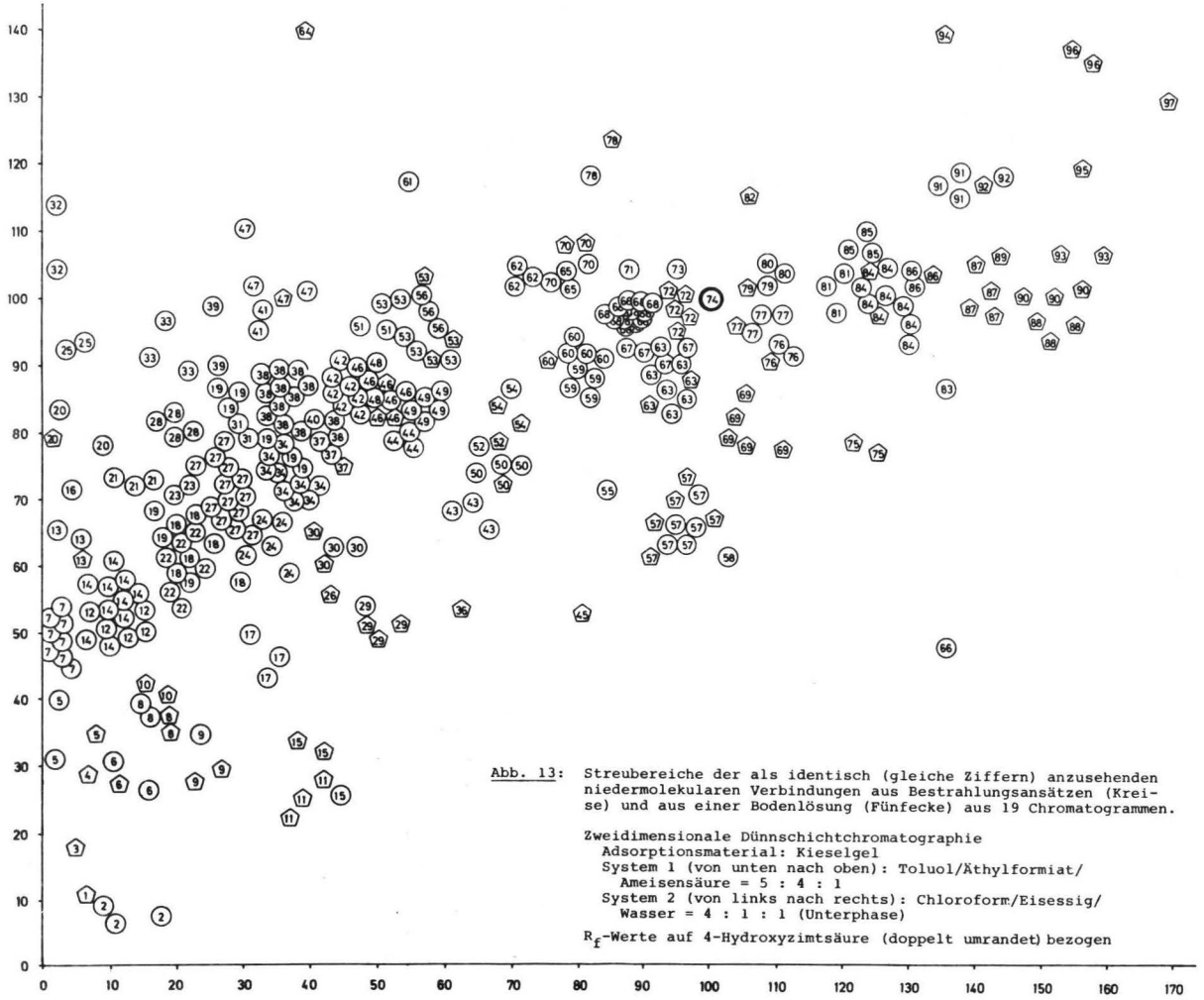


Abb. 13: Streubereiche der als identisch (gleiche Ziffern) anzusehenden niedermolekularen Verbindungen aus Bestrahlungsansätzen (Kreise) und aus einer Bodenlösung (Fünfecke) aus 19 Chromatogrammen.

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
Adsorptionsmaterial: Kieselgel
System 1 (von unten nach oben): Toluol/Äthylformiat/
Ameisensäure = 5 : 4 : 1
System 2 (von links nach rechts): Chloroform/Eisessig/
Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase)

R_f-Werte auf 4-Hydroxyzimtsäure (doppelt umrandet) bezogen

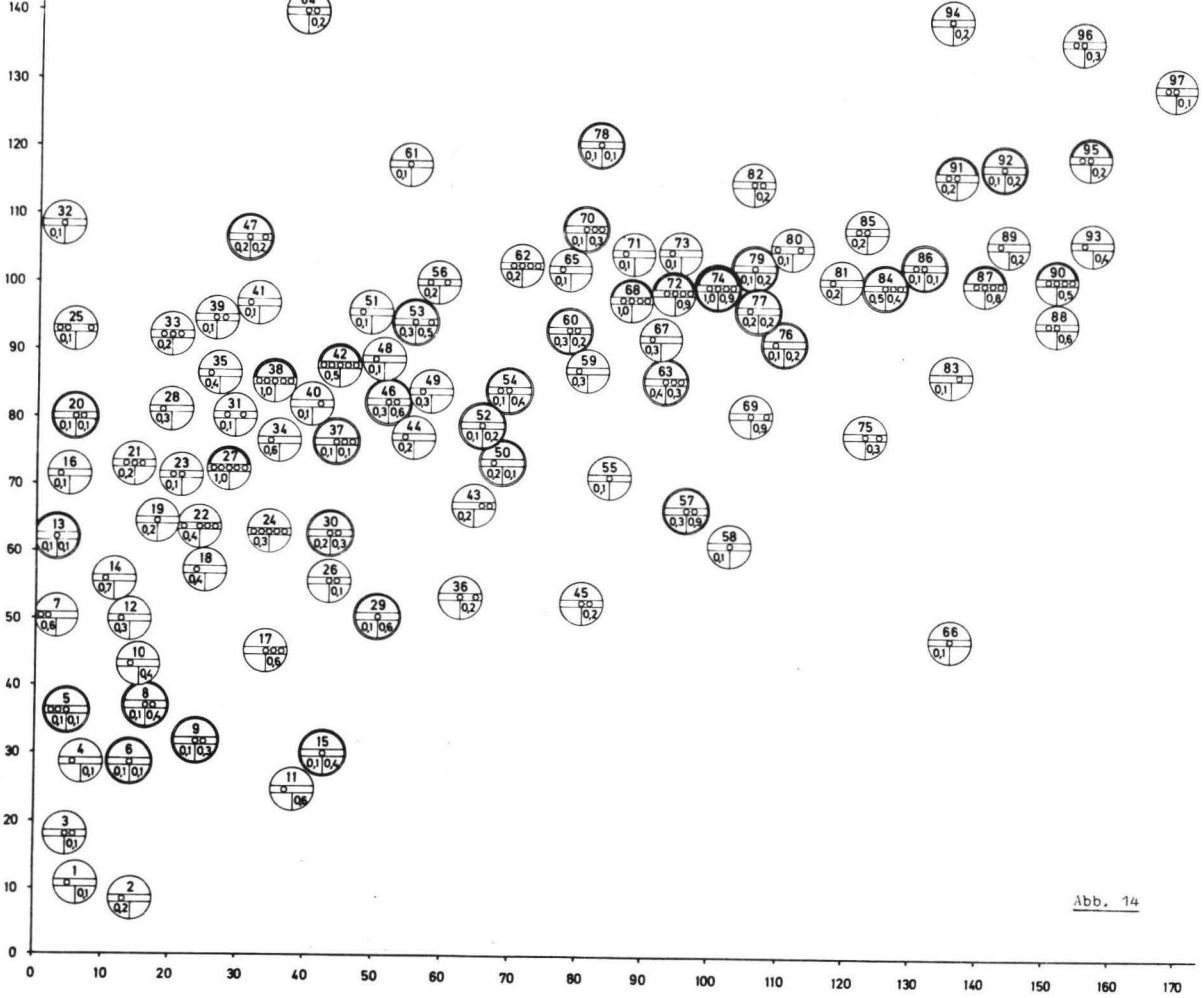


Abb. 14

Abb. 14: Zuordnung und Klassifikation der gesamten aus einer Bodenlösung und durch UV-Bestrahlung molekular disperser 4-Hydroxyzimtsäure erhaltenen niedermolekularen Verbindungen in einem zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramm.

Zeichenerklärung:

Zahl im oberen Halbkreis:	lfd. Nr.
Zahl im unteren Halbkreis links:	Häufigkeit des Auftretens in Bestrahlungsansätzen
Zahl im unteren Halbkreis rechts:	Häufigkeit des Auftretens in der Bodenlösung
Doppelkreis:	Die Verbindung konnte sowohl aus dem Boden als auch aus Bestrahlungsansätzen isoliert werden.
Oberer Halbkreis ausgefüllt:	Die Verbindung wurde identifiziert

27 = Aesculetin
38 – 42 = cis- und trans- 3,4-Dihydroxyzimtsäure
68 = cis-4-Hydroxyzimtsäure
72 = 4-Hydroxybenzoesäure
74 = trans-4-Hydroxyzimtsäure
87 = 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure
9o = 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure
91 = 4-Hydroxyzimtsäuremethyl- bzw.-äthylester
95 = 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd

Die kleinen Kreise unter den laufenden Nummern weisen auf die beobachteten Farben hin. Die Positionen bedeuten von links nach rechts: Farbe im Tageslicht
Farbe im UV-Licht
Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure
Farbreaktion mit Echtblausalz B
Farbreaktiom mit Eisen-III-Chlorid

Bei leerer Position war keine Färbung festzustellen.

Der besseren Übersichtlichkeit halber ist der gleiche Sachverhalt nach den Identitätskriterien bereinigt, noch einmal in der Abbildung 14 dargestellt. Hier sind alle aufgetretenen und als identisch anzusehenden Verbindungen durch einen Kreis bezeichnet. In jedem Kreis ist in der oberen Hälfte die laufende Nummer in Übereinstimmung mit der Abb. 13 eingetragen; die untere Hälfte ist geteilt, die links eingetragene Zahl gibt die relative Häufigkeit ihres Auftretens bzw. Auffindens in den Bestrahlungsprodukten der 4-Hydroxyzimtsäure an, die rechts eingetragene Zahl die relative Häufigkeit ihres Auftretens im Bodeneluat. Zwischen der oberen und den unteren Zahlen sind die zusätzlich zu den beiden R_f-Koordinaten ermittelten anderen Identitätskriterien angegeben, von links nach rechts: Farbe im Tageslicht, Farbe im UV-Licht, Färbung mit diazotierter Sulfanilsäure, Färbung mit Echtblausalz, Färbung mit Eisen-III-Chlorid.

Verbindungen, die sowohl im Bodeneluat als auch im Bestrahlungsansatz nachgewiesen werden konnten, sind mit einem Doppelkreis versehen.

Die Anzahl dieser in beiden Kollektiven enthaltenen Substanzen geht aus dem folgenden VENN-Diagramm hervor.

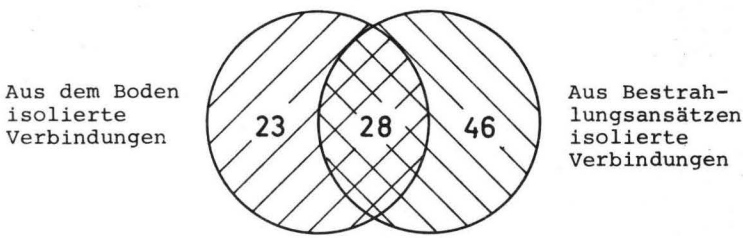


Abb. 15: VENN-Diagramm für die nach den verwendeten Kriterien gemeinsam in der Bodenlösung und Bestrahlungsansätzen der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure auftretenden Verbindungen.

Alle in den Abb. 13 und 14 dargestellten Verbindungen sind mit ihrem Farbverhalten in der Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Beschreibung von Farbreaktionen der aus dem Boden isolierten und der durch UV-Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure erhaltenen Verbindungen

A = allein aus dem Boden isoliert
B = allein im Bestrahlungsansatz der 4-Hydroxyzimtsäure nachgewiesen
C = sowohl aus dem Boden isoliert als auch im Bestrahlungsansatz der 4-Hydroxyzimtsäure nachgewiesen

lfd. Nr.	Auftreten	Farbe im		Farbreaktion mit		
		Tageslicht	UV-Licht 254 nm / 35o nm	Diazotierter Sulfanilsäure	Echtblausalz B	Eisen-III-chlorid
1	A	-	blau	-	-	-
2	B	-	grüngelb	-	-	-
3	A	-	-	braun	braun	-
4	A	-	dunkelblau	-	-	-
5	C	gelbgrau	gelb	rot	-	-
6	C	-	-	rotgelb	-	-
7	B	grau	gelbgrün	-	-	-
8	C	-	-	gelbrot	rot	-
9	C	-	-	gelb	gelbbraun	-
1o	A	-	blau	-	-	-
11	A	-	grüngelb -	-	-	-
12	B	-	hellblau	-	-	-
13	C	-	-	gelb	-	-
14	B	-	weißblau	-	-	-
15	C	-	-	gelb	-	-
16	B	-	absorbiert	-	-	-
17	A	-	-	gelb	braun	gelb
18	B	-	gelb	-	-	-
19	B	-	-	gelbbraun	-	-
2o	C	-	-	rotbraun	grau	-
21	B	-	weißblau	braun	braun	-
22	B	grau	-	gelb	braun	blau
23	B	-	gelb	braun	-	-
24	B	braungrau	dunkelgrün	rotbraun	gelbbraun	braun

Tab. 6: Fortsetzung

lfd. Nr.	Auf-treten	Farbe im			Farbreaktion mit		
		Tageslicht	UV-Licht 254 nm	UV-Licht 35o nm	Diazotierter Sulfanilsäure	Echtblau-salz B	Eisen-III-chlorid
25	B	gelb	weißblau		-	-	blaßbraun
26	A	-	-		gelb	rot	-
27	B	olivgrün	weißblau		rotbraun	braun	blau
28	B	-	gelb		-	-	-
29	C	-	-		braungelb	-	-
3o	C	-	-		gelb	rot	-
31	B	-	grüngelb		-	gelb	-
32	B	-	-		gelb	-	-
33	B	-	gelb		braun	rot	-
34	B	-	hellblau		-	-	-
35	B	-	weißblau		-	-	-
36	A	-	-		braun	-	rot
37	C	-	-		gelb	braun	gelbbraun
38	B	graugrün	weißblau	-	rotbraun	braun	blau
39	B	-	-		gelb	gelb	-
4o	B	-	-		-	gelb	-
41	B	-	blau		-	-	-
42	B	graugrün	weißblau	-	rotbraun	braun	blau
43	B	-	-		-	graublau	gelb
44	B	-	absorb.	-	-	-	-
45	A	-	-		gelb	braun	-
46	C	-	-		gelb	gelb	-
47	C	-	-		gelb	-	rot
48	B	-	hellblau		-	-	-
49	B	-	hellblau		-	-	-
5o	C	-	gelb		-	-	-
51	B	-	blau		-	-	-
52	C	-	-		rotviolett	-	-
53	C	-	-		gelb	-	rot
54	C	-	blau		gelb	-	-
55	B	-	-		rotviolett	-	-
56	B	-	gelb		-	blaßbraun	-
57	C	-	-		gelb	graublau	-

Tab. 6: Fortsetzung

lfd. Nr.	Auftreten	Farbe im		Farbreaktion mit		
		Tageslicht	UV-Licht 254 nm / 350 nm	Diazotierter Sulfanilsäure	Echtblausalz B	Eisen-III-chlorid
58	B	-	-	gelb	-	-
59	B	-	hellblau	-	-	-
60	C	-	-	braun	graubraun	-
61	B	-	-	grüngelb	-	-
62	B	-	hellblau	braun	rotviolett	gelb
63	C	-	-	gelb	rotviolett	braun
64	A	-	-	gelb	braun	-
65	B	-	hellblau	-	-	-
66	B	-	-	gelb	-	-
67	B	-	gelbgrün	-	-	-
68	B	-	absorb. / absorb.	rotgelb	blauviolett	schwach rot
69	A	-	-	gelb	-	rot
70	C	-	-	gelbbraun	braun	gelbbraun
71	B	-	hellblau	-	-	-
72	A	-	violett / -	gelbbraun	dunkelrot	gelb
73	B	-	hellblau	-	-	-
74	C	-	absorb. / violett	rotgelb	blauviolett	schwach rot
75	A	-	-	gelb	-	gelb
76	C	-	weißblau	-	-	-
77	C	-	gelbgrün	-	-	-
78	C	-	-	gelb	-	-
79	C	-	-	gelb	-	-
80	B	rot	-	-	rot	-
81	B	-	gelbbraun	-	-	-
82	A	-	-	gelb	braun	-
83	B	-	-	-	graublau	-
84	C	-	-	rotgelb	rotviolett	grau
85	B	-	absorb.	gelb	-	-
86	C	-	braun	gelb	-	-
87	A	-	hellblau	rotviolett	schwarzbraun	dunkelrot

Tab. 6: Fortsetzung

lfd. Nr.	Auf-treten	Farbe im			Farbreaktion mit		
		Tageslicht	UV-Licht 254 nm	UV-Licht 35o nm	Diazotierter Sulfanilsäure	Echtblau-salz B	Eisen-III-chlorid
88	A	-	hellblau		gelb	-	-
89	A	-	blau		-	-	-
9o	A	-	blau		gelbbraun	blauviolett	schwach gelb
91	B	-	absorb.		gelbbraun	gelb	-
92	C	-	-		gelb	-	-
93	A	-	absorb.		-	-	-
94	A	-	-		gelb	-	-
95	A	-	absorb.	-	rostrot	-	-
96	A	-	gelb		rot	-	-
97	A	-	grün		gelb	-	-

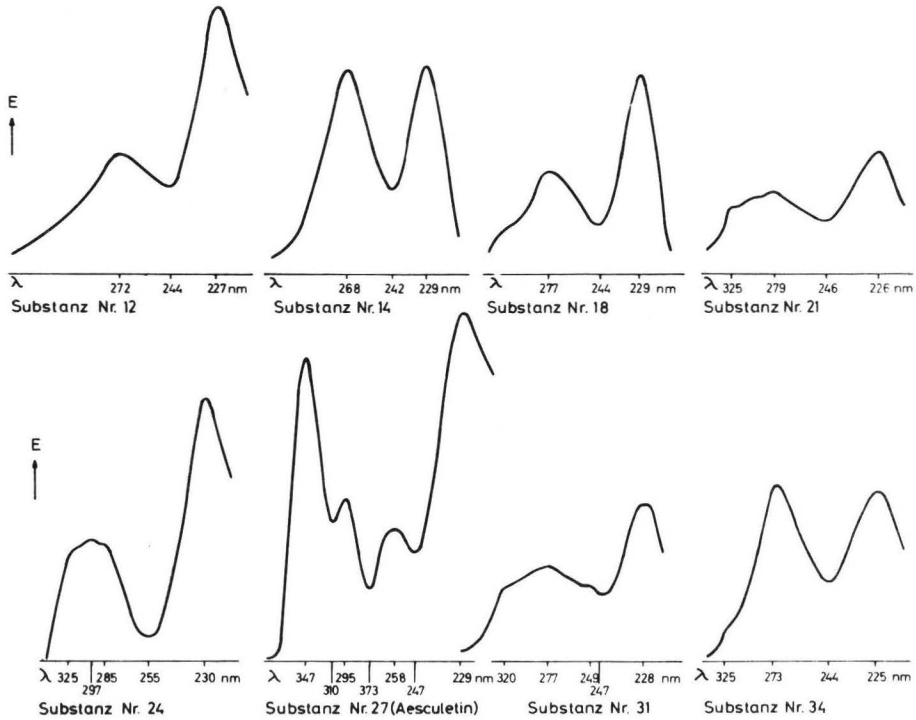


Abb. 16: UV-Absorptionsspektren einiger durch UV-Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure entstandenen Verbindungen in Methanol

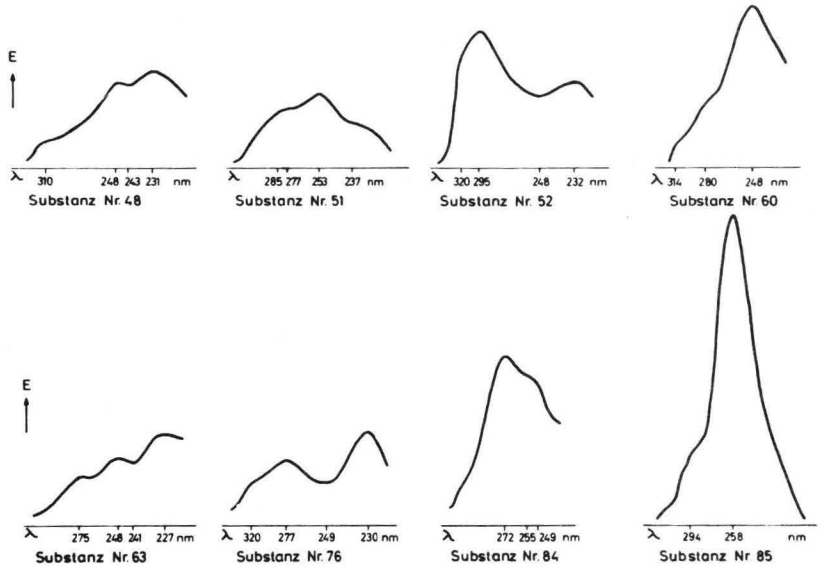
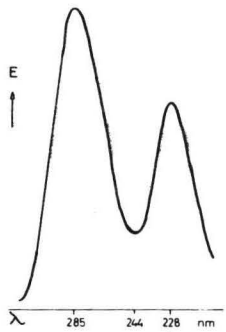
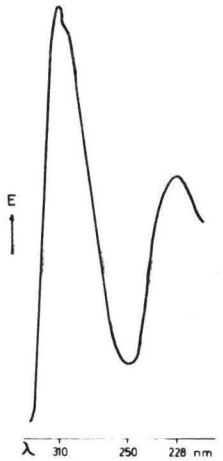


Abb. 17: UV-Absorptionsspektren einiger durch UV-Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure entstandenen Verbindungen in Methanol



Substanz Nr. 86



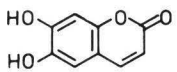
Substanz Nr. 91
(4-Hydroxyzimtsäure-
methyl- bzw. äthylester)

Abb. 18: UV-Absorptionsspektren einiger durch UV-Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure entstandenen Verbindungen in Methanol

Aus den Bestrahlungsansätzen konnten 18 Verbindungen so weit angereichert werden, daß die Aufnahme eines brauchbaren UV-Spektrums möglich wurde; diese Spektren sind mit den laufenden Nummern der Abbildungen 13 und 14 in den Abbildungen 16, 17 und 18 zusammengestellt.

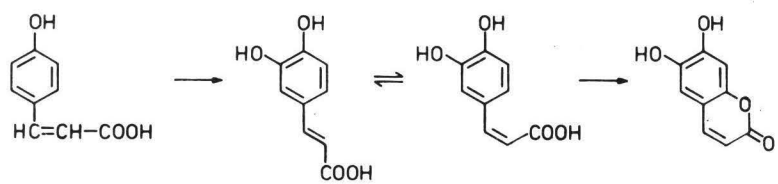
Bereits nach den ersten Bestrahlungsversuchen, d.h. nach nur kurzer Bestrahlungsdauer, trat eine deutlich weißblau fluoreszierende Substanz besonders hervor.Es handelte sich um die Verbindung Nr. 27. Sie konnte aufgrund ihres UV-Absorp-

tionsspektrums und aller anderen hier erwähnten Kriterien als Aesculetin identifiziert werden. Eine quantitative Berechnung durch Bestimmung der UV-Absorption bei 347 nm ergab, daß nach 75stündiger Bestrahlung einer wässrigen 4-Hydroxyzimtsäurelösung (25o ppm), 1,1 % der eingesetzten 4-Hydroxyzimtsäure in Aesculetin umgewandelt waren.



Aesculetin

Schlüssig konnten ebenfalls die Verbindungen Nr. 38 und 42 als cis- und trans-3,4-Dihydroxyzimtsäure identifiziert werden; allerdings reichten die isolierten Mengen nicht zur Aufnahme von UV-Spektren. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß die 3,4-Dihydroxyzimtsäure, welche als Zwischenstufe der Aesculetinbildung aus 4-Hydroxyzimtsäure angesehen werden muß, sehr schnell umgesetzt wird.



cis- und trans-4-Hydroxy-zimtsäure | trans-3,4-Dihydroxy-zimtsäure | cis-3,4-Dihydroxy-zimtsäure | Aesculetin

Bemerkenswert ist weiterhin die Verbindung Nr. 91, die in allen ihren Eigenschaften mit einem aus der 4-Hydroxyzimtsäure durch Methylierung mit Diazomethan entstandenen Produkt übereinstimmte. Bei diesem Produkt handelt es sich um den Methylester der 4-Hydroxyzimtsäure (IR-Spektren s. Abb. 19).

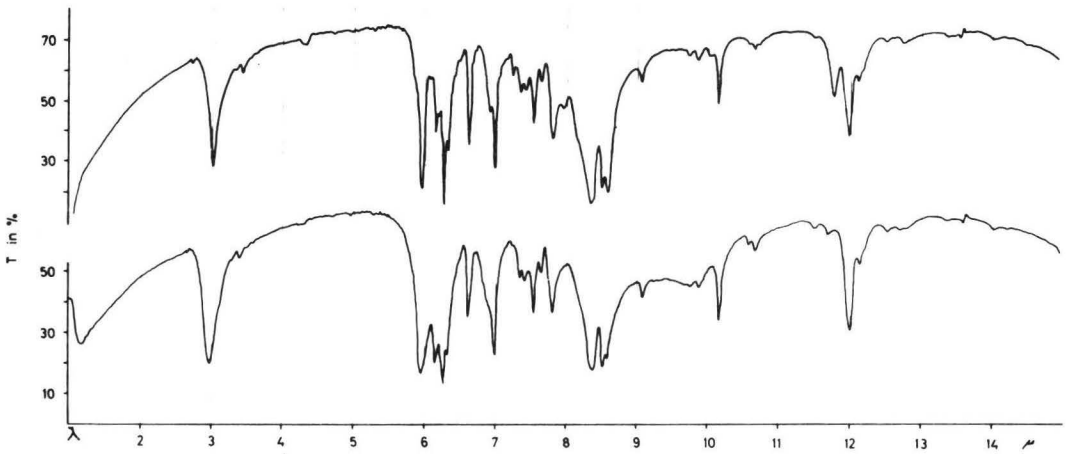


Abb. 19: oben: IR-Absorptionsspektrum des aus den in Methanol überführten Bestrahlungsansätzen isolierten 4-Hydroxyzimtsäuremethylesters
unten: IR-Absorptionsspektrum des durch Methylierung der 4-Hydroxyzimtsäure mit Diazomethan erhaltenen 4-Hydroxyzimtsäuremethylesters

Wie sich herausstellte, ist der 4-Hydroxyzimtsäuremethylester in diesem Falle jedoch ein Artefakt; er bildet sich nur dann, wenn die Bestrahlungsprodukte in Methanol aufgenommen werden. Befinden sich die Bestrahlungsprodukte längere Zeit (14 Tage) in methanolischer Lösung, kann eine so deutliche Zunahme dieser Substanz gegenüber allen anderen festgestellt werden, daß sie schließlich die Menge der zunächst gebildeten Bestrahlungsprodukte übersteigt.

Um die Entstehung dieses Produkts zu vermeiden, wurde bei den anschließenden Versuchen auf die Überführung der Bestrahlungsprodukte in Methanol verzichtet und allein mit Diäthyläther gearbeitet.

Trotzdem war wieder die Substanz Nr. 91 zu finden; auffälligerweise konnte nun zusätzlich das Auftreten gleicher Mengen der Substanz Nr. 85 beobachtet werden. Da in diesem Fall die Entstehung des 4-Hydroxyzimtsäuremethylesters ausgeschlossen ist, dafür jedoch u.U. mit der Bildung des 4-Hydroxyzimtsäureäthylesters gerechnet werden kann, wurden auch dessen Eigenschaften überprüft; es stellte sich heraus, daß der 4-Hydroxyzimtsäureäthylester bei den von uns angewandten Methoden weder im chromatographischen noch im Anfärbeverhalten vom 4-Hydroxyzimtsäuremethylester abweicht; die UV-Absorptionsspektren sind ebenfalls identisch.

Besonders hervorgehoben werden sollte noch die Tatsache, daß in keinem Ansatz die auf Seite 54 beschriebene 4,4'-Dihydroxytruxillsäure gefunden werden konnte; diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von STOBBE und BREMER (1929).

Eine schematische Darstellung der durchgeführten Bestrahlungsversuche findet sich in der Abb. 2o.

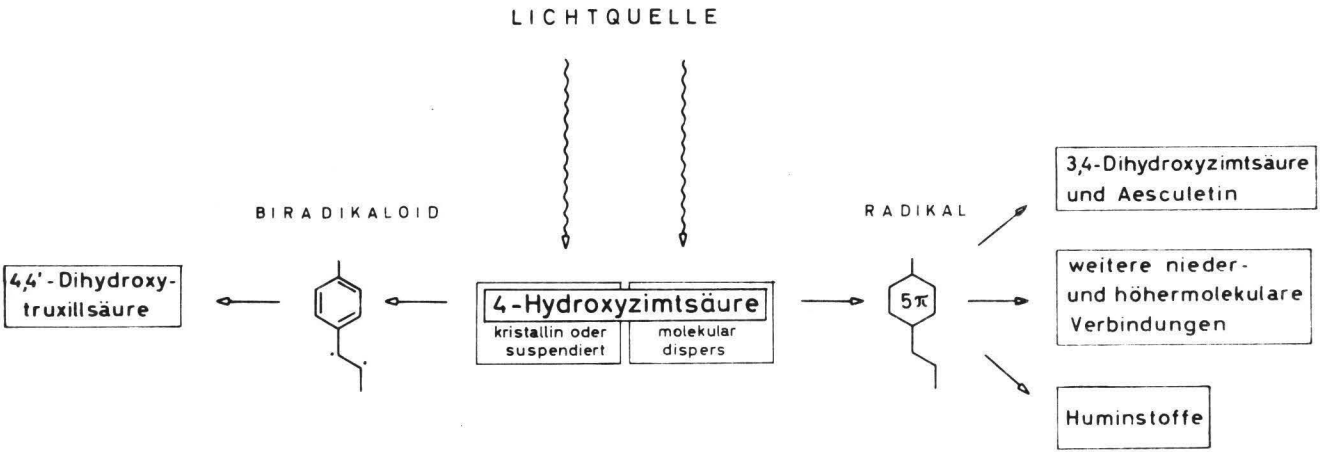


Abb. 2o: Scheratische Darstellung der durchgeführten Bestrahlungsversuche

2.3. Mikrobiologische Untersuchungen

Zur Beantwortung der eingangs gestellten Fragen war noch zu prüfen, wie die bei der Photoreaktion entstandenen Verbindungen auf Mikroorganismen des Bodens wirken. Dabei erschien es sinnvoll, nicht mit isolierten Stämmen zu arbeiten, sondern mit einem Mikroorganismengemisch eines tätigen, ligninabbauenden Bodens.

Zu diesem Zweck wurden dem A_h-Horizont des bereits auf S. 38 näher beschriebenen Bodens unter Zuhilfenahme steriler Reagenzgläser im Januar Proben entnommen. Im Anschluß an die Probenentnahme wurde aus 1 g Boden und 100 ml sterilem Wasser durch einstündiges Schütteln eine Suspension hergestellt, die zum Beimpfen der Nährböden bzw. Nährsuspensionen diente.

Die benutzte Nährlösung war so gewählt, daß sie einer großen Vielfalt von Mikroorganismen Wachstum ermöglichen konnte; als C-Quelle diente Glucose.

Zusammensetzung der Nährlösung:

100 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 50 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 10 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 100 mg KCl, 10 mg Hefeextrakt, 500 mg NH_4NO_3, 250 µl Hoagland-Spurenelementlösung, 5 g Glucose, 200 ml 1/15 M PO_4-Puffer pH 7, 800 ml H_2O.

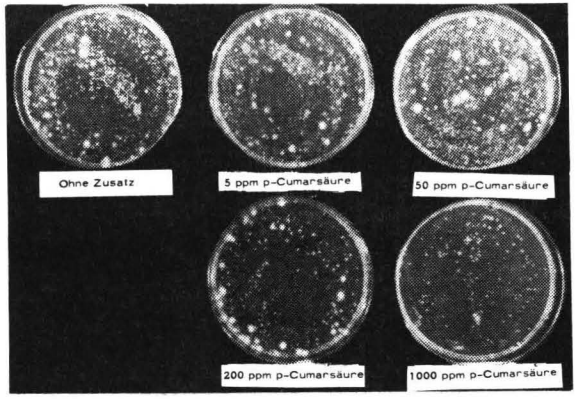
Zur Herstellung der Nährböden wurde 1,5 % Agar hinzugesetzt.

In den ersten Versuchen wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen der 4-Hydroxyzimtsäure, der 4,4'-Dihydroxytruxillsäure und des Bestrahlungsansatzes molekular disperser 4-Hydroxyzimtsäure auf das Wachstum der Bodenmikroorganismen geprüft; dabei entsprach die Zusammensetzung

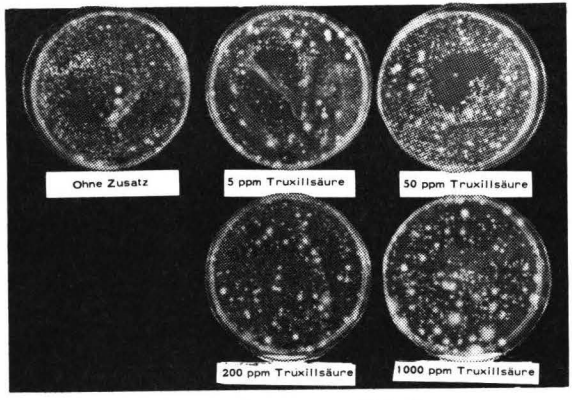
des Substanzgemisches aus dem Bestrahlungsansatz den zuvor gemachten Angaben; d.h. es enthielt neben den größtenteils unbekannten Bestrahlungsprodukten rd. 6o % 4-Hydroxyzimtsäure und ca. 1,1 % Aesculetin. Da die wässrige Lösung direkt geprüft wurde (ohne zwischenzeitliche Überführung in Methanol oder Diäthyläther) enthielt es nicht die Substanzen Nr. 85 und 91.

Im Falle der 4,4'-Dihydroxytruxillsäure konnte auf Grund der geringen Löslichkeit keine Lösung hergestellt werden; die Substanz wurde in Form einer Suspension geprüft. Um eine Suspension handelte es sich auch im Falle der hoch konzentrierten 4-Hydroxyzimtsäure. Die benutzten Petrischalen enthielten je 18 ml Nährlösung mit o, 5, 5o, 2oo und 1.ooo ppm der zu prüfenden Substanz bzw. des zu prüfenden Substanzgemisches. Zur Beimpfung der Schalen dienten je o,1 ml der oben beschriebenen Bodensuspension, die mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels und eines Drehtisches möglichst gleichmäßig verteilt wurden. Die Versuchsreihe wurde mit drei Parallelen durchgeführt.

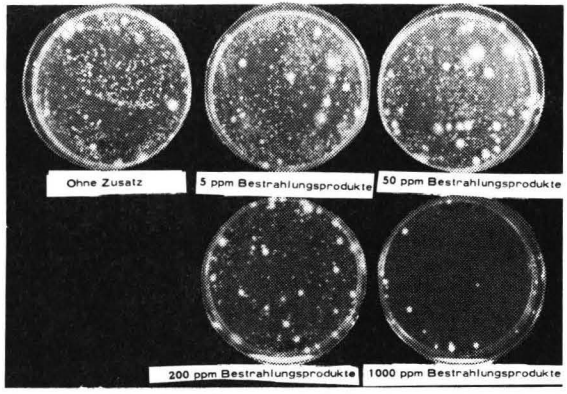
Das Ergebnis der siebentägigen Bebrütung bei 28°C ist in der Abb. 21 dargestellt. Diese läßt erkennen, daß alle drei Substanzen in geringen Konzentrationen (5 ppm) das Wachstum der Mikroorganismen fördern. Bei steigenden Konzentrationen zeigt sich ein Unterschied in der Wirkung der 4,4'-Dihydroxytruxillsäure und der beiden anderen Proben: Die 4,4'-Dihydroxytruxillsäure wirkt weiterhin, auch bei der höchsten gegebenen Menge, fördernd auf das Wachstum der Bodenmikroorganismen, während sowohl die 4-Hydroxyzimtsäure als auch das Gemisch aus 4-Hydroxyzimtsäure und den Bestrahlungsprodukten deutlich hemmend wirken, die Bestrahlungsprodukte offensichtlich stärker als die 4-Hydroxyzimtsäure allein.



4-Hydroxyzimtsäure



4,4'-Dihydroxytruxillsäure



Bestrahlungsprodukte
(molekular dispers)

Abb. 21:

Wirkung verschiedener Konzentrationen der 4-Hydroxyzimtsäure und deren Folgeprodukte auf gemischte Mikroorganismenkulturen (Darstellung der Petrischalen)

Zur Ermöglichung quantitativer Aussagen dienten die folgenden Versuche, die mit Hilfe der Nährkartonscheibenmethode durchgeführt wurden.

Da es inzwischen gelungen war, Aesculetin als ein wesentliches Bestrahlungsprodukt der 4-Hydroxyzimtsäure zu identifizieren, wurde in diesem Falle zusätzlich zu den anderen Substanzen auch reines Aesculetin herangezogen; wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit konnte es allerdings auch nur, wie die 4,4'-Dihydroxytruxillsäure, als Suspension geprüft werden.

In diesem Falle wurden je lo ml Nährlösung mit o,l ml einer in der oben beschriebenen Weise hergestellten Bodensuspension beimpft und 24 Stdn. in sterilen Erlenmeyer-Kolben bei 28°C bebrütet. Anschließend wurden jedem Kolben o,5 ml entnommen, diese mit sterilem Wasser im Verhältnis 1 : lo verdünnt und durch die Membranfilter (Nährkartonscheibenmethode) der Fa. Sartorius gesaugt. Nach 6Ostündiger Bebrütung dieser Scheiben bei 28°C ergab die Auszählung der Kolonien die in Tab. 7 angegebenen Werte (s.a. Abb. 22).

Tab. 7: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung an gemischten Mikroorganismenkulturen nach Einwirkung von 4-Hydroxyzimtsäure und deren Folgeprodukten

	ppm					
	0	5	5o	25o	5oo	1.ooo
4-Hydroxyzimtsäure	376	672	1.o68	548	82	19
4,4'-Dihydroxy-truxillsäure	225	736	1.356	1.188	1.128	3.548
Bestrahlungs-produkte	54o	1.o96	6o8	32	3o	28
Aesculetin	4o4	76o	544	74	16	19

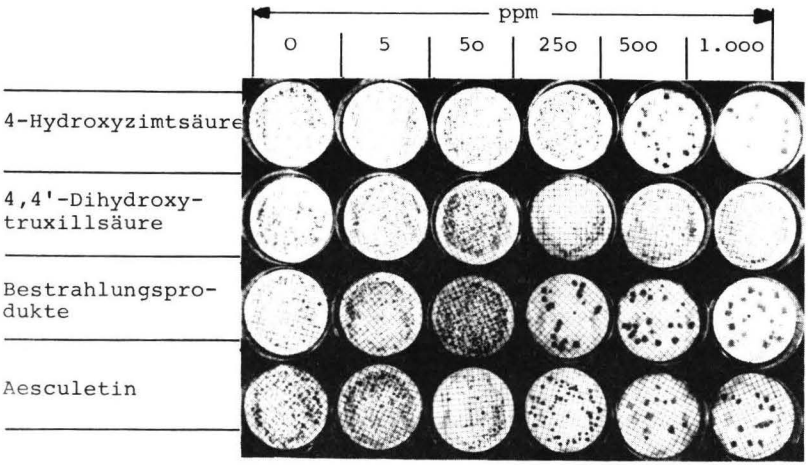


Abb. 22: Wirkung verschiedener Konzentrationen der 4-Hydroxyzimtsäure und deren Folgeprodukten auf gemischte Mikroorganismenkulturen (Darstellung der Nährkartonscheiben)

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen des ersten Versuchs: Die 4,4'-Dihydroxytruxillsäure fördert das Wachstum der Bodenmikroorganismen, während sowohl die 4-Hydroxyzimtsäure selbst, als auch die aus ihr durch energiereiche UV-Strahlung entstandenen Verbindungen nur in geringen Konzentrationen das Wachstum fördern. In höheren Konzentrationen wirken sie dagegen stark hemmend; im Falle der Bestrahlungsprodukte und des Aesculetins setzt die Hemmung bereits bei einer Konzentration von 25o ppm ein, während sie im Falle der 4-Hydroxyzimtsäure erst bei 5oo ppm beginnt; bei hohen Konzentrationen scheint die Hemmung einen konstanten Wert anzunehmen.

3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit sollte die folgenden Fragen klären:

1. Können bodenmögliche Hydroxyzimtsäuren durch abiologische Reaktionen (Ein-Elektronübergänge) in ein Spektrum niedermolekularer Stoffe verwandelt werden?
2. Besitzt dieses Stoffspektrum Gemeinsamkeiten mit dem Stoffspektrum, das bisher zwar aus Böden isoliert, aber nicht identifiziert werden konnte?
3. Können diese Substanzen abiologisch zu höhermolekularen, huminstoffähnlichen Strukturen polymerisieren?
4. Wie wirken diese Substanzen auf die Mikroorganismen eines natürlichen Bodens?

Zur Beantwortung dieser Fragen schien es angebracht zu sein, die an sich bereits mehrfach beschriebene Auftrennung des Stoffspektrums freier Inhaltsstoffe eines natürlichen Bodens erneut vorzunehmen. Obgleich dabei keine wesentlich neuen Ergebnisse zu erwarten waren, war es doch notwendig, diese Auftrennung durchzuführen, damit die zahlreichen, bisher unidentifiziert gebliebenen Stoffe nach der von uns benutzten Methode eindeutig charakterisiert werden konnten.

Sicherlich hätte die Möglichkeit bestanden, mit anderen Extraktionsmethoden größere Mengen dieser Substanzen zu isolieren, und damit wäre es vermutlich gelungen, zusätzliche Identitätskriterien, z.B. UV-Absorptionsspektren, zu gewinnen. Im Zusammenhang mit den von uns gestellten Fragen schien es uns jedoch wichtiger zu sein, auf diesen Vorteil zu verzichten, um die Gewähr dafür zu haben, daß es sich bei den eluierten Verbindungen tatsächlich um freie

Substanzen handelt; denn nur diese schienen uns als echte Ausgangsstoffe für die Huminstoffbildung von Interesse zu sein.

Die Tatsache, daß von den 51 Verbindungen, die aus dem Boden isoliert werden konnten, nur 5 überhaupt und als Ligninabbauprodukte identifiziert wurden, stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein und bestätigt die Berechtigung der von uns gestellten Frage nach der Herkunft der unidentifizierten Stoffe.

Einiges Interesse verdient die Betrachtung der Substitutionsmuster der von uns identifizierten Strukturen; auffälligerweise konnten nur der 4-Hydroxy- und der 3-Methoxy-4-hydroxytyp nachgewiesen werden, der erstere in größeren Mengen als der letztere. Unter der Annahme, daß es sich bei den gefundenen Verbindungen tatsächlich um Ligninabbauprodukte handelt, ist es merkwürdig, daß keine Verbindung des 3,5-Dimethoxy-4-hydroxytyps gefunden werden konnte; nach FREUDENBERG (1968) wären gerade diese und solche des 3-Methoxy-4-hydroxytyps als Abbauprodukte der Buchenlignine zu erwarten, nicht dagegen Verbindungen des 4-Hydroxytyps. Diese Unstimmigkeit kann auch nicht mit einer teilweisen Methoxyl-Elimination erklärt werden, da ein solcher Vorgang durch Einwirkung von Bodenmikroorganismen nicht beschrieben ist; diese setzen zwar methoxylierte Aromaten um, dabei findet jedoch nur eine Entmethylierung statt, d.h. es entstehen aus den methylierten Phenolen Produkte mit vicinalen Hydroxylgruppen (HENDERSON 1957). Unter Umständen ist jedoch der ausschließliche Nachweis der beiden genannten Substitutionstypen darauf zurückzuführen, daß diese weniger leicht von Mikroorganismen abgebaut werden können als die Substanzen des 3,5-Dimethoxy-4-hydroxytyps.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Bodeneluats sind für uns jedoch noch insofern von Interesse, als zwei der fünf

identifizierten Phenole Hydroxyzimtsäuren sind; dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich bei den Hydroxyzimtsäuren um wesentliche Bestandteile des niedermolekularen Stoffspektrums natürlicher Böden handelt.

Die von uns gewählte Bestrahlung der Hydroxyzimtsäuren mit elektromagnetischen Wellen des ultravioletten und sichtbaren Bereichs war, wie bereits erwähnt, in erster Linie als Modell für alle weiteren, im Boden möglichen Ein-Elektronübergänge gedacht. Andererseits ist jedoch nicht auszuschließen, daß an der Bodenoberfläche tatsächlich auch strahleninduzierte Ein-Elektronübergänge stattfinden können, wenngleich sie sicherlich im Verhältnis zu den überhaupt stattfindenden Vorgängen dieser Art von untergeordneter Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, daß SWAIN (1960) auch für die Polymerisation der Lignine eine Beteiligung photochemischer Reaktionen annimmt.

Da aus der älteren Literatur (BERTRAM und KÜRSTEN 1895, RIIBER 1902, STOBBE und BREMER 1929) bekannt ist, daß Zimtsäuren im kristallinen und suspendierten Zustand verhältnismäßig leicht photochemisch verändert werden können, während das für molekular disperse Zimtsäuren nicht gilt, lag es nahe, die Versuche zu unterteilen in solche mit kristallinen und suspendierten Hydroxyzimtsäuren und solche mit molekular dispersen.

Wenngleich man nicht annehmen kann, daß im Boden tatsächlich kristalline oder suspendierte Hydroxyzimtsäuren vorkommen, ist doch zu vermuten, daß die freien organischen Bodeninhaltsstoffe im Gleichgewicht mit solchen stehen, die an Tonminerale und andere Bestandteile des Bodens mit großer Oberfläche adsorbiert sind. Adsorbierte Substanzen sind aber unter Umständen mit kristallinen gleichzusetzen, d.h. sie sind ebenso wie diese in bestimmter Hinsicht geordnet. Das ist offensichtlich eine Voraussetzung für die

Dimerisierung (SCHÖNBERG 1958).

Interessant ist die Beobachtung, daß von den drei als Abbauprodukte der Lignine zu erwartenden Hydroxyzimtsäuren nur eine, nämlich die 4-Hydroxyzimtsäure zu einer Truxillsäure dimerisiert, während die beiden anderen unbeeinflußt bleiben. Offensichtlich verhindert die Substitution in Metastellung eine Dimerisierung; denn auch 3,4-Dihydroxyzimtsäure dimerisiert nicht, während sowohl unsubstituierte Zimtsäure als auch 2-Hydroxyzimtsäure zu Truxillsäuren reagieren (STOBBE und BREMER 1929).

Die während der Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure zu beobachtende Verschiebung des cis-trans-Gleichgewichts zugunsten der cis-Form und auch die Tatsache, daß in diesen Versuchen keine Dimerisierung zu Truxillsäuren zu beobachten war, sind hinreichend bekannt; überraschend ist jedoch die beobachtete Vielfalt der bei länger andauernder Bestrahlung mit kurzwelligem Licht isolierbaren Substanzen. Dabei ist die genannte Zahl (72 Verbindungen) sicherlich als untere Grenze anzusehen, da mit den von uns angewandten Trennverfahren bei der Vielzahl der Substanzen nicht unbedingt eine vollständige Trennung garantiert werden kann und andererseits auch die benutzten Nachweismethoden nur Mengen bis zu ca. o,1 µg erfassen.

Sehr interessant ist die nachgewiesene Bildung der 3,4-Dihydroxyzimtsäure und die anschließende Bildung des Aesculetins aus der 4-Hydroxyzimtsäure. Damit ist erwiesen, daß durch abiologische Reaktionen das Substitutionsmuster der bodenmöglichen Hydroxyzimtsäuren verändert werden kann.

Diese Beobachtung beweist auch die Berechtigung der von uns gewählten Modellreaktion, da MEYERS (1963) bei Zusatz von Eisen-Äthylendiamintetra-Eisessig Komplexen und Ascorbinsäure zu einer 4-Hydroxyzimtsäurelösung ebenfalls die Hydroxylierung zur 3,4-Dihydroxyzimtsäure und nachfolgende Aesculetinbildung beobachten konnte.

Im Boden scheint der Übergang der 3,4-Dihydroxyzimtsäure in Aesculetin eine abiologisch verlaufende Reaktion zu sein; denn in Untersuchungen an Mikroorganismen konnte wohl die Hydroxylierung der 4-Hydroxyzimtsäure und die Entmethylierung der 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure zur 3,4-Dihydroxyzimtsäure beobachtet werden, nicht aber der Übergang zum Aesculetin (HAIDER und MARTIN 1967).

Besondere Bedeutung kommt der Hydroxylierung in ortho- und para-Stellung zum schon vorhandenen Hydroxyl im Hinblick auf die Bildung von Huminstoffen zu, da, wie bereits eingehend beschrieben wurde (s. Seite 21), Phenole mit Hydroxylgruppen in 1,2- und 1,4-Stellung als besonders polymerisationsfähig und damit als prädestinierte Huminstoffausgangsprodukte anzusehen sind.

Allerdings sollte auch ein weiterer Aspekt nicht unerwähnt bleiben: 3,4-Hydroxyzimtsäure und ebenso Aesculetin sind auf Grund ihrer Mobilität und ihrer freien vicinalen Hydroxylgruppen als ausgesprochene Wirkstoffe anzusehen. Dabei können unterschieden werden:

1. Mineralwirksamkeit
2. Edaphonwirksamkeit.

Zu 1.: Verbindungen mit vicinalen Hydroxylgruppen sind in der Lage, Kationen zu chelatisieren; dies kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Löslichkeit des betreffenden Kations zur Folge haben (VOLLERT 1964, KARBACHSCH 1966)

Zu 2.: Ein Beispiel für die Edaphonwirksamkeit unterschiedlich substituierter Phenole findet sich in der Arbeit von FLOOD und KIRKHAM (1960): Diese Autoren untersuchten den Einfluß verschiedener Phenole auf die Schorferreger Venturia inaequalis und Venturia pirina. Sie konnten nachweisen, daß die Beeinträchtigung des Sporenwachstums der genannten Pilze so-

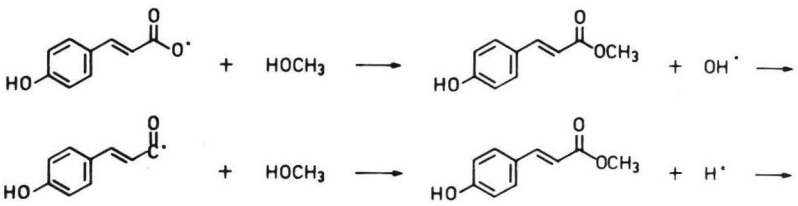
wohl von dem Hydroxylierungsmuster als auch der Art der Seitenkette abhängt. Keine Hemmung der Sporulation der genannten Pilze wurde durch 4-Hydroxyzimtsäure und 3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure hervorgerufen, während sowohl 3,4-Dihydroxybenzoesäure als auch 3,4-Dihydroxyzimtsäure auf Sporulation und Keimung hemmend wirkten; dabei lag die Wirkung der 3,4-Dihydroxyzimtsäure über der der 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Dies wurde von den Verfassern auf das Vorhandensein der ungesättigten Seitenkette zurückgeführt.

Es kann also der Schluß gezogen werden, daß mit dem von uns beobachteten Übergang der 4-Hydroxyzimtsäure in die 3,4-Dihydroxyzimtsäure auch eine Zunahme der Edaphonwirksamkeit verbunden ist.

Weiterhin untersuchten die Autoren auch die Wirkung der 2-Hydroxyzimtsäure und des daraus entstehenden Cumarins; sie beobachteten eine stärkere Hemmung durch das Cumarin. Ähnliches dürfte auch für das Paar 3,4-Dihydroxyzimtsäure - Aesculetin gelten. Die biologische Wirksamkeit des Aesculetins untersuchte SIGMUND (1914); er fand eine Beeinträchtigung der Keimung verschiedener Pflanzensamen.

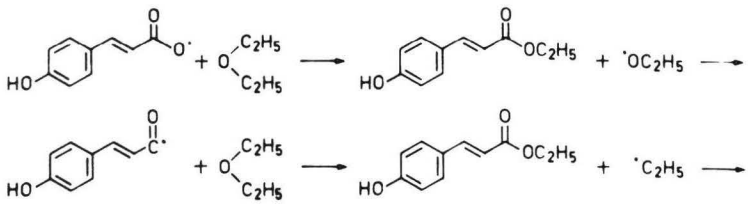
Von Interesse ist weiterhin die Verbindung Nr. 91, die dann entstand, wenn die Bestrahlungsprodukte in methanolischer oder ätherischer Lösung aufgenommen wurden. Diese Substanz stimmte, wie bereits erwähnt, in ihrem chromatographischen und spektralen Verhalten sowie in ihren Anfärbeeigenschaften mit dem Methylester der 4-Hydroxyzimtsäure überein. Es kann also zumindest im Fall der methanolischen Lösung angenommen werden, daß tatsächlich der Methylester entstanden ist. Normalerweise ist eine derartige Veresterung aber nur in schwefelsaurer methanolischer

Lösung zu beobachten; daß es hier bei pH-Werten um 3,5 zu dieser Reaktion kommt, läßt allein einen Radikalmechanismus als mögliche Erklärung zu, d.h. es ist anzunehmen, daß ein während der Bestrahlung gebildetes Radikal als Startermolekül die nachfolgende Kettenreaktion der unverändert gebliebenen 4-Hydroxyzimtsäure mit dem Methanol einleitet:



Für einen derartigen Kettenmechanismus spricht vor allem die Beobachtung, daß nach Beendigung der Bestrahlung in einem Zeitraum von ca. 14 Tagen eine stete Zunahme des Methylesters festzustellen war; dies ist auf andere Weise nicht zu erklären.

In den Fällen, in denen die Bestrahlungsprodukte nicht in methanolischer, sondern allein in wässriger und ätherischer Lösung vorgelegen hatten, ist die Bildung des 4-Hydroxyzimtsäuremethylesters ausgeschlossen. Es ist allenfalls anzunehmen, daß sich der Äthylester, der in allen geprüften Eigenschaften mit dem Methylester übereinstimmt, über eine im übrigen wohlbekannte Radikalspaltung des Äthers gebildet hat. Bei der Formulierung der entsprechenden Reaktion fällt auf, daß in diesem Fall noch ein weiteres Produkt in gleichen Mengen entstehen muß; dies wäre eine Erklärung dafür, daß die Substanz Nr. 85 in etwa der gleichen Menge wie die Substanz Nr. 91 gefunden werden konnte, wenn die Bestrahlungsprodukte nur in Diäthyläther und nicht in Methanol gelöst waren.



Für die Vorgänge im Boden sind diese Beobachtungen insofern von Bedeutung, als hier offensichtlich durch einen abiologischen Eingriff aus einer bodenmöglichen Hydroxyzimtsäure ein relativ stabiles freies Radikal entstanden ist. Freie Radikale sind aber offenbar für die Huminstoffbildung von wesentlicher Bedeutung und andererseits sind sie bereits mehrfach im Boden nachgewiesen worden (s.S. 22).

Unter Umständen ist auch die Bildung des huminstoffartigen Polymeren beim schonenden Einengen der Bestrahlungslösung durch die Wirkung dieses oder weiterer Radikale hervorgerufen worden.

Interessant ist der Vergleich der durch die Bestrahlung der 4-Hydroxyzimtsäure entstandenen Substanzen mit denen, die aus dem natürlichen Boden isoliert werden konnten. Überraschend ist vor allem die Menge der Substanzen, die nach den von uns geprüften Kriterien als identisch anzusehen sind. Obgleich diese Identitäten nicht weiter gesichert werden konnten, ist doch bemerkenswert, daß derart viele Substanzen aus der Bestrahlung einer einzigen Hydroxyzimtsäure entstehen, die in so vielen Eigenschaften mit dem aus Böden isolierbaren Stoffspektrum übereinstimmen. Diese Beobachtung allein legt den Schluß nahe, daß dem von uns postulierten abiologischen Übergang lignin-bürtiger Hydroxyzimtsäuren in ein breites Stoffspektrum

auch im Boden Bedeutung zukommt; dies umso mehr, als im Boden die Vielfalt der möglichen Reaktionspartner unvergleichlich höher ist und vor allem die vielfältigen Reaktionen mit Stickstoff in unseren Versuchen völlig außer acht gelassen wurden.

Bemerkenswert sind schließlich auch die Ergebnisse der Versuche, in denen die von uns durch Bestrahlung der 4-Hydroxyzimtsäure gewonnenen Substanzen in ihrer Wirkung auf die Mikroorganismen eines natürlichen Bodens geprüft wurden. Da eine Huminstoffsynthese im Boden als Konkurrenzreaktion zur mikrobiellen Katabolisierung der organischen Substanz angesehen werden muß, sollte von Ausgangsstoffen für die Huminstoffbildung eine mikrobizide Wirkung oder aber besonders schwere Abbaubarkeit erwartet werden. Die in unseren Versuchen festgestellte Wirkung der 4-Hydroxyzimtsäure entspricht den Erwartungen; die mikrobizide Wirkung dieser Verbindung wurde mehrfach bewiesen (KAITZIS 197o). Für uns erschien es jedoch besonders interessant, daß die Wirkung der Bestrahlungsprodukte zumindest ebenso deutlich, wenn nicht sogar stärker war; zumindest war keine Abnahme der Toxizität zu beobachten. Dies gilt jedoch nur für die Produkte, die bei der Bestrahlung der molekular dispersen 4-Hydroxyzimtsäure erhalten wurden; die bei der Bestrahlung der kristallinen und suspendierten 4-Hydroxyzimtsäure erhaltene 4,4'-Dihydroxytruxillsäure wirkte dagegen in dem von uns geprüften Konzentrationsbereich ausgesprochen fördernd auf das Wachstum der Bodenmikroorganismen. Unter Umständen ist dies eine Folge der Tatsache, daß die olefinischen Doppelbindungen beim Übergang der Zimtsäure in die Truxillsäure zu einem Cyclobutanring reagieren und damit ihre toxische Wirkung verlieren, dies würde auch mit den Ergebnissen von FLOOD und KIRKHAM (196o) übereinstimmen.

Die von uns eingangs gestellten Fragen lassen sich also zusammenfassend dahingehend beantworten, daß es tatsächlich möglich ist, durch ausschließlich abiologische Reaktionen aus zumindest einer ligninbürtigen Hydroxyzimtsäure ein niedermolekulares Stoffspektrum zu entwickeln, welches große Ähnlichkeit mit den im Boden nachweisbaren Verbindungen besitzt und welches weiterhin in der Lage ist, zu Huminstoffen zu reagieren. Damit ist also bewiesen, daß nicht allein die von Mikroorganismen synthetisierten niedermolekularen Phenole als Ausgangsstoffe für die Huminstoffbildung anzusehen sind, sondern daß dieses Spektrum zumindest eine Bereicherung durch die von uns beschriebenen Substanzen erfährt. Die Beteiligung biologischer Systeme ist für die von uns untersuchten Vorgänge nur insofern erforderlich, als die Spaltung der Lignine durch von Mikroorganismen erzeugte Exoenzyme erfolgt, alle weiteren Reaktionen können ohne die Beteiligung einer biologischen Phase ablaufen. Dies ist ein ausgesprochenes Supplement zu den Überlegungen der Forscher, die annehmen, daß die Huminstoffbildung im wesentlichen auf Vorgänge zurückzuführen ist, mit denen Bodenmikroorganismen reaktionsfreudige Lysis- und Stoffwechselprodukte mit Hilfe von Phenoloxydasen in reaktionsträge, makromolekulare "ungefährliche" Huminstoffe verwandeln (MATSCHKE 197o).

Die Stellung dieser Arbeit im Rahmen der mit der Huminstoffsynthese zusammenhängenden Reaktionen ist in der Abb. 23 dargestellt.

2. Es wurde als Modellreaktion zur Überführung der 4-Hydroxyzimtsäure in Folgeprodukte dieser Art eine photochemische Reaktion in wässriger Lösung gewählt, die als Modell für alle im Boden verlaufenden Ein-Elektrontransfers gelten kann und möglicherweise bei der Umwandlung der organischen Substanz nahe der Bodenoberfläche auch als solche eine Rolle spielt.

3. Es stellte sich überraschend heraus, daß nach den von uns verwendeten Identitätskriterien das photochemisch erzeugte Stoffgemisch nicht weniger als 28 Verbindungen enthält, die auch aus einem natürlichen Standort isoliert werden konnten und deren Identifizierung bisher noch nicht gelungen ist.

4. Es wurden aus dem Bestrahlungsansatz der 4-Hydroxyzimtsäure dunkelgefärbte Polymerisate isoliert, die in allem den aus Böden gewonnenen oder durch Synthese aus Polyphenolen erzeugten Stickstoff-freien Huminsäuren gleichen.

5. Es wird gefolgert, daß ein Kollektiv von reaktionsfähigen Ausgangssubstanzen zumindest aus einigen im Boden vorkommenden Ligninmetaboliten abiologisch erzeugt werden und daß im Zuge dieser abiologischen de novo Synthese auch eine Bildung von Huminstoffen erfolgen kann.

5. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Bodenuntersuchung

Dem A_h-Horizont entnommenes Bodenmaterial mit einer Pinzette von deutlich strukturierten organischen Substanzen (Zweige, Blätter, Wurzeln, Pilzhyphen etc.) befreien. 1,5 kg Boden (natürliche Feuchte) + 3 Ltr. dest. Wasser + 1 g Citronensäure + o,2 g Ascorbinsäure in 5 Ltr. Flasche geben. 1o Stunden auf Schüttelmaschine schütteln lassen. 4 Stunden stehen lassen (Sedimentieren grober und mittelgrober Bodenanteile). Überstand mit Pipette absaugen, in Zentrifugenbecher geben, 3o Min. mit ca. 5o.ooo g zentrifugieren (Sedimentieren der Feinbodenanteile). Überstand dekantieren. Sedimente in beiden Fällen verwerfen. Eluat im Rotationsverdampfer (4o°C, o Torr) auf ca. 25o ml einengen.

Trennungsgang 1: Wässriges Bodeneluat mit 1 N H_2SO_4 unter ständigem Rühren auf pH 1,5 ansäuern, 3 x mit je 15o ml Diäthyläther im Scheidetrichter ausschütteln. Vereinigte Ätherextrakte einengen und chromatographieren. Wasserphase mit 1 N NaOH auf pH 3,5 einstellen, im Rotationsverdampfer (4o°C, o Torr) zur Trockene einengen. Dem Rückstand 5o ml Aceton zusetzen, eine Stunde auf der Schüttelmaschine schütteln lassen. Acetoneluat mittels G-4 Fritte absaugen, Rückstand verwerfen. Acetoneluat einengen und chromatographieren.

Trennungsgang 2: Wässriges Bodeneluat mit 1 N NaOH auf pH 9 einstellen. 3 x mit je 15o ml Diäthyläther im Scheidetrichter ausschütteln. Vereinigte Ätherextrakte einengen und chromatographieren. Wasserphase mit 1 N H_2SO_4 auf pH 1,5 einstellen. Weitere Auftrennung wie Trennungsgang 1.

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Ca. 1o - 1oo µl Extrakt (je nach Konzentration der Lösung unterschiedlich) auf eine Kieselgeldünnschichtfertigplatte der Fa. Schleicher & Schüll (Typ 15oo, 2o x 2o cm) auftragen. Auftragspunkt: 1,5 cm vom unteren und linken Plattenrand entfernt. Referenzverbindungen an entsprechender Position des unteren rechten und des oberen linken Plattenrandes auftragen.

1. Trennsystem: Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure = 5 : 4 : 1
   Laufzeit: 6o Minuten bis zur Höhe von 16 cm.
2. Trennsystem: Chloroform/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1
   (Unterphase)
   Laufzeit: 9o Minuten bis zur Höhe von 16 cm.

Dünnschichtchromatographie an Polyamid

Polyamiddünnschichtfertigplatten der Fa. Schleicher & Schüll (Typ 16oo, 1o x 2o cm), Trennsystem: Chloroform/Eisessig/Wasser = 4 : 1 : 1 (Unterphase).

Nachweisverfahren

Diazotierte Sulfanilsäure: 5o g Sulfanilsäure in 25o ml 1o %iger KOH lösen, abkühlen und mit 2oo ml 1o %iger $NaNO_2$-Lösung versetzen. Aus einem Scheidetrichter in eisgekühlte Salzsäure eintropfen lassen (8o ml konz. HCl und 4o ml Wasser). Das ausgefallene Diazoniumsalz absaugen, mit Alkohol und Äther waschen, an der Luft trocknen. Vor dem Besprühen 5o mg diazotierte Sulfanilsäure + 1oo mg Na_2CO_3 in 1o ml Wasser lösen (Diazotierte Sulfanilsäure kühl lagern; Explosionsgefahr!).

Echtblausalz B, 4,4'-Bi(2-methoxybenzoldiazoniumchlorid): Chromatogramm mit 1 %iger wässriger Lösung besprühen, trocknen und über NH_3 konz. halten.

Eisen-III-Chlorid: Chromatogramm mit 2 %iger wässriger Lösung besprühen, dann trocknen.

Aufnahme der UV-Absorptionsspektren

Substanzfleck im UV-Licht markieren, mit dem Adsorbens abschaben, bei 4o°C (Wasserbad) mit rd. 4 ml reinem Methanol im Becherglas eluieren. Das nach 2 Stunden auf 2 ml eingeengte Eluat durch ein zuvor mit Methanol extrahiertes Faltenfilter direkt in eine 2 ml Quarzküvette (5 mm Schichtdicke) filtrieren. Als Vergleichslösung dient das in derselben Weise gewonnene Eluat einer gleich großen Menge Kieselgelpulver, die unterhalb der Startlinie vom Chromatogramm abgeschabt wird.

Aufnahme des Spektrums durch das automatisch arbeitende Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss (Dem Registrierteil dieses Geräts ist ein Transmissions-Extinktions-Wandler angeschlossen; die somit vom Gerät aufgezeichneten Extinktionskurven sind in der Arbeit wiedergegeben).

Aufnahme der IR-Absorptionsspektren

1 mg des zu untersuchenden chromatographisch reinen Materials mit 1 g KBr in einem Achatmörser ca. 3o Minuten mörsern. Präparat 12 Stunden über Phosphorpentoxid im Exsikkator trocknen. Mit ca. 25o at Pressling herstellen, Spektrum aufnehmen.

Aufnahme des NMR-Spektrums

Ca. 6 mg 4,4'-Dihydroxytruxillsäure werden in deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst.

Methylierung mit Diazomethan

2,14 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid in 3o ml peroxidfreiem Äther lösen. Zu der eiskalten Lösung eine Lösung von o,4 g KOH in 1o ml 9o %igem Äthanol geben. Falls ein Niederschlag ausfällt, diesen mit etwas überschüssigem Äthanol lösen. Nach 5 Minuten die ätherische Lösung von Diazomethan auf dem Wasserbad (6o - 65°C) destillieren (Vorsicht! Diazomethan ist giftig und neigt zu Explosionen). Dem eisgekühlten Destillat 5o mg der zu methylierenden Substanz zusetzen. Den mit Watte verschlossenen Kolben 12 Stunden im Kühlschrank stehen lassen. Restliches Diazomethan und Äther im Wasserbad (5o°C) unter dem Abzug verdampfen lassen. Methyliertes Präparat umkristallisieren bzw. chromatographisch trennen.

Molekulargewichtsbestimmung nach RAST in Campher

Methylierte 4,4'-Dihydroxytruxillsäure und frisch sublimierten Campher etwa im Verhältnis 1 : 3o abwiegen, in Gläschen (rd. 5 x 5o mm) geben, Glas zuschmelzen. In weiteres Gläschen reinen Campher geben, Glas ebenfalls zuschmelzen. Beide Gläser gemeinsam im Glycerinbad auf ca. 18o°C erhitzen. Durch mehrfaches Abkühlenlassen und erneutes Erhitzen Schmelz- bzw. Erstarrungspunkte der beiden Präparate ermitteln.

Errechnung des Molekulargewichts nach der Formel:

$$MG = \frac{K \cdot a \cdot 1.000}{b \cdot t}$$

K = Kryoskopische Konstante (für Campher = 4o)
a = Gewicht der unbekannten Substanz
b = Gewicht des Lösungsmittels
Δt = Schmelzpunktdifferenz

Gemessene Werte:

	1.	2.	3.	4.
Methyl.-4,4'-Di-hydroxytruxills.	3,35 mg	3,27 mg	1,82 mg	1,89 mg
Campher	75,44 mg	99,o2 mg	5o,14 mg	47,75 mg
Schmelzpkt. der Mischung	166,7° C	168,1° C	167,4° C	167,7° C
Schmelzpkt. des Camphers	173,7° C	173,7° C	173,7° C	173,7° C
Δt	7,o° C	5,6° C	6,3° C	6° C
MG	252	235	23o	264

Da die erhaltenen Werte recht erheblich voneinander abweichen und außerdem nicht mit den anderen Daten für die 4,4'-Dihydroxytruxillsäure in Einklang zu bringen sind, wird angenommen, daß sich die Substanz bei der hohen Temperatur zersetzt.

Bestimmung des photochemisch umgesetzten Anteils der 4-Hydroxyzimtsäure sowie quantitative Bestimmung des Aesculetins

2,5 Ltr. Bestrahlungsansatz (25o ppm 4-Hydroxyzimtsäure) auf 5oo ml einengen. Im Scheidetrichter 12 Stunden stehen lassen, ausgefallene und abgesetzte Flocken ablaufen lassen,

durch Blaubandfilter filtrieren. Rückstand im Exsikkator über Phosphorpentoxid trocknen.

o,16 ml der Lösung abpipettieren, auf rd. o,1 ml einengen, auf Kieselgeldünnschichtplatte zweidimensional trennen. Cis- und trans-4-Hydroxyzimtsäure getrennt abschaben, mit Methanol eluieren und UV-Absorption bei 31o nm bestimmen (5 mm Küvette). Zusätzlich aufgetragenen Test (o,o4 mg 4-Hydroxyzimtsäure) nur in Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure = 5 : 4 : 1 trennen (dabei keine Auftrennung in cis- und trans-Form), ebenfalls abschaben und eluieren:

Ergebnisse:

		ε 31o nm	Konzentr.	Menge
4-Hydroxyzimtsäure (Test)	in 2 ml	o,76	2o ppm	o,o4 mg
cis-4-Hydroxyzimtsäure	in 2 ml	o,95	25 ppm	o,o5 mg
trans-4-Hydroxyzimtsäure	in 4 ml	o,665	17,5 ppm	o,o7 mg

Es werden o,12 mg 4-Hydroxyzimtsäure bestimmt = 6o % (auf die Anfangskonzentration bezogen), davon 42 % cis- und 58 % trans-Form. Aesculetin ebenfalls abschaben, eluieren und mit gleichartig behandelter Testmenge (o,o2 mg) vergleichen:

		ε 347 nm	Konzentr.	Menge
Aesculetin (Test)	in 1 ml	o,325	2o ppm	o,o2o mg
Aesculetin	in 1 ml	o,o36	2,2ppm	o,oo22 mg

Auf die Anfangskonzentration bezogen werden 1,1 % Aesculetin bestimmt.

Herstellung des 4-Hydroxyzimtsäureäthylesters

200 mg 4-Hydroxyzimtsäure in 20 ml Äthanol lösen, 1 ml H_2SO_4 konz. zusetzen. 48 Stunden stehen lassen. Ester auf Kieselgel im System Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure = 5 : 4 : 1 abtrennen.

Mikrobiologische Versuche

Plattentest

I. 100 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 50 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 10 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 100 mg KCl, 500 mg NH_4NO_3, 10 mg Hefeextrakt, 250 µl Hoaglandspurenelementlösung und 5 g Glucose in 500 ml H_2O lösen.

II. 3,54 g KH_2PO_4 und 14,52 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ in 1.000 ml H_2O lösen.

200 ml von II zu I geben, 15 g Agar zusetzen, 20 Min. bei 120°C sterilisieren.

0 mg, 0,09 mg, 0,9 mg, 3,6 mg und 18 mg 4-Hydroxyzimtsäure und 4,4'-Dihydroxtruxillsäure abwiegen bzw. Lösungen abmessen, bei 120°C sterilisieren, in sterile Petrischalen geben, 12,6 ml Nährlösung zusetzen, mit sterilem Wasser auf 18 ml auffüllen.

2,5 Ltr. 75 Std. UV-bestrahlte 250 ppm 4-Hydroxyzimtsäurelösung auf 156 ml einengen = 4.000 ppm-Lösung. Durch Membranfilter Typ SM 11308 der Fa. Sartorius, Göttingen (Porenweite ca. 0,2 µ) in Erlenmeyerkolben steril filtrieren. 0 ml, 0,02 ml, 0,22 ml, 0,9 ml und 4,5 ml in sterile Petrischalen geben, je 12,6 ml Nährlösung zusetzen, mit sterilem Wasser auf 18 ml auffüllen.

Schalen nach dem Erstarren mit je o,1 ml Bodensuspension (1 g Boden in 1oo ml Wasser) beimpfen, Bodenlösung mit Drigalsky-Spatel (auf Drehtisch) verteilen. Schalen 7 Tage bei 28°C bebrüten.

Nährkartonscheibenmethode

O mg, o,o5 mg, o,5 mg, 2,5 mg, 5 mg und 1o mg 4-Hydroxyzimtsäure, 4,4'-Dihydroxytruxillsäure und Aesculetin abwiegen bzw. Lösungen abmessen. In Erlenmeyerkolben geben, bei 12o°C sterilisieren, je 7 ml sterilisierte Nährlösung (ohne Agar) zusetzen, mit sterilem Wasser auf je 1o ml auffüllen.

O ml, o,o13 ml, o,125 ml, o,625 ml, 1,25 ml und 2,5 ml der wie oben beschrieben eingeengten und sterilisierten Bestrahlungsprodukte in sterile Erlenmeyerkolben geben, je 7 ml Nährlösung (ohne Agar) zusetzen, mit sterilem Wasser auf je 1o ml auffüllen.

Den Erlenmeyerkolben je o,1 ml Bodensuspension zusetzen, 24 Std. bei 28°C bebrüten.

Jedem Kolben o,5 ml entnehmen, in 4,5 ml steriles Wasser geben, durch Membranfilter der Fa. Sartorius (Typ SM 114o7 zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl) unter Anwendung des Filtrationsgeräts SM 162o1 saugen. Membranfilter mit zurückgehaltenen Keimen auf die entsprechenden Nährkartonscheiben (SM 14oo5 Standard) zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Petrischalen mit 3 ml sterilem Wasser auflegen. 6o Std. bei 28°C bebrüten, Kolonien auszählen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ADLER, E. (1961)
Über den Stand der Ligninforschung
Z. Papier 15, 6o4 - 6o9

ALEKSANDROVA, L. N. (1962)
Present-day ideas on the nature of soil humus substances and their organomineral derivatives
in: "Problems of Soil Science" Izd. Akad. Nauk SSSR zit. n. KONONOVA (1966)

ATHERTON, N.M., P.A. CRANWELL, H.J. FLOYD und R.D. HAWORTH (1967)
Humic acid - I, ESR Spectra of humic acids
Tetrahedron 23, 1.653 - 1.667

BAVENDAMM, W. (1928)
Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzzerstörender Pilze. Ein Beitrag zur Frage der Krankheitsempfänglichkeit unserer Holzpflanzen. II. Mitteilung: Gerbstoffversuche.
Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. 76, 172 - 227

BEECKEN, H., E.M. GOTTSCHALK, U. v. GIZYCKI, H. KRÄMER, D. MAASSEN, H.G. MATTHIES, H. MUSSO, C. RATHJEN und U.I. ZÁHORSZKY (1961)
Orcein und Lackmus
Angew. Chem. 73, 665 - 673

BEHR, G. (193o)
Über Autolyse bei Aspergillus niger.
Arch. Mikrobiol. 1, 418 - 444

BENNET, E. (1949)
Fixation of ammonia by lignin
Soil Sci. 68, 399 - 4oo

BERTRAM, J. und R. KÜRSTEN (1895)
Ueber das Vorkommen des Orthocumaraldehydmethyl-äthers im Cassiaöl
J. pr. Chemie 51, 316 - 325

BOSE, S.R. und S.N. SARKAR (1937)
Enzymes of some wood-rotting Polypores
Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B 123, 193 - 213

BREMNER, J.M. (1955)
Recent work on soil organic matter at Rothamsted
Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 69, 32 - 38

BREMNER, J.M. (1967)
Nitrogenous Compounds
in: A.D. McLAREN und G.H. PETERSON (Ed.)
Soil Biochemistry, New York, 19 - 66

BREMNER, J.M. und K. SHAW (1957)
The mineralization of some nitrogenous materials in soil
J. Sci. Food Agr. 8, 341 - 347

BROCKMANN, H. (196o)
Die Actinomycine
Angew. Chem. 72, 939 - 947

BROWN, B.R. und S.M. BOCKS (1963)
Some new enzymic reactions of phenols
in: Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds
Pergamon Press, London, 129 - 138

BRUNET, P.C.J. (1967)
Sclerotine
Endeavour, Bd. XXVI, Nr. 98, 68 - 74

BUTENANDT, A. (1957)

Über Ommochrome, eine Klasse natürlicher Phenoxazonfarbstoffe

Angew. Chem. 69, 16 - 23

CHESHIRE, M.V., P.A. CRANWELL, C.P. FALSHAW, A.J. FLOYD und R.D. HAWORTH (1967)

Humic acid - II. Structure of humic acids

Tetrahedron 23, 1.669 - 1.682

COULSON, C.B., R.I. DAVIES und D.A. LEWIS (196o)

Polyphenols in plant, humus, and soil. I. Polyphenols of leaves, litter, and superficial humus from mull and mor sites.

J. Soil Sci. 11, 2o - 3o

DAGLEY, S. (1967)

The microbial metabolism of phenolics

in: A.D. McLAREN und G.H. PETERSON (Ed.) Soil Biochemistry, New York, 287 - 317

DAVIDSON, R.W., W.A. CAMPBELL und D.J. BLAISDELL (1938)

Differantiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium.

J. Agr. Res. 57, 683 - 695

DAVIES, R.I., C.B. COULSON und D.A. LEWIS (1964)

Polyphenols in plant, humus and soil. III. Stabilization of gelatin by polyphenol tanning

J. Soil. Sci. 15, 299 - 3o9

DEHERAIN, P.P. (1988)

Recherches sur les fermentations du fumier de ferme

Ann. Agron. 14, 97 - 133

ELLER, W. (1921)
Künstliche und natürliche Huminsäuren
Brennstoff - Chemie 2, 129 - 133

ELLIS, G.P. (1959)
The Maillard-Reaction
Adv. Carbohydrate Chem. 14, 63 - 134

ELLIS, G.P. und J. HONEYMAN (1955)
Glycosylamines
Adv. Carbohydrate Chem. 1o, 95 - 168

ENDERS, C. (1942,1)
Über den Chemismus der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen
Biochem. Z. 312, 339 - 348

ENDERS, C. (1942,2)
pH-Abhängigkeit und Gleichgewichtsreaktion der Aufspaltung der Zucker zu Methylglyoxal
Biochem. Z. 312, 349 - 353

ENDERS, C. (1943)
Über den Chemismus der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen. IV. Mitteilung. Die Rolle der Mikroorganismen bei den Humifizierungsvorgängen
Biochem. Z. 315, 259 - 292

ENDERS, C. und S. SIGURDSSON (1948)
Chemie der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen. VII. Mitteilung.
Biochem. Z. 318, 44 - 46

ERDTMAN, H.G.H. (1933)

Dehydrierungen in der Coniferylreihe

I. Dehydrodieugenol und Dehydrodiisoeugenol

Biochem. Z. 258, 172 - 18o

II. Dehydrodiisoeugenol

Liebigs Ann. Chem. 5o3, 283 - 294

ERDTMAN, H.G.H. (1934)

Studies on the formation of complex oxidation and condensation products of phenols. A contribution to the investigation of the origin and nature of humic acid.

Part I. - Studies of the reactivity of simple monocyclic quinones

Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A. 143, 177 - 191

Part II. - Coupling of simple phenols and quinones to diphenyl derivatives

Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A. 143, 191 - 222

Part.III.- Rearrangements of oxidation - reduction type in the diquinone group

Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A. 143, 223 - 228

Part IV. - Termolecular polymerisation products of p-benzoquinone, toluquinone, and α-naphthoquinone

Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A. 143, 228 - 241

ERDTMAN, H.G.H. und N.E. STJERNSTRÖM (1959)

Studies on humic acids VII. The structure of the dihydroxy-dioxidoterphenyl obtained by the action of sulphuric acid on p-benzoquinone

Acta chem. Scand. 13, 653 - 658

ESTERMANN, E.F., G.H. PETERSON und A.D. McLAREN (1959)

Digestion of clay-protein, lignin-protein, and silica-protein complexes by enzymes and bacteria

Soil Sci. Soc. Am. Proc. 23, 31 - 36

EVANS, W.C. und H.S. RAPER (1937)

CCLXIII. A comparative study of the production of 1-3:4-dihydroxyphenylalanine from tyrosine by tyrosinase from various sources

Biochem. J. 31, 2.155 - 2.161

CCLXIV. The accumulation of 1-3:4-dihydroxyphenylalanine in the tyrosinase - tyrosine reaction

Biochem. J. 31, 2.162 - 2.17o

FELBECK, G.T. (1965)

Studies on the high pressure hydrogenolysis of the organic matter from a muck soil

Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29, 48 - 55

FELBECK, G.T. (1971)

Chemical and biological characterization of humic matter

in: A.D. McLAREN und J. SKUJINŠ (Ed.)
Soil Biochemistry, Vol. 2, New York, 36 - 59

FISCHER, F. und H. SCHRADER (1921)

Über die Entstehung und die chemische Struktur der Kohle

Brennstoff - Chemie 2, 37 - 45

FLAIG, W. (1966)

Humusstoffe

in: Handbuch der Pflanzenernährung und Düngung II/1
Springer, Wien, 382 - 458

FLAIG, W., Th. PLOETZ und H. BIERGANS (1955)

Zur Kenntnis der Huminsäuren. XIV. Mitteilung. Bildung und Reaktionen einiger Hydroxy-chinone.

Liebigs Ann. Chem. 597, 196 - 213

FLOOD, A.E. und D.S. KIRKHAM (196o)

The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two Venturia species

in: J. P. PRIDHAM (Ed.)
Phenolics in Plants in Health and Disease, Oxford,81-85

FORSYTH, W.G.C. und V.C. QUESNEL (1957)

Intermediates in the enzymic oxidation of catechol

Biochim. biophys. Acta 25, 155 - 16o

FORSYTH, W.G.C., V.C. QUESNEL und J.B. ROBERTS (196o)

Diphenylenedioxido-2,3-quinone: An intermediate in the enzymic oxidation of catechol

Biochim. biophys. Acta 37, 322 - 326

FREUDENBERG, K. (192o)

Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe

Berlin

FREUDENBERG, K. (1968)

The constitution and biosynthesis of lignin

in: Constitution and Biosynthesis of Lignin
Berlin - Heidelberg - New York, 47 - 122

FÜHR, F. und J.M. BREMNER (1964)

Untersuchungen zur Fixierung des Nitrit-Stickstoffs durch die organische Masse des Bodens

Landwirtsch. Forsch. 18. Sonderheft, 43 - 51

FUKUZUMI, T. und T. SHIBAMOTO (1965)

Enzymatic degradation of lignin. IV. Splitting of veratrylglycerol-β-guaiacylether by enzyme of Poria subacida

J. Japan. Wood Res. Soc. 11, 248 - 252

GANZ, E. (1944)

Contribution à l'étude de la structure des acides humiques naturels

Ann. chim. 19, 2o2 - 216

GREILICH, J. (1971)

Über die Steuerung der Mineralisierung und Humifizierung organischer Substanzen mit Hilfe von Eisensulfat als Wirkagens

Arch. Bodenfruchtbarkeit u. Pflanzenprod. 15, 249 - 256

GUENZI, W.D. und T.M. McCALLA (1966)

Phytotoxic substances extracted from soil

Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 3o, 214 - 216

HAIDER, K., S. LIM und W. FLAIG (1964)

Experimente und Theorien über den Ligninabbau bei der Weißfäule des Holzes und bei der Verrottung pflanzlicher Substanz im Boden

Holzforschung 18, 81 - 88

HAIDER, K. und J.P. MARTIN (1967)

Synthesis and transformation of phenolic compounds by Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation

Soil Sci. Soc. Am. Proc. 31, 766 - 772

HALVORSON, H. (1961)

Ph. D. Thesis, McGill University Montreal, Canada

zit. n. TOWERS (1964)

HANDLEY, W.R.C. (1961)

Further evidence for the importance of residual leaf protein complexes in litter decomposition and the supply of nitrogen for plant growth

Plant Soil 15, 37 - 73

HARKIN, J.M. (1967)

Lignin - a natural polymeric product of phenol oxidation

in: Oxidative Coupling of Phenols, Decker, Inc. New York, 243 - 321

HATHWAY, D.E. (1957)

Autoxidation of polyphenols. Part I. Autoxidation of methyl gallate and its O-methyl ethers in aques ammonia

J. Chem. Soc., 519 - 523

HATHWAY, D.E. (1958)

An approach to the study of vegetable tannins by the oxidation of plant phenolics

J. Soc. Leather Trudes Chemists 42, 1o9 - 121

HAWORTH, R.D. (1971)

The chemical nature of humic acid

Soil Sci. 111, 71 - 79

HENDERSON, M.E.K. (1957)

Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi

J. Gen. Microbiol. 16, 686 - 695

HENNEQUIN, J.R. und H. BLACHERE (1966)

Recherches sur la synthèse de phytohormones et de composés phénoliques par Azotobacter et des bactéries de la rhizosphère.

Ann. Inst. Pasteur, Suppl. Au Nr. 3 T 111, 89 - 1o2

HENNEQUIN, J.R. und C. JUSTE (1967)

Présence d'acides phénols libres dans le sol. Etude de leur influence sur la germination et la croissance des végétaux.

Ann. agron. 18, 545 - 569

HIGUCHI, T. (1954)

Biochemical study of wood-rotting fungi (III). "In vitro" experiment of Bavendamm's reaction by using α-naphthol reagent

J. Japan. For. Soc. 36, 22 - 24

HINNEY, B. (1969)

Phenole im Boden, Herkunft und Reaktionen

Dipl. Arb. Inst. f. Bodenkd., Göttingen (unveröffentl.)

HODGE, J.E. (1955)

The Amadori-rearrangement

Adv. Carbohydrate Chem. 1o, 169 - 2o5

HORNER, L. und K. STURM (1957)

Zur Kenntnis der o-Chinone. X. Modellreaktionen zur Melaninbildung

Liebigs Ann. Chem. 6o8, 128 - 139

HOUGH, L., J.K.N. JONES und E.L. RICHARDS (1952)

The reaction of amino-compounds with sugars. Part I. The action of ammonia on D-glucose

J. Chem. Soc., 3.854 - 3.857

HULTZSCH, K. (195o)

Chemie der Phenolharze

Berlin - Göttingen - Heidelberg

HULTZSCH, K. (1962)

Ring-Kondensate in Alkylphenolharzen

Z. Kunststoffe 52, 2o - 24

HURST, H.M. und N.A. BURGES (1967)

Lignin and humic acids

in: A.D. McLAREN und G.H. PETERSON (Ed.) Soil Biochemistry, New York, 26o - 286

ISHIKAWA, H. und T. OKI (1966)

The oxidative degradation of lignin, IV. The enzymic hydrolysis of ether linkages in lignin

J. Japan Wood Res. Soc. 12, 101 - 107

ISHIKAWA, H., W.J. SCHUBERT und F.F. NORD (1963)

Investigations on lignins and lignification.

XXVII. The enzymic degradation of softwood lignin by white-rot fungi

Arch. Biochem. Biophys. 100, 131 - 139

XXVIII. The degradation by Polyporus versicolor and Fomes fomentarius of aromatic compounds structurally related to softwood lignin

Arch. Biochem. Biophys. 100, 140 - 149

JAMES, Th. und A. WEISSBERGER (1938)

Oxidation processes. XI. The autoxidation of durohydroquinone

J. Amer. Chem. Soc. 60, 98 - 104

JAQUIN, F. und S. BRUCKERT (1965)

Identification et évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières

C. R. Acad. Sci. série D. 260, 4.556 - 4.559

JENKINSON, D.S. und J. TINSLEY (1959)

Studies on the organic material extracted from soils and composts. I. The isolation and characterization of ligno-proteins from compost

J. Soil Sci. 10, 245 - 263

KAITZIS, G. (1970)

Mikrobizide Verbindungen aus Scirpus Lacustris L. (Ein Beitrag zur Ökochemie des Wurzelraumes)

Diss. Göttingen

KARBACHSCH, M. (1966)

Phenolische Komplexbildner und ihr Einfluß auf die Löslichkeit von Calcium-, Eisen- und Aluminiumphosphaten

Diss. Göttingen

KARLSON, P. (1967)

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler

Thieme, Stuttgart

KICKUTH, R. (1959)

Chemische Abbauversuche an einer natürlichen Huminsäure. Ein Beitrag zum Strukturproblem der Huminsäuren

Diss. Göttingen

KICKUTH, R., B. MEYER und H.J. SCHONLAU (1969)

Die divergierende Humus-Metabolik benachbarter Sauer-Braunerden und Rendsinen unter Wald im Licht organischer Stoffgruppen-Untersuchungen

Göttinger Bodenkdl. Ber. 8, 1 - 61

KONONOVA, M.M. (1966)

Soil organic matter

Pergamon Press, New York

KONONOVA, M.M. (1968)

Transformations of organic matter and their relation to soil fertility

Soviet Soil Sci., 1.o47 - 1.o55

KONONOVA, M.M. und I.V. ALEKSANDROVA (1956)

Application de la méthode de chromatographie distributive sur papier à l'étude des formes de l'azote des matières humiques

Pocvovedenie, (5), 86 - 92

KONONOVA, M.M. und I.V. ALEKSANDROVA (1958)

The biochemistry of humus formation and some problems of plant nutrition

Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. 1, 79
zit. n. KONONOVA (1966)

KUBIENA, W.L. (1948)

Entwicklungslehre des Bodens

Springer, Wien

KÜSTER, E. (1952)

Umwandlung von Mikroorganismen-Farbstoffen in Humusstoffe

Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 57, 51 - 57

KUNZE, Chr. (1969)

Isolierung und Identifizierung phenolischer Ligninspaltstücke aus Waldböden

Plant Soil 31, 389 - 39o

LAATSCH, W. und E. SCHLICHTING (1953)

Zur Bestimmung der α-Amino-N-haltigen Komplexe im Boden

Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 62, 5o - 63

LEHFELDT, A. (1922)

Über die Polymerisation und Depolymerisation der Arylacrylsäuren und ihrer Photodimeren, nebst einer Kritik der Bayerschen Spannungstheorie

Diss. Leipzig

LI, C.Y., K.C. LU, J.M. TRAPPE und W.B. BOLLEN (197o)

Separation of phenolic compounds in alkali hydrolysates of a forest soil by thin-layer chromatography

Can. J. Soil Sci. 5o, 458 - 46o

LIM, S.U. (1965)

Beiträge zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen dem mikrobiellen Abbau des Lignins und der Bildung von Humusstoffen

Diss. Bonn

LINDBECK, M.R. und J.L. YOUNG (1965)

Polarography of intermediates in the fixation of nitrogen by p-quinone-aqueous ammonia systems

Anal. Chim. Acta 32, 73 - 8o

LYNCH, D.L. und C.C. LYNCH (1958)

Resistance of protein-lignin complexes, lignins and humic acids to microbial attack

Nature, 181, 1.478 - 1.479

LYR, H. (1962)

Detoxification of heartwood toxins and chlorophenols by higher fungi

Nature, 195, 289 - 29o

MARTINEZ, F.M.,und A.A. DEPETRE (1965)

Presencia de compuestos fenolicos libres en tipos de suelos distintos

An. Edafol. Agrobiol. 24, 633 - 642

MALMSTRÖM, G., G. FÅHRAEUS und R. MOSBACH (1958)

Purification of laccase

Biochim. Biophys. Acta 28, 652 - 653

MANSKAYA, S.M. und L.A. KODINA (1968)

Aromatic structures of lignins and their role in the formation of humic acids

Soviet Soil Sci., 1.1o2 - 1.1o7

MARCUSSON, J. (1925)

Struktur und Bildung der Huminsäuren und Kohlen

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 58, 869 - 872

MARTIN, J.P. und K. HAIDER (1969)

Phenolic polymers of Stachybotrys atra, Stachybotrys chartarum, and Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation

Soil Sci. 107, 260 - 270

MATSCHKE, J. (1970)

Ein Beitrag zur Huminstoffsynthese durch Streptomyces aureus. 1. Mitt. Stoffwechselvorgänge von Str. aureus

Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Hyg., II. Abt. 125, 85 - 99

MATTSON, S. und E. KOUTLER-ANDERSSON (1943)

The acid-base condition in vegetation, litter and humus: VI. Ammonia fixation and humus nitrogen

Lantbruks Hogskol. Ann. 11, 107 - 134

MEYERS, M.B. (1963)

A direct oxidation of cis-4-hydroxycinnamic acid to umbelliferone

Proc. chem. Soc., 243

MORITA, H. (1965)

The phenolic acids in organic soils

Canad. J. Biochem. 43, 1.277 - 1.280

MURPHY, D. und A.W. MOORE (1960)

A possible structural basis of natural humic acid

Sci. Proc. R. Dublin Soc. Ser. A, 1, 191

MUSSO, H. (1963)

Über Phenol-Oxydationen

Angew. Chem. 75, 965 - 977

MUSSO, H., H.G. MATTHIES, H. BEECKEN und H. KRÄMER (1957)
Zur Konstitution der Orceinfarbstoffe
Angew. Chem. 69, 178

POHL, K.D. (1968)
Struktur und Bindung organischer Substanzen in Tonen
Diss. Aachen

PRATT, E.F. und W.E. BOEHME (1951)
Reactions of naphthoquinones with malonic ester and its analogs. I. Reactions with malonic ester
J. Amer. Chem. Soc. 73, 444 - 448

RIIBER, C.N. (19o2)
Das direkte Überführen der Zimtsäure in α-Truxillsäure
Chem. Ber. 35, 2.9o8 - 2.9o9

RUSKE, W. (1968)
Einführung in die organische Chemie
Weinheim

SALFELD, J.C. (1957)
Zum Reaktionsmechanismus der Purpurogallin-Bildung
Angew. Chem. 69, 723 - 724

SALFELD, J.C. (196o)
Über die Oxydation von Pyrogallol und Pyrogallolderivaten. II. Die Konstitution dimerer 3-Hydroxy-o-benzochinone
Chem. Ber. 93, 737 - 745

SCHEFFER, F. und B. ULRICH (196o)
Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde. III. Teil. Humus
Enke, Stuttgart

SCHEFFER, F., W. ZIECHMANN und J. SCHMIDT (1958)

Über Synthesehuminsäuren aus Polyoxybenzolen. 1. Mitteilung: Die einleitende Phase der Oxydation von Hydrochinon zu Huminsäuren im homogenen System mit alkalischer Reaktion

Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 80, 126 - 133

SCHEFFER, F., W. ZIECHMANN und H. SCHOLZ (1958)

Über Synthesehuminsäuren aus Polyoxybenzolen. 2. Mitteilung: Quantitative Untersuchungen zur Oxydation von Hydrochinon im homogenen System mit alkalischer Reaktion

Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 80, 134 - 149

SCHNITZER, M. (1970)

Characteristics of organic matter extracted from podzol B horizons

Can. J. Soil Sci. 50, 199 - 204

SCHÖNBERG, A. (1958)

Präparative organische Photochemie

Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg

SIGMUND, W. (1914)

Über die Einwirkung von Stoffwechselendprodukten auf die Pflanzen

I. Einwirkung N-haltiger pflanzlicher Stoffwechselendprodukte auf die Keimung von Samen (Alkaloide)

Biochem. Z. 62, 299 - 338

II. Einwirkung N-freier pflanzlicher Stoffwechselendprodukte auf die Keimung von Samen (Glucoside, Gerbstoffe und ihre Spaltungsprodukte)

Biochem. Z. 62, 339 - 386

SILVERSTEIN, R.M. und G.C. BASSLER (1967)

Spectrometric identification of organic compounds

Wiley, New York - London - Sydney, 2nd Ed.

SOWDEN, F.J. und H.J. ATKINSON (1949)

Composition of certain soil organic matter fractions

Soil Sci. 68, 433 - 44o

STAUDINGER, H. (1967)

Anleitung zur organischen qualitativen Analyse

Berlin - Heidelberg - New York, 7. Auflage

STEELINK, C. und G. TOLLIN (1967)

Free radicals in soil

in: A.D. McLAREN und G.H. PETERSON (Ed.) Soil Biochemistry, New York, 147 - 169

STEIN, H.N. und H.J.C. TENDELOO (1959)

The oxidation of phloroglucinol as a model for humification processes

Plant Soil 11, 131 - 138

STEINMETZ, A. (1956)

Modellversuche zur Beteiligung von Polyphenol-oxydasen bei der Bildung natürlicher Huminsäuren

Diss. TH Braunschweig

STEVENSON, F.J., R.M. HARRISON, R. WETSELAAR und R.A. LEEPER (197o)

Nitrosation of soil organic matter: III. Nature of gases produced by reaction of nitrite with lignins, humic substances, and phenolic constituents under neutral and slightly acidic conditions

Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 34, 43o - 435

STOBBE, H. und K. BREMER (1929)

Zur Photochemie der Zimtsäuren, der Chalkone und ihrer Derivate

J. prakt. Chem. 123, 1 - 6o

SWAIN, T. (1960)

Some interrelationships between leuco-anthocyanins and lignin in plants

in: J.B. PRIDHAM (Ed.)
Phenolics in Plants in Health and Disease,
Oxford, 45 - 55

TOWERS, G.H.N. (1964)

Metabolism of phenolics in higher plants and microorganisms

in: J.B. HARBORNE (Ed.)
Biochemistry of Phenolic Compounds, New York, 249 - 294

TOWERS, G.H.N. (1969)

Metabolism of cinnamic acid and its derivatives in basidiomycetes

in: J.B. HARBORNE und T. SWAIN (Ed.)
Perspectives in Phytochemistry, London, 179 - 191

TRIPPETT, S., S. DAGLEY und D.A. STOPHER (1960)

Bacterial oxidation of protocatechuic acid

Biochem. J. 76, 9 P

VOLLERT, C.A.W. (1964)

Mobilisierungsvorgänge an Calcium-, Eisen- und Aluminiumphosphaten durch Chelatoren aus dem Wurzelraum von Luzerne und Steinklee

Diss. Göttingen

WAKSMAN, S.A. und K.R.N. IYER (1932)

Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus:

I. On the synthesis of the "humus nucleus"

Soil Sci. 34, 43 - 69

II. The influence of "synthesized" humus compounds and of "natural humus" upon soil microbiological processes

Soil Sci. 34, 71 - 79

WALTER, H. (196o)
Beitrag zur Kenntnis der Oxydation des Guajakols unter physiologischen Bedingungen
Diss. TH Braunschweig

WANG, T.S.C., T.K. YANG und T.T. CHUANG (1967)
Soil phenolic acids as plant growth inhibitors
Soil Sci. 1o3, 239 - 246

WELTE, E. (1955)
Neuere Ergebnisse der Humusforschung
Angew. Chem. 67, 153 - 155

WHITE, Th. (1957)
Tannins - their occurence and significance
J. Sci. Food Agric. 8, 377 - 385

WHITEHEAD, D.C. (1964)
Identification of p-hydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric, and ferulic acids in soil
Nature, 2o2, 417 - 418

ZIECHMANN, W. und G. PAWELKE (1959)
Zum Vergleich natürlicher und synthetischer Huminsäuren und ihrer Vorstufen
Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. 84, 174 - 184

ZIN, M.K. (1955)
Thesis, University of Reading
zit. n. JENKINSON und TINSLEY (1959)