GÖTTINGER BODENKUNDLICHE BERICHTE



Rudolf Aldag

D-Aminosäuren in Böden und ihr Sorptionsverhalten gegenüber Montmorillonit.—

Ein Beitrag zur Charakterisierung des Aminosäure - Stickstoffs im Boden.

1979

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-Fabatt) Selbstkostenpreis DM

GOTTINGER BODENKUNDLICHE BERICHTE

58

Rudolf Aldag

D-Aminosäuren in Böden und ihr Sorptionsverhalten gegenüber Montmorillonit.—

Ein Beitrag zur Charakterisierung des Aminosäure - Stickstoffs im Boden.

1979

INHALT

ALDAG, R.: ZUM VORKOMMEN UND ZUR IDENTIFIKATION VON D-AMINOSÄUREN IM BODEN

SEITEN 1-67

ALDAG, R.: UNTERSUCHUNGEN ZUR STEREOSPEZIFISCHEN SORPTION VON D- UND L-AMINOSÄUREN AM MONTMORILLONIT

SEITEN 69-131

AUS DEM INSTITUT FÜR BODENKUNDE DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN DIREKTOR: PROF, DR, BRUNK MEYER ALS HABILITATIONSSCHRIFT DER LANDWIRTSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN VORGELEGT. ALDAG, R.:

ZUM VORKOMMEN UND ZUR IDENTIFIKATION VON D-AMINOSAUREN IM BODEN

Göttinger Bodenkundliche Berichte <u>58,</u> 1–67 (1979)

I	Ν	Н	Α	L	Т

C	~	4	+	~
D	e	т	L	e

1.	Einl	eitung	und Problemstellung	4
2.	Theo	retisch	er Teil	7
	2.1	Zur He	rkunft von D-Aminosäuren im Boden	7
		2.1.1	Mikroflora und -fauna	7
		2.1.2	Meso- und Makrofauna	10
		2.1.3	Höhere Pflanzen	12
		2.1.4	Gesteine, Sedimente, Fossilien, Hydrosphäre und Atmosphäre	13
	2.2	Zur Ök	ochemie von D-Aminosäuren im Boden	13
3.	Meth	oden un	d Voruntersuchungen	17
	3.1	Method	len	17
		3.1.1	Literaturübersicht über Methoden zur Bestimmung von D-Aminosäuren	18
		3.1.2	Allgemeine Beschreibung der enzymatisch- chromatographischen Methode zur Bestim- mung von D-Aminosäuren in Bodenhydro- lysatenn	19
		3.1.3	Substratspezifität des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase	22
		3.1.4	Beschreibung eines typischen Inkuba- tionsversuches mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase	24
	3.2	Vorunt von op salzsa Bodenp	cersuchungen zur Frage der Racemisierung otisch aktiven Aminosäuren während der auren Hydrolyse in Gegenwart einer orobe	25
		3.2.1	Zur Racemisierung der proteinogenen L-Aminosäuren des Caseins während der salzsauren Hydrolyse ohne und in Gegenwart von Bodenmaterial	25

		3.2.2	Zur Racemisierung von monomer sowie in Peptidbindung verknüpft vorliegenden D-Aminosäuren während der salzsauren Hydrolyse in Gegenwart von Bodenmaterial	Seite 29
4.	Erge	bnisse		32
	4.1	D-Amin und dr	osäuren in Ah-Horizonten einer Rendsina ei Sauer-Braunerden des Göttinger Waldes	32
	4.2	D-Amin Ackern	osäuren in den Ap-Horizonten unter utzung stehender Sandböden	35
	4.3	D-Amin losung	osäuren in verschiedenen Regenwurm- en	38
	4.4	D-Amin an zwe	osäuren im Ah-Horizont einer Rendsina i Standorten des Göttinger Waldes	42
	4.5	D-Amin Locker	osäuren im Ahe-Horizont einer sauren -Braunerde des Bayerischen Waldes	45
5.	Disk	ussion		48
	5.1	Zur Me graphi in Bod	thode der enzymatisch-chromato- schen Bestimmung von D-Aminosäuren enhydrolysaten	48
	5.2	Zur Fr aktive Hydrol	age der Racemisierung von optisch en Aminosäuren während der salzsauren yse in Gegenwart von Boden	49
	5.3	Zum Vo unter suchte	rkommen von D-Aminosäuren in den Abschnitt 4.1; 4.2 und 4.3 unter- en Böden	50
	5.4	Zum Vo Horizo und im Göttin	rkommen von D-Aminosäuren im Ahe ₁ - nt der sauren Locker-Braunerde A Ah-Horizont der Rendsina des ger Waldes	54
6.	Zusa	mmenfas	sung	56
7.	Meth	oden un	d Material	58
	7.1	Gewinn	ung der gehundenen Aminosäuren	58
	7.2	Materi	al	58
8.	Lite	ratur		60

1. Einleitung und Problemstellung

Zahlreiche Untersuchungen zur Fraktionierung des Bodenstickstoffs haben gezeigt, daß etwa zwischen 92 - 94 % des Gesamtstickstoffs im Boden in organischer Bindung (vorwiegend im Humus) und der Rest von 6 - 8 % in anorganischer Bindung vorliegen (KEENEY und BREMNER, 1964; ALDAG, 1974; LOWE, 1973; KHAN und SOWDEN, 1971; FLEIGE, 1970).

Innerhalb der Fraktion des insgesamt hydrolysierbaren Stickstoffs nimmt die Fraktion des Aminosäure-N den größten Anteil ein.

Dieser Aminosäure-Stickstoff, der im Boden größtenteils in Peptiden und Proteinen gebunden innerhalb der organischen Substanz vorkommt, macht etwa 30 - 50 % des N₊ aus. Hier stellt sich die Frage, ob der Aminosäure-Stickstoff gleich seinem mengenmäßigen Vorkommen im Boden auch in entsprechender Weise an der Stickstoff-Metabolik beteiligt ist. Obwohl bis heute zahlreiche Untersuchungen zur Metabolik und Bilanzierung des Boden-N vorliegen (zusammenfassende Literatur siehe: JANSON, 1971; ALLISON, 1966), hat man diese Frage in vielen Fällen entweder aus finanziellen oder aus methodisch-technischen Gründen nicht so erschöpfend bearbeiten können, daß man hinreichende schlüssige Aussagen zur Metabolik insbesondere des Aminosäure-N treffen könnte. Neuere Arbeiten haben jedoch bestätigt, daß der Aminosäure-N sowohl als Vorratsfraktion als auch bei den Umwandlungsprozessen für die N-Versorgung und N-Nachlieferung im Boden im Zentrum des Geschehens steht. So konnten FLEIGE, MEYER und SCHOLZ (1971) beispielsweise bei der Bilanzierung und Umwandlung der Bindungs-Formen von Boden- und ¹⁵N markiertem Dünger-Stickstoff in einer Acker- Parabraunerde aus Löß zeigen. daß auf der mit Sommergerste bewachsenen Parzelle nur 25 % des von den Pflanzen insgesamt aufgenommenen Stickstoffs (ent-

- 4 -

spricht 40 % des Dünger-N) aus dem Dünger-N stammte¹⁾. Zum Ernte-Zeitpunkt lagen auf dieser Parzelle die verbliebenen 8 % des Dünger-N etwa zu gleichen Anteilen in den Fraktionen Aminosäure-N und heterozyklisch gebundener N vor.

In ähnlichem Zusammenhang müssen auch die Ergebnisse von FLEIGE und BÄUMER (1974) gesehen werden, die den Effekt des pfluglosen Ackerbaus auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff, Gesamt-N und auf die Verteilung des Stickstoffs in verschiedenen N-Fraktionen von Löß-Parabraunerden über einen Versuchszeitraum von fünf Jahren untersuchten. Im Vergleich zu "normal" ackerbaulich bewirtschafteten Böden erhöhte sich infolge des pfluglosen Ackerbaus in der obersten 30 cm-Bodenschicht der Gehalt an organischem Kohlenstoff im Jahr durchschnittlich um 0.59 bis 1,3 t pro ha, der Gehalt an N₊ stieg um 53,8 bis 72,4 kg N pro ha an. Andererseits verursachte der pfluglose Ackerbau in einem zuvor als Grünland genutzten Boden im Jahr durchschnittlich einen Verlust von 2,29 t C und von 162,4 kg N pro ha. Interessanterweise konnten FLEIGE und BÄUMER (1974) nun feststellen. daß der relative Gewinn oder Verlust des N₊ in der obersten 5 cm-Bodenschicht, der durch die unterschiedlichen ackerbaulichen Maßnahmen und Erntepraktiken verursacht worden war, sich am deutlichsten in der Fraktion des Aminosäure-N zu erkennen gab. Die relativen Veränderungen lagen in der Fraktion des Aminosäure-N zwischen 53 und 67 %. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der pfluglose Ackerbau offenbar veränderte Bedingungen im Boden schafft, die hinsichtlich des Stickstoffs zum Aufbau und zur Anreicherung einer stickstoffreicheren organischen Substanz führt, wie es auch unter Grünland von HUNTJENS (1971) beobachtet wurde. In sich daran anschließenden Arbeiten konnte HUNTJENS (1972a) dann auch zeigen, daß sich die Aminosäure-Muster in den Hydrolysaten eines Ackerbodens, eines Grünland-Bodens und in den Hydrolysaten der extrahierten Huminsäuren dieser Böden (jeweils bezogen auf den Gesamt-N des hydrolysierten Substrates) sehr ähnelten.

¹⁾ Aufgrund besonderer Witterungsverhältnisse (stark wechselnde Feuchte- und Trockenphasen) waren bis zu 50 % des Dünger-N nach Ansicht der Autoren gasförmig verloren gegangen.

Andererseits konnte aber ein proteolytisch aktiver Pseudomonas-Stamm aus den extrahierten Huminsäuren des Grünland-Bodens etwa doppelt so viel N mobilisieren wie aus der vergleichbaren Huminsäure des Ackerbodens (HUNTJENS, 1972b). Damit glaubte man nachgewiesen zu haben, daß in der organischen Substanz des Grünland-Bodens mehr und biologisch leichter abbaubares proteinhaltiges Material inkorporiert war als in der des Ackerbodens.

SÖRENSEN (1972a) hat sich unlängst mit der Frage beschäftigt, inwieweit Tonminerale neu gebildete Aminosäure-Metabolite im Boden stabilisieren können. Zu diesem Zwecke war ein sandiger Boden, der im Bereich zwischen 3 und 7 % mit Montmorillonit angereichert war, mit C¹⁴-markierter Zellulose, Hemizellulose und Glukose inkubiert worden. Die Anwesenheit von Montmorillonit übte einen deutlichen Stabilisierungseffekt auf die Aminosäure-Derivate aus. die aus den C¹⁴-markierten Kohlehydraten stammten. Die mit Montmorillonit angereicherten Böden enthielten 2 - 3 mal mehr C¹⁴-Aminosäure-Kohlenstoff als der sandige Vergleichsboden. Außerdem konnte man nachweisen, daß sich diese neu gebildeten C¹⁴-Aminosäuren weniger leicht mit Dowex-A-1 extrahieren ließen als die entsprechenden Aminosäuren aus dem reinen Sandboden. In einer weiteren Arbeit, der offensichtlich die gleiche Versuchsanstellung zugrunde liegt, hat SÖRENSEN (1972b) die Rolle der C¹⁴-Aminosäure-Metabolite bei der Bildung der organischen Substanz über einen Zeitraum von sechs Jahren verfolgt. Immerhin waren zwischen 26 und 30 % des insgesamt C¹⁴-markierten Kohlenstoffs, der nach sechs Jahren Inkubationszeit noch im Boden nachzuweisen war, in Form von Aminosäure-C¹⁴ gebunden. wenn der C¹⁴-Kohlenstoff dem Boden in Form von Zellulose appliziert worden war. Wenn man C¹⁴-Glukose als C-Quelle verwendete. lag der entsprechende Wert sogar bei 43 %. Mit diesen Ergebnissen wird erneut bestätigt, daß ein beträchtlicher Anteil des C¹⁴-Kohlenstoffs, sobald er von der Bodenflora und -fauna in Aminosäuren und Proteine eingebaut worden ist, bereits in recht stabiler Bindung im Boden vorliegt. Nach den Befunden von SÖRENSEN (1972b) hatte der Aminosäure-Kohlenstoff, der

nach einer Inkubationszeit von 100 - 300 Tagen noch im Boden verblieben war, eine Halbwertszeit von 6 - 7 Jahren.

Jüngste eigene Untersuchungen zu Fragen der Mineralisierung des bodenbürtigen Stickstoffs haben diese Befunde vollauf bestätigt (ALDAG, 1976; ALDAG et al., 1977). Bei Bebrütungsversuchen unter aeroben Bedingungen konnten wir zeigen, daß bei zahlreichen von der Genese her unterschiedlichen Böden die Fraktion des Aminosäure-N als der Hauptlieferant für den mineralisierten Stickstoff anzusehen ist.

Bei all diesen Betrachtungen ist ein Aspekt des Aminosäure-N bisher völlig unbeachtet geblieben. Das ist nämlich die Frage, ob diese Aminosäuren ausnahmslos zu den proteinogenen Aminosäuren der L-Reihe oder auch teilweise zu den unnatürlich konfigurierten nichtproteinogenen Aminosäuren der D-Reihe gehören.

Um zu klären, ob diese Frage für den Boden von Bedeutung ist, seien im folgenden einige Erläuterungen zur Herkunft und zur Ökochemie von D-Aminosäuren im Boden erlaubt.

2. Theoretischer Teil

2.1 Zur Herkunft von D-Aminosäuren im Boden

2.1.1 Mikroflora und -fauna

Grundsätzlich kommen als mögliche Lieferanten von D-Aminosäuren alle Partner in Frage, die im Ökosystem Boden leben oder mit ihm in Wechselwirkung stehen.

Parallel mit den fortlaufend verbesserten Untersuchungsmethoden sind in den letzten Jahren bei den Bakterien zahlreiche D-Aminosäuren nachgewiesen worden (SALTON, 1964; TAKEBE, 1965; KURAMITSU and SNOKE, 1962). In den Mucopeptiden der Zellwände sind beispielsweise die D-Glutaminsäure und das D-Alanin mit anderen L-Aminosäuren peptidartig verknüpft (siehe Abbildung 1).



Aus den ^Zellen verschiedener Hefen (Candida giulliermondii, Candida pulcherrima und Torulopsis globosa) haben BHATTACHARYYA und BANERJEE (1969) zahlreiche D-Aminosäuren in freier Form extrahieren können.

Von noch größerer Bedeutung als mögliche Quelle für den D-Aminosäure-Pool im Boden scheint die große Zahl der bisher bekannt gewordenen Antibiotika zu sein. Bemerkenswert ist, daß ein wichtiges Strukturmerkmal dieser Antibiotika, nämlich ihr Peptidcharakter und die große Anzahl der darin verknüpften D-Aminosäuren, allgemein kaum beachtet worden ist. Allerdings ist die Fähigkeit, Antibiotika zu produzieren, sehr ungleich über das System der Mikroorganismen verteilt. Nach der Übersicht von ZÄHNER (1965) verteilte sich die Anzahl der bis dahin bekannt gewordenen und eindeutig charakterisierten Antibiotika auf folgende Gruppen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Angaben zur Verbreitung bekannt gewordener Antibiotika im Bereich der Mikroflora und -fauna (nach ZÄHNER,1965)

Mikroflora und -fauna	beschriebene Antibiotika	davon als Chemotherap eut ica verwendet		
Bakterien Pseudomonales Eubacteriales Actinomycetales	10 65 301	0 5 26		
Pilze	131	7		
Algen und Flechten	6	0		
Myxomyceten und Acrasiales	0	0		

Aus der Tab. 1 geht hervor, daß gerade die Pilze und bei den Bakterien die Actinomyceten und Eubacteriales die Hauptproduzenten von Antibiotika sind. Diese Aufstellung gewinnt ferner an Bedeutung, wenn man daran erinnert, daß zwischen 60-80% des Edaphons im Boden je zur Hälfte aus Bakterien und Actinomyceten sowie aus Pilzen und Algen gebildet wird.

- 9 -

In verschiedenen Antibiotika sind bis heute folgende D-Aminosäuren nachgewiesen worden: D-Alanin, D-Asparaginsäure, D-& Aminobuttersäure, D-&, & -Diaminobuttersäure, D-Glutaminsäure, D-Alloisoleucin, D-Cystein, D-Leucin, D-Ornithin, D-Phenylalanin, D-Prolin, D-Serin, D-Allothreonin, D-Tryptophan und D-Valin (nach BODANSZKY und PERLMAN, 1969). An dieser Aufzählung fällt auf, daß – abgesehen vom D-Ornithin – die D-Isomeren der basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin nicht vertreten sind.

2.1.2 Meso- und Makrofauna

Erst in letzter Zeit sind zahlreiche Beispiele bekannt geworden, wo D-Aminosäuren auch innerhalb des Tierreiches, besonders bei den Wirbellosen, nachgewiesen worden sind. Es sei auf die zusammenfassende Literatur bei CORRIGAN (1969) hingewiesen. Für den Bodenkundler von besonderem Interesse ist das Vorkommen des D-Serins im Lombricin (siehe Abb. 2) des Regenwurmes (Lumbricus terrestris). Der Nachweis des D-Serins bei Regenwürmern geht im wesentlichen auf die Arbeiten von ROSENBERG und ENNOR (1960) zurück (siehe Abb. 2).

Abbildung 2: Strukturformeln des Lombricins bzw. des N-Phosphoryllombricins nach CORRIGAN (1969)



R = H = Lombricin $R = PO_3H_2 = N-Phosphoryllombricin$ Nach den Untersuchungen von GAFFNEY et al. (1964) wird im Regenwurm mit Hilfe des Enzyms ATP-Lombricin-Phosphotransferase das Lombricin zum N-Phosphoryl-Lombricin (siehe Abb. 2) aufgebaut, während z. B. Arginin oder Kreatin nicht phosphoryliert werden. Das N-Phosphoryllombricin hat insofern eine besondere Bedeutung, als es ein hohes Phosphatgruppen-Übertragungspotential besitzt und auf enzymatischem Wege ADP sehr leicht wieder in ATP umwandeln kann. Um einen allgemeinen Überblick über das Vorkommen von D-Aminosäuren im Tierreich zu geben, sei die Übersicht von CORRIGAN (1969) angeführt (siehe Tab. 2).

Amino acid	Source	Chemical form
D-Alanine	Anserine muscle	Free
D-Alanine D-Alanine	Milkweed bug Two species of	Free
2	lepidopterous larvae	Free
D-Alanine	Guinea pig blood	Free
propionic acid	lepidopterous larvae	Free
D-Glutamic acid	May beetle muscle	Free
D-Ornithine	Shark liver	Free
D-Pyrrolidone carboxylic acid	Human urine	Free
D-Serine	Eleven species of	
2 2	lepidopterous pupae	Free
D-Alanine	Octopus muscle	In octopine
D-Cysteine	Firefly lantern	In luciferin
D-Serine	Earthworm	In serine ethanolamine phosphodiester,lombri cine,N-phosphoryl- lombricine, and free

Tabelle 2: Verteilung von D-Aminosäuren im Tierreich (nach CORRIGAN, 1969)

2.1.3 Höhere Pflanzen

Obwohl für den Bereich der höheren Pflanzen bis heute weit mehr als 100 nichtproteinogene Aminosäuren mit unnatürlicher Konstitution bekannt sind (FOWDEN, 1964; THOMPSON et al., 1969; BELL, 1976; KRISTENSEN et al., 1974; KRISTENSEN und LARSEN, 1974), ist über das Vorkommen von D-Aminosäuren bislang nur vereinzelt berichtet worden. ZENK und SCHERF (1963) konnten in Früchten und vegetativem Gewebe von 14 Pflanzenarten D-Tryptophan nachweisen. LARSEN (1966) identifizierte in allen Pflanzenteilen von Reseda odorata L. und Reseda lutea L. neben anderen metacarboxy-substituierten aromatischen Aminosäuren D-(3-carboxyphenyl) glycin und D-(3-caboxy-4-hydroxyphenyl) glycin (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: <u>Strukturformeln des D-(3-carboxyphenyl) glycins</u> und des D-(3-carboxy-4-OH-phenyl) glycins



Ferner ist es GRAY (1972) unlängst gelungen, trans-4 hydroxymethyl-D-Prolin in den Samen von Eriobotrya japonica (Jap.Mispel, Familie der Rosaceae) nachzuweisen.

Man darf davon ausgehen, daß in zahlreichen Fällen bei der Entdeckung neuer nichtproteinogener Aminosäuren im Pflanzenreich deren Konfiguration vielfach nicht bestimmt wurde. Deshalb muß für diesen Bereich in Zukunft mit der Entdeckung weiterer D-Aminosäuren gerechnet werden.

2.1.4 Gesteine, Sedimente, Fossilien, Hydrosphäre Atmosphäre

In allen oben genannten Quellen sind Aminosäuren in freier und gebundener Form nachgewiesen worden. Abgesehen von den Sedimenten und der Hydrosphäre dürften sie für die Metabolik des Aminosäure-N in terrestrischen Böden von untergeordneter Bedeutung sein. Zur Geochemie der Proteine, Peptide und Aminosäuren gibt HARE (1970) einen zusammenfassenden Überblick. Neuere Arbeiten berichten über den Gehalt an freien Aminosäuren im Wasser des Nordatlantiks (POCKLINGTON, 1971), die im Durchschnitt 4 % des insgesamt im Wasser gelösten organisch gebundenen Stickstoffs ausmachten. KVENVOLDEN et al. (1970) und WEHMILLER und HARE (1971) haben Tiefsee-Sedimente auf ihren Aminosäuregehalt und den Racemisierungsgrad der Aminosäuren in Abhängigkeit von Alter, Temperatur und Entstehung der Substrate untersucht.

2.2 Zur Ökochemie von D-Aminosäuren im Boden

Die besondere ökochemische Bedeutung der D-Aminosäuren scheint darin zu bestehen, daß ihr Vorkommen auf ganz bestimmte Gruppen, Arten oder Spezies von Organismen beschränkt ist und somit auch ihr Ab- und Umbau nur wenigen Partnern des Systems voll gelingt.

Inwieweit diese Schlußfolgerungen auf das Ökosystem Boden übertragbar sind, ist bisher kaum erforscht. Andererseits liegen zahlreiche Einzeluntersuchungen an Mikroorganismen und Pflanzen und auch zu Wechselwirkungen zwischen den beiden vorgenannten Partnern vor, in denen der "Antimetabolit"-Charakter einiger D-Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. So hat SCHWINGHAMER (1968) beispielsweise festgestellt, daß zahlreiche Rhizobien-Stämme, nachdem sie auf Nährböden mit D-Aminosäure-Zusätzen kultiviert worden waren, zwar resistente Stämme ausbildeten, diese aber die Fähigkeit zur effektiven Symbiose völlig verloren hatten. Ähnliche Beobachtungen machte auch HAMDI (1969) an bestimmten Stämmen von Rhizobium meliloti, die mit D-Methionin behandelt worden waren. EGAWA et al. (1968) beobachteten, daß Fusarium roseum Link auf einem modifizierten Czapek-D-Aminosäure-Medium unnatürliches Mycel bildete.

Allgemein darf man davon ausgehen, daß die Mikroflora- und fauna des Bodens enzymatisch am besten ausgerüstet ist, um D-Aminosäuren metabolisieren zu können. POKORNY et al. (1970) haben dies bestätigen können, indem sie in einer umfangreichen Studie den Metabolismus von D- und L-Methionin bei niederen und höheren Pflanzen studierten. Bakterien, Algen, Pilze (incl. Basidiomyceten) und Flechten konnten C¹⁴-D-Methionin glatt in C¹⁴-L-Methionin umwandeln. Hingegen ist der Metabolismus der D-Aminosäuren bei höheren Pflanzen noch nicht völlig geklärt. Ein Haupt-Abbauweg (manche Autoren haben auch von einer Inaktivierung oder Immobilisierung gesprochen) scheint bei höheren Pflanzen mit der N-Malonylierung oder N-Acetylierung der applizierten D-Aminosäure zu enden. In zahlreichen Arbeiten wie auch in eigenen Untersuchungen konnte dieser Metabolismus bestätigt werden (ZENK und SCHERF, 1964; ROSA and NEISH, 1967; ESCHRICH und HARTMANN, 1969; KEGLEVIC et al., 1968; ALDAG und YOUNG, 1970a, ALDAG und YOUNG. 1970b; LADEŠIC et al., 1971). Weiterführende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß höhere Pflanzen D-Aminosäuren nicht nur ausschließlich in sog. "N-Acyl-Derivate" umwandeln. sondern daß sie offensichtlich zu einer weitergehenden Metabolisierung befähigt sind, die teils mit der Umwandlung in die korrespondierende L-Aminosäure und ausschließlichem Einbau in arteigene Proteine, teils mit dem Abbau von CO2 endet (ALDAG et al., 1972; FÜHR und STEFFENS, 1972; ALDAG und YOUNG, 1974).

- 14 -

In der älteren Literatur sind zahlreiche Arbeiten bekannt geworden, in denen durch Applikation von D-Aminosäuren Schadsymptome an Pflanzen (Chlorosen, Nekrosen, Blattabfall etc.) verursacht worden sind. Zusammenfassende Literatur dazu ist bei ALDAG (1966) zu finden. In ähnlichem Zusammenhang muß auch die antimetabolische Hemmung des Streckungswachstums von Haferkoleoptilsegmenten durch ortho- und meta-DL-Tyrosin gesehen werden (FRIES, 1971). Schließlich haben sich zahlreiche Autoren mit dem chemotherapeutischen Effekt von D-Aminosäuren und anderen Aminosäure - Derivaten auf Pilzkrankheiten befaßt. Einen ausführlichen Überblick dazu gibt VAN ANDEL (1966).

In manchen Fällen wirkten die D-Aminosäuren unmittelbar toxisch auf den Schaderreger, in anderen Beispielen wurde nur eine indirekte Wirkung über die Wirtspflanze erzielt. In vielen der bei VAN ANDEL (1966) zitierten Arbeiten ist leider nur das Racemat der betreffenden Aminosäure als Chemotherapeutikum eingesetzt worden, so daß nicht immer klar wird, von welcher der beiden stereoisomeren Aminosäuren nun die Hauptwirkung ausgegangen ist.

Erste Arbeiten zur ökochemischen Bedeutung von D-Aminosäuren im Boden sind von KICKUTH und ALDAG (1967) begonnen worden. Hier wurde der Einfluß von D-Tryptophen, D-Phenylalanin, D-Valin und D-Methionin auf Oldenburger Weidelgras in Abhängigkeit von einer steigenden N-Düngung in Gefäßversuchen unter nichtsterilen Bedingungen geprüft.

Überraschenderweise verursachten alle vier D-Aminosäuren eine Beschleunigung der Trochensubstanzproduktion ohne Qualitätsbeeinflussung. Die mit D-Aminosäuren gedüngten Pflanzen erreichten den Normalertrag der Vergleichsparzellen nachdem die Versuchszeit etwa erst zur Hälfte verstrichen war.

- 15 -

Nachdem im einzelnen dargelegt wurde, daß zahlreiche biologisch wie auch geochemisch recht unterschiedlich organisierte und strukturierte Partner des Ökosystems Boden als mögliche Lieferanten für D-Aminosäuren anzusehen sind, war nunmehr der Nachweis zu erbringen, ob im Boden D-Aminosäuren vorkommen und wie groß folglich der Anteil des D-Aminosäure-Stickstoffs am Gesamt-Aminosäure-N des Bodens ist.

Um Mißverständnissen vorzubeugen wird betont, daß das Ziel dieser Untersuchungen zunächst darauf gerichtet war, den D-Aminosäure-^Gehalt in unterschiedlichen Böden zu bestimmen.

Diese Frage ist insofern von Bedeutung, als darüber bis heute kaum etwas bekannt ist.

Die quantitative Erfassung der D-Aminosäuren ist nur mit Hilfe eines sauren Hydrolyse-Aufschlusses einigermaßen zufriedenstellend (siehe später Abschnitt 3. Methoden und Voruntersuchungen) zu lösen. Alle anderen methodischen Ansätze wie etwa Extraktion von freien Aminosäuren, Extraktion von Peptiden und Proteinen oder Extraktion sowie Abtrennung der organischen von der mineralischen Substanz des Bodens müssen insofern unvolkommen bleiben, als dabei nur bestimmte Stoffgruppen und Fraktionen der organischen Substanz erfaßt werden.

Gerade aufgrund der Tatsache, daß Peptide und Proteine im Ton-Humus-Komplex eines Mulls beispielsweise in fester Bindung vorliegen, macht die salzsaure Hydrolyse für diese Fragestellung zur Methode der Wahl.

Erst wenn solche grundlegenden quantitativen Angaben vorliegen, kann in Modellversuchen geprüft werden, in welchem Umfange z.B. in ringförmigen Peptiden, Peptoliden oder Antibiotika gebundene D-Aminosäuren sich biochemisch im Vergleich zu korrespondierenden L-Aminosäuren verhalten.

Das <u>Hauptziel</u> dieser Untersuchung besteht also darin, die weitaus wichtigste bodenbürtige Stickstoff-Fraktion - nämlich den Aminosäure-Stickstoff - nicht nur quantitativ hinsichtlich des Gesamt-N-Gehaltes, sondern den &-Aminosäure-N auch konfigurativ hinsichtlich seiner Zugehörigkeit zur proteinogenen L-Reihe oder zur nichtproteinogenen D-Reihe zu untersuchen.

3. Methoden und Voruntersuchungen

3.1 Methoden

Abgesehen von einigen Einzeluntersuchungen, (BREMNER, 1950 ; POLLOCK und FROMMHAGEN, 1968) die mehr aus methodischen Überlegungen vorgenommen wurden, ist bis heute niemand der Frage nachgegangen, bis zu welchem Ausmaß die aus dem Boden durch Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren der proteinogenen L-Reihe oder der nichtproteinogenen D-Reihe angehören. Für diesen Tatbestand mögen zwei Gründe verantwortlich gewesen sein:

- Bis vor etwa 10 15 Jahren sind die D-Aminosäuren in den Lehrbüchern und in der Zeitschriften-Literatur allenfalls kurz erwähnt worden, und es wurde immer besonders betont, daß alle Enzyme und Proteine im gesamten Lebensbereich ausschließlich aus L-Aminosäuren zusammengesetzt sind.
- Aus methodischen Gründen war es schwierig, in biologischen Systemen D-Aminosäuren in Gegenwart großer Anteile von L-Aminosäuren zu bestimmen.

Auch für die hier gestellte Aufgabe galt es zu Beginn der praktischen Arbeiten einige methodische Probleme zu lösen, die zwangsläufig mit der Extraktion – bzw. Hydrolyse der Aminosäuren aus dem Boden und den sich daran anschließenden Reinigungs- und Trennungsoperationen zusammenhängen. Weitere Fragen, die sich mit der Aufbereitung, Reinigung etc. von Boden- und Proteinhydrolysaten befassen, sind von ALDAG et al. (1971) erörtert worden.

In den letzten 5 - 8 Jahren hat die analytische Trennung von Aminosäure-Racematen in der Literatur aus verschiedenen Gründen ein sehr starkes Interesse gefunden. Zur Lösung des Problems haben sich hauptsächlich zwei unterschiedliche Arbeitsverfahren herausgeschält, die einmal mit chemischen Methoden (Derivatisierung,Bildung von Diastereoisomeren) und zum anderen mit <u>enzymatischen</u> <u>Methoden</u> (oxidative Desaminierung, enzymatische N-Acetylierung) vorgehen. Im folgenden sind einige der neueren Methoden zur Bestimmung optisch aktiver Aminosäuren,gegliedert nach diesen beiden Gesichtspunkten,aufgeführt.

- 3.1.1 Literaturübersicht über Methoden zur Bestimmung von D-Aminosäuren
- I. Chemische Verfahren:
- a) Resolution and separation of racemic amino acids by gas chromatography and the application to protein analysis (POLLOCK and OYAMA, 1966)
- b) Determination of D-and L-Amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L Dipeptides (MANNING and MOORE, 1968)
- c) Resolution of racemic aspartic acid, tryptophan, hydroxy-and sulfhydryl amino acids by gas chromatography (POLLOCK and KAWAUCHI, 1968)
- d) Resolution of DL- Azetidine 2 carboxylic acid (RODEBAUGH and CROMWELL, 1969)
- e) Gas chromatography with optically active stationary phases: resolution of amino acids (NAKAPARKSIN et al, 1970)
- f) Investigation of the diastereoisomeric association complex for the separation of amino acid enantiomers on optically active stationary phases (GROHMANN und PARR, 1972)
- II. Enzymatische Verfahren:
- a) Determination of D-amino acids by stereospecific enzymatic acetylation (SCHMIDT und ZENK, 1968)

- 18 -

- b) Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl - 2 - benzothiazolone hydrazone hydrochloride (SODA, 1968)
- c) Procedure for determination of D-amino acids (LARSON et al., 1971)
- d) An enzymatic chromatographic procedure for the determination of D-amino acids in plant and soil extracts (ALDAG et al., 1971)
- e) Comparative effectiveness of several D-amino acid oxidases (YOUNG and YAMAMOTO, 1973)

Nach dem Abwägen aller Vor- und Nachteile hatten wir uns entschlossen, in Kombination mit der Ionenaustausch-Chromatographie ein Verfahren zu entwickeln, das mit Hilfe des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase eine Bestimmung mehrerer D-Aminosäuren, die in komplexen Gemischen wie etwa Protein- oder Bodenhydrolysaten vorliegen könnten, in einem Arbeitsgang gestattet.

Obwohl die Methode in der Literatur bereits ausführlich beschrieben ist, (ALDAG et al., 1971) sollen das allgemeine Prinzip und die einzelnen Arbeitsschritte noch einmal kurz erläutert werden, zumal inzwischen einige Veränderungen und Verbesserungen vorgenommen wurden.

3.1.2 Allgemeine Beschreibung der enzymatisch-chromatographischen Methode zur Bestimmung von D-Aminosäuren in Bodenhydrolysaten

Ein aliquotes Volumen eines bestimmten Bodenhydrolysates wird unter Versuchsbedingungen (siehe Beschreibung der Methode 3.1.2) mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase inkubiert. Unabhängig von den zu jedem Enzymversuch gehörenden Null- und Vergleichsgliedern wird jedem Oxidationsansatz eine bestimmte Substratmenge $1 - C^{14}$ - D -Valin als interner Standard zugesetzt (ca. 10-20 mMol C^{14} - D -Valin). Nach Beendigung des Versuches wird das Enzym nach Zugabe von Trichloressigsäure gefällt und durch Zentrifugieren entfernt. Anschließend wird die Probe quantitativ auf die Säule des automatischen Aminosäure-Analysators (AAA) gegeben und dort nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie in die Einzelkomponenten getrennt. Bevor das Säuleneluat in das Ninhydrinbad des AAA gelangt, passiert es im Durchlaufverfahren eine mit Anthracen gefüllte Zelle eines Durchflußszintillationszählers (Coruflow, ICN Tracerlab), wo die C¹⁴-Zerfälle des als interner Standard zugesetzten C¹⁴-D-Valins vermessen und mit einem Schreiber (Texas Instr. Inc.) aufgezeichnet werden. Danach gelangt das Säuleneluat in das Ninhydrinbad des AAA, wo dann erst die quantitative Vermessung jeder Aminosäure über die Ninhydrinreaktion mit anschließender Registrierung durch den Schreiber des AAA erfolgt. Dieser Vorgang soll an Hand der Abb. 4 kurz erläutert werden.

Abbildung 4: Aminosäure-Spektren aus dem Bodenhydrolysat eines Ah-Horizontes einer Rendsina (Buche) des Göttinger Waldes



Unteres Chromatogramm: nicht oxidiert

<u>Mittleres Chromatogramm</u>: oxidiert mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidaso <u>Oberes Chromatogramm</u>: Radio-Chromatogramm des dem Oxidationsansatz zugegebenen 1-C¹⁴-D-Valins (siehe mittleres Chromatogramm); da komplett oxidiert, nunmehr als 1-C¹⁴-d-keto-isovaleriansäure registrier Auf dem unteren Chromatogramm in der Abb. 4 sind die einzelnen Aminosäuren des Bodenhydrolysates der Rendsina aufgezeichnet. Darin sind sowohl die L- als auch - wenn überhaupt vorhanden die jeweilige D-Form jeder einzelnen Aminosäure in einem "peak" vereinigt aufgezeichnet, da die Stereoisomeren bekanntlich mit der Methode der Ionenaustausch-Chromatographie nicht voneinander getrennt werden können. Der "peak" des internen Standards DL-Norleucin repräsentiert z.B. die Menge von 125 Nanomol. Auf dem mittleren Chromatogramm ist die gleiche Hydrolysatmenge der Rendsina wie auf dem unteren Chromatogramm aufgetrennt worden. Der einzige Unterschied zum unteren Chromatogramm besteht lediglich darin, daß diese Probe vor der Trennung am AAA unter Zugabe von 10 mMol C¹⁴-D-Valin mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase inkubiert worden ist.

Auf dem oberen Chromatogramm der Abb. 4 sind die radioaktiven Zerfälle, die mit dem Durchflußszintillationszähler parallel zur Auftrennung am AAA – nur mit einem Zeitvorschub von 14-15 Minuten – registriert worden sind, aufgezeichnet. (Der Zeitvorschub auf dem oberen Chromatogramm gegenüber dem mittleren Chromatogramm ist durch Versetzen des oberen Chromatogramms um das entsprechende Zeitintervall von 15 Minuten nach rechts ausgeglichen worden, so daß diese Zeitverschiebung in der Abb. 4 nicht sichtbar wird. Wenn der interne Standard $1-C^{14}$ -D-Valin nicht komplett oxidiert worden wäre, hätte ein entsprechender C^{14} -peak genau über dem auf dem mittleren Chromatogramm durch Ninhydrinreaktion registrierten Valin des Bodenhydrolysates erscheinen müssen).

Da auf dem oberen Chromatogramm also nur das Oxidationsendprodukt des 1-C¹⁴-D-Valins, nämlich die 1-C¹⁴-Q(-keto-isova€eriansäure als "peak" abgebildet ist, kann gefolgert werden, daß das Enzym in diesem Ansatz voll wirksam geworden ist.

Zur quantitativen Bestimmung der D-Aminosäuren werden die Flächen der Peaks für die einzelnen Aminosäuren des oxidierten und des nichtoxidierten Ansatzes nach bekannten Methoden berechnet und anschließend durch Differenzrechnung der D-Aminosäure-Anteil bestimmt. Der Fehlerbereich bei der Bestimmung der Aminosäuren liegt bei unserem Analysator zwischen 2 und 4,5 %.

Deutlich sichtbare Unterschiede in der Höhe der einzelnen peaks auf dem unteren und mittleren Chromatogramm sind beim Norleucin und beim Ammoniak zu erkennen. Da als interner Standard DL-Norleucin benutzt wurde, ist nach der Oxidation auf dem mittleren Chromatogramm nur noch die L-Isomere des Norleucins vorhanden. Da andererseits bei der oxidativen Desaminierung der D-Aminosäuren die α -NH₂-Gruppe in NH₃ umgewandelt wird, muß im Oxidationsansatz bei Vorhandensein von D-Aminosäuren am Ende der Inkubationszeit insgesamt die Menge des registrierten Ammoniaks im Vergleich zur nicht oxidierten Probe zunehmen (siehe Abb. 4).

Bei den anderen Aminosäuren sind die Unterschiede zwischen der nichtoxidierten und der oxidierten Probe so gering (Nano-Mol-Bereich daß sie auf der Abb. 4 nicht erkannt werden können.

3.1.3 Substratspezifität des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase

Bei der enzymatischen Oxidation zahlreicher D-Aminosäuren muß ferner berücksichtigt werden, daß das Enzym D-Aminosäure-Oxidase eine unterschiedliche Effektivität gegenüber einigen D-Aminosäuren entfaltet.

Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen ergaben sich hinsichtlich der getesteten D-Aminosäuren folgende Substratspezifitäten für das Enzym (siehe Tab. 3).

Tabelle	3:	Effektivität des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase gegenüber
		verschiedenen D-Aminosäuren unter vorgegebenen Ver-
		suchsbedingungen.*

D-Aminosäure	Menge As oxidiert (in % der Ausgangsmenge)
D-Asparaginsäure	55
D-Threonin	100
D-Serin	100
D-Glutaminsäure	19
D-Prolin	100
D-Alanin	100
D-Valin	100
D-Methionin	100
D-Isoleucin	100
D-Alloisoleucin	100
D-Leucin	100
D-Tyrosin	100
D-Phenylalanin	100
D-Lysin	94
D-Histidin	90
D-Arginin	100

* Die Menge der D-Aminosäure, die von dem Enzym oxidiert wurde, wurde durch Differenzrechnung über die Werte der Ninhydrinreaktion vor und nach der Enzym-Behandlung ermittelt. Die oben angebene Effektivität konnte bei Vorhandensein von ca. 40 n Mol jeder D-Aminosäure pro Inkubationsgefäß erzielt werden. Die Angaben sind Mittelwerte aus 5 Wiederholungen, die zeitlich voneinander abgesetzt mit verschiedenen Enzymchargen vorgenommen wurden.

Da das Enzym D-Aminosäure-Oxidase gegenüber den D-Aminosäuren Lysin und Histidin insbesondere aber gegenüber den beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure eine geringere bzw. schwache Aktivität entwickelt, muß dieser Umstand jeweils bei der Berechnung der Mengen an oxidierter D-Aminosäure mit berücksichtigt werden. In diesem Stadium der Untersuchungen wurde davon abgesehen,weil der Umfang des vorliegenden bearbeiteten Materials diese Berechnung kaum rechtfertigt (siehe auch Diskussion). 3.1.4 Beschreibung eines typischen Inkubationsversuches mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase

Im folgenden sei ein typischer Inkubationsversuch kurz beschrieben.

<u>Inkubationsgefäß:</u> Zentrifugenglas (Volumen: 10 ml) Die Inkubation findet unter ständigem leichten Schütteln in einem thermostatisierten Wasserbad bei 37° C statt.

Die Reagenzien werden in der angegebenen Reihenfolge zugegeben.

anschließend Probe quantitativ auf die Säule des Aminosäure-Analysators geben und analysieren

Zu jeder Oxidationsserie gehören in der Regel 10-15 Einzelansätze,
zu denen jeweils folgende Vergleichsvarianten gehören:
a) nur Enzym (Katalase + Oxidase)
b) Enzym + interner Standard
c) Enzym + interner Standard + Standard-D-Aminosäure-Lösung
d) Enzym + interner Standard + Standard-D-Aminosäure-Lösung

Die Enzymlösungen werden unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt.

3.2 <u>Voruntersuchungen zur Frage der Racemisierung von optisch</u> aktiven Aminosäuren während der salzsauren Hydrolyse in <u>Gegenwart einer Bodenprobe¹⁾</u>

Von entscheidender Bedeutung für den Gehalt an D-Aminosäuren in Bodenhydrolysaten ist die methodische Frage, in welchem Umfange die im Boden meist in peptidogener oder proteinogener Bindung vorhandenen D- und L-Aminosäuren während des Hydrolyse-Aufschlusses möglicherweise einer Racemisierung unterliegen. Es ist bekannt, daß eine alkalische Vorbehandlung oder alkalische Hydrolyse eines Proteins zu einer Racemisierung der einzelnen Aminosäuren führen kann, hingegen sind Racemisierungserscheinungen bei einer sauren Hydrolyse, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, kaum zu erwarten (POLLOCK und FROMMHAGEN, 1968).

Hingegen ist bis heute nicht erforscht, ob die saure Hydrolyse in Gegenwart von Bodenmaterial eine Racemisierung im oben geäußerten Sinne bewirkt.

3.2. 1 Zur Racemisierung der proteinogenen L-Aminosäuren des Caseins während der salzsauren Hydrolyse ohne und in Gegenwart von Bodenmaterial

Um die Frage nach der Racemisierung der proteinogenen L-Aminosäuren unter den in dieser Arbeit angewendeten Hydrolyse-Bedingungen zu überprüfen, wurden jeweils 110 mg Casein (Merck Nr. 2244) ohne und in Gegenwart von Bodenmaterial unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie sie auch bei den Hydrolysen der Bodenproben eingehalten wurden, aufgeschlossen. Bei den Hydrolyseansätzen"mit Bodenzusatz" wurde pro Hydrolyseansatz jeweils 1 g Boden der Löß-Parabraunerde aus Rosdorf bei Göttingen hinzugegeben. Diese Löß-Parabraunerde kann aufgrund ihrer Kenndaten (pH-Wert, Humusgehalt, Gesamtstickstoff-Gehalt,

¹⁾ Die Anregung zur Überprüfung dieser methodischen Frage wurde von Professor Stegemann, Biologische Bundesanstalt Braunschweig, gegeben.

mineralogische Zusammensetzung, siehe auch ALDAG (1976) und RICHTER, 1974), für diese Fragestellung als repräsentativ angesehen werden. Nach dem Abdampfen der überschüssigen Salzsäure im Vakuum wurden aliquote Mengen der Hydrolysate mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase behandelt und nach beschriebener Methode (siehe Abschnitt 3.1.4) der Anteil der D-Amonosäuren und damit der mögliche Racemisierungseffekt bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt. Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß ohne Zugabe des Bodens beim Prolin ein signifikanter, bei den basischen Aminosäuren Histidin und Arginin gar ein hochsignifikanter Einfluß der salzsauren Hydrolyse auf die Racemisierung eingetreten ist. Die sich abzeichnende Tendenz, daß in den oxidierten Proben (vergleiche Werte in Sp(2a) mit denen in Sp(3a) generell der Gehalt der Aminosäuren etwas niedriger ist als in den enzymatisch unbehandelten Proben, deutet darauf hin, daß sich aufgrund der bei der Enzymbehandlung zusätzlich erforderlichen Arbeitsschritte (Pipettieren, Zentrifugieren) geringe Substanzverluste nicht vermeiden lassen. Dieser Sachverhalt kann allerdings nicht für die signifikanten Unterschiede verantwortlich sein.

Ganz anders stellt sich der Einfluß der Hydrolyse auf die Racemisierung der proteinogenen L-Aminosäuren dar, wenn in Gegenwart des Bodens hydrolysiert wurde (siehe Tabelle 5). Hier konnte bei keiner der 15 getesteten Aminosäuren ein signifikanter Racemisierungseffekt registriert werden. Allgemein fällt allerdings auf, daß die Streuungen im Vergleich zur Tabelle 4 einen größeren Bereich umfassen. Dieser Umstand ist sicherlich teilweise auf die Tatsache zurückzuführen, daß in jedem Wert der Aminosäuregehalt einer entsprechenden Menge von 1 mg hydrolysiertem Boden mit eingeht, die naturgemäß aufgrund einer gewissen Inhomogenität des Probenmaterials nicht ganz beseitigt werden kann.

Mithin bleibt festzustellen, daß eine Racemisierung - in diesem speziellen Fall eine Racemisierung der im Casein gebundenen L-Aminosäuren in die nichtproteinogenen D-Aminosäuren - bei der salzsauren Hydrolyse in Gegenwart von Boden nicht eingetreten ist.

Tabelle 4:Einfluß der sauren Hydrolyse (6 NHCl, 12 Stunden) ohne Zugabe einer Bodenprobe auf die Racemisierung der im Casein vorhandenen proteinogenen L-Aminosäuren. (Angaben entsprechen n Mole Aminosäure in 0.110 mg Casein; Werte in Sp. (2a) Mittelwert aus 6-facher, Werte in Sp. (3a) Mittelwert aus 4-facher Wiederholung).

Amino- säuren	(n Mol) hydrolysiert Enzym oxi- diert	Streuung (s) (n Mol)	(n Mol) hydrolysiert nicht oxi- diert	Streuung (s) (n Mol)	Signifi- kanz-* grenzen nach dem t-Test
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)	(4)
Asp	46.7	1.97	46.9	1.21	-
Thr	32.1	2.78	34.1	2.35	- 1 1
Ser	53.9	1.67	54.9	3.65	-
Glu	126.4	10.00	131.4	10.20	-
Pro	115.8	1.83	126.5	2.82	+
Ala	30.8	2.72	32.1	1.82	-
Val	42.1	2.96	41.9	2.00	- " "
Met	15.6	1.00	15.1	1.29	- 1
Ile	29.1	2.00	29.9	1.52	- '
Leu	62.3	3.19	65.6	1.29	
Tyr	25.5	1.48	27.3	1.41	-
Phe	24.7	1.37	25.0	3.10	
Lys	48.8	4.24	46.3	2.70	- 1
His	15.5	1.32	17.2	0.81	++
Arg	16.4	0.31	19.1	0.60	++

*	Signifikanzgrenzen:	-	=	nicht signifikant	
		+	=	signifikant (GD = 5%)	
	+	+	=	hoch signifikant (GD = 1	%)

Tabelle 5: Einfluß der sauren Hydrolyse (6 N HCl, 12 Stunden) in Gegenwart einer Bodenprobe auf die Racemisierung der im Casein vorhandenen proteinogenen L-Aminosäuren (Angaben entsprechen n Mole Aminosäure in 0.112 mg Casein und in 1 mg Boden; Werte in Spalten (2a) und und (3a) jeweils Mittelwert aus fünffacher Wiederholung).

Amino- säuren	hydrolysiert Enzym oxi- diert (n Mol)	Streuung (s) (n Mol)	hydrolysiert nicht oxi- diert (n Mol)	Streuung (s) (n Mol)	Signifikan a grenzen nach dem t-Test *
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)	(4)
Asp	46.2	4.06	48.7	7.53	-
Thr	40.9	5.59	40.8	6.48	-
Ser	58.0	5.26	61.4	5.40	-
Glu	138.2	11.14	137.1	13.12	-
Pro	145.9	13.51	150.8	22.00	
Ala	33.9	3.27	35.5	3.46	-
Val	53.6	4.21	52.2	3.90	-
Met	14.8	0.89	13.3	1.58	-
Ile	46.1	3.64	44.2	3.04	-
Leu	77.7	6.10	80.4	9.23	-
Tyr	28.2	3.35	26.7	1.80	-
Phe	31.1	2.73	31.2	2.44	-
Lys	57.3	3.84	60.4	3.10	-
His	18.7	2.78	20.2	1.93	-
Arg	24.7	7.41	24.7	2.00	-

* Signifikanzgrenzen: - = nicht signifikant

+ = signifikant (GD = 5%)

++ = hoch signifikant (GD = 1 %)

Dieser Sachverhalt muß besonders hervorgehoben werden, weil wir bei der Durchmusterung verschiedener Böden auf den Gehalt an unnatürlich konfigurierten D-Aminosäuren a priori davon auszugehen haben, daß der überwiegende Anteil der Aminosäuren im Boden in Peptiden und Proteinen gebunden vorliegt, die aus natürlichen L-Aminosäuren aufgebaut sind.

Im folgenden Abschnitt soll nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit die unnatürlich konfigurierten D-Aminosäuren unter vorgebenen Versuchsbedingungen einer Racemisierung unterliegen.

3.2.2 Zur Racemisierung von momomer sowie in Peptid-Bindung verknüpft vorliegenden D-Aminosäuren während der salzsauren Hydrolyse in Gegenwart von Bodenmaterial

Um den Einfluß der Hydrolyse-Bedingungen - wie er bei der Hydrolyse einer Bodenprobe wirksam wird - im Modellexperiment überprüfen zu können, sind einige D-Aminosäuren den Hydrolyseansätzen in Gegenwart von Boden als Monomere, als N-Acetyl-Derivate, als Peptide oder Polypeptide zugesetzt worden. Einzelheiten dazu sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Spalten (2a) und (3) der Tabelle 6 geben den Gehalt der betreffenden Aminosäure in n Mol an, wie er vor (Spalte (2a)) bzw. nach der Enzym-Oxidation (Spalte (3)) in einem Aliquot des Hydrolysates bestimmt wurde. Bei der Berechnung des Racemisierungseffektes in Spalte (5) (in diesem Falle die Racemisierung von D- zu L-Aminosäure), wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß der Gehalt an Aminosäure, der nach der Oxidation im Hydrolysat verbleibt, als L-Aminosäure vorliegt. Der geringe Gehalt an bodenbürtiger Aminosäure blieb bei dieser Berechnung unberücksichtigt. Aus der Spalte (5) der Tabelle 6 wird ersichtlich, daß der Racemisierungseffekt bei den Monomeren und bei den in Peptidbindung verknüpften D-Aminosäuren zwischen 0.4 und 2.6 % liegt. Lediglich die N-Acetylderivate des D-Leucins und des D-Valins sind zwischen 11 - 12 % racemisiert worden. Das Verhältnis zugegebene D-Aminosäure zu bodenbürtiger AminoTabelle 6: Einfluß der sauren Hydrolyse (6 N HCl, 12 Stunden) in Gegenwart von Boden auf die Racemisierung der im Hydrolyse-Ansatz als Monomere, als N-Acetyl-Derivat oder als in Peptiden verknüpft vorliegende D-Aminosäure. (Versuchsbedingungen: Pro Ansatz wurden ca. 20 - 30 mg der betreffenden Amino-Verbindung plus 1 g Boden hydrolysiert. Angaben entsprechen n Mole Aminosäure in einem Aliquot der Vorlage, in der zusätzlich jeweils die Menge an Nanomolen der betreffenden Aminosäure enthalten sind, die aus 1 mg des gegenwärtigen Bodens freigesetzt wurden; Werte in Sp. (2a) und (3) jeweils Mittelwerte aus 4 bis 5-facher Wiederholung).

Amino- Verbindung	hydrolysie: oxidiert i: einer Äqui von 1 mg B (n Mol)	rt, nicht n Gegenwart valentmenge oden Streuung (n Mol)	hydroly- siert, Enzym oxidiert n Mol	1 mg Boden hydroly- siert nicht oxi- diert	Racemisie- rungseffekt in % von (3) zu (2a) (2a)=100 (%)
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3)	(4)	(5)
Monomere:					
D-Leu	109.1	2.5	2.3	1.1	2.1
D-Ala	189.0	10.9	4.9	1.9	2.6
D-Met	50.3	3.0	-	-	-
D-Phe	59.9	3.4	0.5	0.5	0.8
D-Arg	50.9	4.4	0.6	0.6	1.2
D-Orn	66.7	6.8	Sp.	· -	
N-Acetyl-D-V	Val 60.2	2.0	7.5	1.0	12.5
N-Acetyl-D-1	Leu 46.6	2.3	5.1	1.1	10.9
Poly-D-Ala (MG=ca.42000	0) 106.2	10.6	3.1	1.9	2.9
Poly-D-Tyr (MG=ca.44000	0) 52.1	4.4	0.2	0.2	0.4
Gramicidin:					
Ala	53.5	9.9	31.2		
Leu	125.8	8.8	6.1		
Val	77.3	6.0	24.5		
(Gly)	29.0	3.2	32.1		

säure von ca. 50 - 180 : 1 im Hydrolyse-Ansatz wurde aus versuchstechnischen Gründen gewählt. Eine <u>engere</u> Relation hätte einen möglichen stärkeren Racemisierungseffekt vortäuschen können. Eine <u>weitere</u> Relation war aus Kostengründen (Einsatz größerer Enzym-Mengen) und weil sie nicht den Hydrolysebedingungen entsprochen hätte, wie sie bei der Durchmusterung verschiedener Böden angewendet werden sollten, abzulehnen.

Die angegebenen Werte in Spalte (4) der Tabelle 6 sind Mittelwerte aus Analysen, die an 10 bzw. 20 mg hydrolysiertem Boden durchgeführt und mit einem entsprechenden Divisionsfaktor berechnet wurden.

Die Einbeziehung des Gramicidins in diese Untersuchungen war insofern von Interesse, als es sich um ein niedermolekulares Pentapeptid handelt. Da vom Hersteller leider nicht zu erfahren war, welche Aminosäuren dieses Peptid aufbauen und in welcher optischen Reinheit sie vorliegen, können nur die eigenen Ergebnisse mitgeteilt werden. Demnach war dieses Peptid aus nur vier Aminosäuren, nämlich: Glycin, Alanin, Leucin und Valin aufgebaut. Allerdings wurden in dem Hydrolyseansatz auch beträchtliche Mengen von jeweils etwa 120 - 130 n Mol Ammoniak registriert, so daß nicht auszuschließen ist, daß bei der salzsauren Hydrolyse evtl. eine Aminosäure (möglicherweise Ornithin ?) zerstört wurde. Aufgrund der durchgeführten Oxidationsversuche (siehe Tabelle 6 Spalten (2a) und (3)) kann geschlossen werden, daß die Aminosäuren Alanin und Valin in dem Peptid nicht in optisch reiner Form einer Stereoisomeren vorgelegen haben. Lediglich das Leucin liegt als D-Leucin in peptidogener Bindung im Gramicidin vor.

Immerhin kann daraus gefolgert werden, daß D-Aminosäuren, wenn sie in einer Peptid-Bindung in Antibiotika oder Bakterienzellwänden gebunden vorliegen, bei der salzsauren Hydrolyse keiner stärkeren Racemisierung unterliegen als die anderen D-Aminosäuren, die als Monomere unter Versuchsbedingungen in dieser Hinsicht getestet wurden.

- 31 -

4. Ergebnisse

Wenn nicht anders erwähnt, stammen alle im folgenden mitgeteilten Ergebnisse aus Versuchen mit zweifacher Wiederholung und repräsentieren die errechneten Mittelwerte.

Ferner sind in den Tabellen nur die proteinogenen Aminosäuren, die ein Chiralitätszentrum am <-C-Atom besitzen, aufgeführt. Zahlreiche Aminosäuren und Aminozucker wie z.B. Glycin, Cysteinsäure, y-Aminobuttersäure, Ornithin, Glukosamin, Galaktosamin sowie andere unbekannte ninhydrinpositive Verbindungen sind in den Tabellen der Übersicht halber nicht erwähnt, weil sie teils relativ unspezifische Substrate für das Enzym D-Aminosäure-Oxidase darstellen oder in nur geringen Mengen vorhanden waren.

4.1 <u>D-Aminosäuren in Ah-Horizonten einer Rendsina und</u> drei Sauer-Braunerden des Göttinger Waldes

Für diese Untersuchungen wurden einige Ah-Horizonte von Rendsinen und Sauer-Braunerden des Göttinger Waldes ausgewählt, weil diese sich durch eine stark divergierende Humusdynamik an eng benachbarten Standorten auszeichnen (SCHONLAU, 1969).

Einige Charakteristika der betreffenden Ah-Horizonte sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

In der Tabelle 8 sind die Menge der hydrolysierbaren Aminosäuren und der prozentuale Anteil der D-Aminosäuren in den Ah-Horizonten der Rendsina und der drei Sauer-Braunerden des Göttinger Waldes angegeben.
Bodentyp	Vegetation	Miner al- körper	Tiefe (cm)	pH in KCL	C %	Gesamt-N %	C:N
Spalte (1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Rendsina	Buche 25-jährig	lehmiger Kalkstein	0-25	6,0	5,43	0,40	13,5
Sauer-Braunerde II	Fichte 70-jährig	LÖß	0-15	2,9	4,43	0,24	18,4
Sauer-Braunerde III	Wiese Festuca sp.	Löß	0-12	5,6	2,39	0,22	10,8
Sauer-Braunerde IV	Wiese Dactylis gl.	Löß	0-15	4,8	1,73	0,19	9,1

Tabelle 7: Kenndaten der untersuchten Ah-Horizonte des Göttinger Waldes

ω Т

Tabelle 8: Hydrolysierbare Aminosäuren in den Ah-Horizonten verschiedener Böden des Göttinger Waldes und der prozentuale Anteil der nichtproteinogenen D-Aminosäuren. (Angaben in Nanomol pro 10 mg Boden; D-Aminosäuren in % von der im nichtoxidierten Ansatz jeweils vorhandenen DL-Aminosäure)

	Rendsi	na	Sauer-Bran	unerde II	Sauer-Bra	aunerde III	Sauer-Br	aunerde IV
Aminosäuren	nMol DL-As	D-As in % der DL-As	nMol DL-As	D-As in % der DL-As	nMol DL-As	D-As in % der DL-As	nMol DL-As	D-As in % der DL-As
Asparaginsäure Threonin Serin Glutaminsäure Prolin Alanin Valin Methionin Isoleucin Leucin Tyrosin Phenylalanin Lysin Histidin Arginin	155 81 67 102 61 109 49 30 53 9 24 51 23 31	12,5 - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	95 66 58 97 50 132 52 8 16 34 58 15 8	6,2 17,2 26,2 0,6 10,7 2,0 (93,5)? 15,5 11,2 18,1 - 13,5	81 47 43 59 40 32 80 36 56 516 314 17	6,8 - 15,5 10,2 - 10,7 - - - - -	79 44 57 45 38 19 31 5 37 11 6	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -

As = Aminosäure;

DL-As = Aminosäure-Racemat

- 34 -

Aus den Daten der Tab. 8 läßt sich ersehen, daß zum Teil beachtliche Prozentanteile mancher der durch saure Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren im Boden als D-Aminosäuren vorliegen. Zwischen den vier untersuchten Ah-Horizonten sind – wenn man zunächst einmal nur die Anzahl der identifizierten D-Aminosäuren berücksichtigt – recht deutliche Unterschiede festzustellen. In der Sauer-Braunerde III sind vier, in der Rendsina und der Sauer-Braunerde IV jeweils sieben und in der Sauer-Braunerde II sogar elf D-Aminosäuren nachgewiesen worden. Die höchsten Anteile von D-Aminosäuren in den Racematen sind ebenfalls bei der Sauer-Braunerde II zu verzeichnen.

Wenn man die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen D-As in den vier Böden vergleicht, dann fällt auf, daß nur das D-Prolin und das D-Leucin in allen, das D-Threonin aber in keinem der Böden gefunden wurde.

4.2 <u>D-Aminosäuren in den Ap-Horizonten unter Ackernutzung</u> stehender Sandböden

Um das Untersuchungsmaterial hinsichtlich seiner Nutzung, Entstehung und des Bodentyps zu erweitern, sind ferner drei als Acker bzw. Garten genutzte Sandböden in diese Untersuchung mit einbezogen worden. Die Proben entstammen ausschließlich den Ap- bzw. Ah-Horizonten der betreffenden Böden. Die Bodenproben wurden im Oktober 1972 nach dem Abernten der Hauptfrucht entnommen. Weitere Kenndaten sind in der Tab. 9 angegeben.

Die hydrolysierbaren Aminosäuren und der prozentuale Anteil der D-Aminosäuren in den DL-As sind in der Tab.10 aufgeführt.

		1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1					
Bodentyp	Vegetation, Nutzung	Mineralkör- per, Horizo n t	Tiefe (cm)	(^{pH} (KCl)	(^で 素)	(^N t)	C : N
Spalte(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Podsol I (Dohren)	Silomais, Acker	hS, Ap	0-30	4,7	2,84	0,125	22,7
Podsol II (Dohren)	Winterroggen, Kleegras, Acker	hS, Ap	0-30	4,3	1,74	0,10	17,4
Podsol III (Dohren)	Picea pungens Picea abies, Lupinus poly- phyllus, Ziergarten	, hS, Ah	0-25	3,5	1,92	0,136	14,1

Tabelle 9: Allgemeine Kenndaten der untersuchten Böden

Tabelle 10: Hydrolysierbare Aminosäuren in den Ap-Horizonten unter Ackernutzung stehender Sandböden und der prozentuale Anteil der D-Aminosäuren (Angaben in Nanomol pro 50 mg Boden bzw. D-As in % der im nicht oxidierten Ansatz jeweils vorhandenen DL-Aminosäure)

Aminosäuren	Dohren I n Mol DL-As	D -As in % der DL-As	Dohren II n Mol DL-As	D-As in % der DL-As	D ohren III n Mol DL - As	D -As in % der DL - As
Asparaginsäure Threonin Serin Glutaminsäure Prolin Alanin Valin Methionin Isoleucin Leucin Tyrosin Phenylalanin Lysin Histidin Arginin	37 62 70 40 56 82 51 5 2 51 10 24 33 27	7,4 3,3 6,8 1,8 12,0 1,5 40,6 n.b. 25,7	27 82 94 24 85 116 76 24 32 63 12 33 44 21 33	2,7 17,5 - 21,4 21,5 14,5 14,5 14,5 14,5 14,3 17,8 8,5 21,2	96 125 177 100 148 203 143 46 71 118 27 57 85 67 63,2	4,3 19,0 12,2 6,8 - 13,0 - - - - 7,6 -

As = Aminosäure; Sp. = Spuren; n.b. = nicht bestimmbar

DL-As = Aminosäure-Racemat

Bedingt durch den niedrigeren Gesamt-N-Gehalt der Sandböden im Vergleich zu den Ah-Horizonten des Göttinger Waldes (Vergleiche die entsprechenden Angaben in den Tabellen 9 und 7) fällt die absolute Menge an Aminosäuren pro Gewichtseinheit Boden geringer aus. Aus diesem Grunde sind die Mengenangaben der insgesamt hydrolysierten Aminosäuren als Nanomole pro 50 mg Boden angegeben.

In den Böden Dohren I und Dohren II ist die Zahl und auch der prozentuale Anteil der identifizierten D-Aminosäuren recht niedrig. Lediglich bei Dohren I sind unter den basischen Aminosäuren das Lysin zu 40 % und das Arginin zu 25 % als D-Isomere vorhanden. In dem Ap-Horizont von Dohren II sind außer bei der Glutaminsäure, dem Prolin und dem Histidin bei allen anderen proteinogenen Aminosäuren zwischen 2 und 20 % der jeweils insgesamt vorhandenen Aminosäure als die korrespondierende D-Isomere bestimmt worden.

4.3 D-Aminosäuren in verschiedenen Regenwurmlosungen

Da u.a. zu erwarten ist, daß die organische Substanz, insbesondere aber größere Anteile der Mikroflora und-fauna des Bodens während der Passage durch den Darmtrakt des Regenwurmes teils aufgeschlossen und mineralisiert und teilweise auch der heterozyklisch gebundene N aufgeschlossen wird (O. GRAFF, FAL Braunschweig, mündl. Mitteilung), sind ferner einige Regenwurmlosungen auf ihren Gehalt an D-Aminosäuren untersucht werden. Außerdem wollte man gleichzeitig der Frage nachgehen, ob möglicherweise das D-Serin, das bereits in größeren Mengen in freier Form in Regenwürmern gefunden worden war (ROSENBERG und ENNOR, 1964)auch in der Losung der Regenwürmer anzutreffen ist.

Einige allgemeine Kenndaten der Regenwurmlosungen sind in der Tabelle 11 angegeben.

Bezeichnung, Bodentyp	Nutzung des Bodens, Regenwurmspecies	Mineralkör- per des Bodens	pH (KCl)	(*)	(^N 表)	C : N
Spalte (1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Losung I * (Griserde)	Mischwald, Lumbricus sp., Allolobophora sp.	Löß, Ah + Bt	8,1	2,11	0,174	12,1
Losung II ** (Parabraunerde)	Allolobophora rosea jüngere Tiere Modellversuch	LÖß	n.b	1,12	0,114	9,8
Losung III ** (Parabraunerde)	Allolobophora rosea ältere Tiere Modellversuch	LÖß	n.b	0,99	0,095	10,4
Parabraunerde ** (Kontrollboden)	Kein Regenwurm, ungedüngt, unbe- wachsen	Löß	n.b	1.62	0,176	9,2

* Von Dr. B.MEYER, Göttingen dankenswerterweise überlassen

** Von Dr. O. GRAFF, FAL Braunschweig, freundlicherweise zur Verfügung gestellt
 n.b. = nicht bestimmt

- 39

1

Die in der untersten Zeile der Tab. 11 angeführte Parabraunerde stellt den entsprechenden Kontrollboden zu den beiden Wurmlosungen II und III dar. Die beiden Losungen II und III unterscheiden sich vom Kontrollboden nur dadurch, daß sie den Darmtrakt des Regenwurms Allolobophora rosea passiert haben. Dies ist auch aus der Abnahme der N_t - und C_t -Werte in der Tab. 11 (Sp. 5 und 6) zu ersehen, die im Vergleich zum Kontrollboden etwa in gleichem Umfange abgenommen haben, so daß sich das C/N-Verhältnis nicht wesentlich verändert hat (Sp. 7, Tab. 11). Die Regenwurmlosung I entstammt einer Griserde, die sich aus einer Schwarzerde unter Wald im Hildesheimer Raum entwickelt hat.

In der Tab. 12 sind die entsprechenden Angaben zum Aminosäuregehalt und zum Anteil der D-Aminosäuren enthalten. Die Werte für Asparaginsäure und Glutaminsäure im Kontrollboden und in den beiden Wurmlosungen II und III sind nicht repräsentativ. Die Hydrolysate dieser Proben wurden nach Beendigung der Hydrolyse mit 1N Li OH auf pH 5,7-5,9 eingestellt, um niedermolekulare leicht braun gefärbte Huminsäurevorstufen zu fällen und aus dem Hydrolysat zu entfernen. Diese Reinigungs-Maßnahme war erforderlich geworden, weil sich herausgestellt hatte, daß andernfalls die Aktivität des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase teilweise empfindlich beeinflußt wurde. Während dieses Fällungsvorganges werden Glutaminsäure und Asparaginsäure zu erheblichen Anteilen ebenfalls gefällt (ALDAG, unveröffentlicht).

Der Gehalt an D-Aminosäuren ist in allen untersuchten Regenwurmlosungen und auch im Kontrollboden (siehe Tab. 12) bei den sauren und neutralen Aminosäuren mit Ausnahme des D-Alanins und des D-Phenylalanins als gering zu betrachten. Es liegen keine Hinweise dafür vor, daß z.B. D-Serin verstärkt in den Losungen der Regenwürmer auftritt. Für den Bereich der basischen Aminosäuren sind bis auf eine Ausnahme bei der Losung II (Histidin) in allen Losungen und im Kontrollboden zwischen 8 und 30 % der insgesamt erfaßten Aminosäure als D-Aminosäure identifiziert worden.

Beim Vergleich der absoluten Aminosäure-Gehalte im Kontrollboden und in den beiden Regenwurmlosungen II und III wird deutlich, daß aufgrund des "Wurmfraßes" mit der Abnahme des N_t-Gehaltes (siehe Tab. 11) offenbar in gleichem Umfange auch der Gehalt des Aminosäure-N abnimmt. Lediglich das Lysin und das Phenylalanin verhalten sich in dieser Hinsicht nicht ganz so konform.

Tabelle 12: Hydrolysierbare Aminosäuren in verschiedenen Regenwurmlosungen und prozentualer Anteil der D-Aminosäuren (Angaben in Nanomol As pro 50 mg Boden, bzw. D-As in % von DL-As)

	Losung	I	Losung	g II	Losung	III	Kontro zu Los	ollboden sung II u.III
Aminosäuren	nMol DL-As	D-As in % von DL-As	nMol DL-As	D-As in % von DL-As	nMol DL-As	D-As in % von DL-As	nMol DL-As	D-As in % von DL-As
Asparaginsäure Threonin Serin Glutaminsäure Prolin Alanin Valin Methionin Isoleucin Leucin Tyrosin Phenylalanin Lysin Histidin Arginin	45 41 54 59 50 73 8 21 39 6 23 31 20	12,7 9,8 5,5 17,6 12,7 12,5 - 7,1 17,3 25,9 12,0 23,6	(6)* 64 74 (46)* 98 98 82 28 31 54 82 28 31 54 44 44 31	7,4 - 18,9 - 3,9 2,7 13,2 15,3 19,9	(2)* 53 69 (14)* 77 83 52 - 24 41 6 32 20 39 25	- 10,4 18,0 20,4 - 5,0 42,3 23,7 8,7 8,3	(20)* 106 118 (28)* 131 171 151 - 52 79 15 37 24 71 48	- - - - - 21,2 31,1 25,5 12,4

* Aufgrund eines besonderen Reinigungsverfahrens sind die Werte für Asparaginsäure und Glutaminsäure nicht repräsentativ und sind sehr stark reduziert. - 41 -

4.4 <u>D-Aminosäuren im Ah-Horizont einer Rendsina an zwei Stand-</u> orten des Göttinger Waldes

Da in zahlreichen Vorversuchen wiederholt festgestellt worden war. daß Böden mit einem besonders hohen Humusgehalt an Standorten mit starker Biomixion wie Rendsinen und Feuchtschwarzerden bei der Oxidation entsprechend vorbereiteter Boden-Hydrolysate die Aktivität des Enzyms stark hemmten, indem bereits nach der Zugabe der D-Aminosäure-Oxidase ein grau-brauner Niederschlag ausfiel, sollte diese Frage an dem oben bezeichneten Bodenmaterial besonders überprüft werden. Es ist bekannt, daß sowohl höhere wie niedere Pilze durch Ausscheidung von Phenoloxidasen bzw. auch während der Autolyse von Pilzmycelien am Auf- und Abbau der organischen Substanz des Bodens entscheidenden Anteil nehmen. Im November 1975 wurde im Klosterforst Weende (Göttinger Wald, Plateau-Ebene) ein besonders imposant ausgeprägter Hexenring von Clitocybe nebularis gefunden. An diesem Standort wurden innerhalb des Hexenringes (I; also dort, wo das Pilzmycel den Boden bereits durchwandert hatte), unmittelbar unter dem Hexenring (M; zur Probenahmezeit mit Pilzmycel stark durchsetzt) und außerhalb des Hexenringes.(A) Bodenproben entnommen und auf verschiedene organische und anorganische N-Fraktionen untersucht, auf deren Ergebnisse hier nicht eingegangen werden soll. (ALDAG. 1977). Die Bodenproben mit der Bezeichnung (I) (innerhalb des Hexenringes) und mit der Bezeichnung (M) (unmittelbar unter dem Pilgmycel-Ring) wurden auf ihren Gehalt an D-Aminosäuren untersucht. In Vorversuchen ergab sich, daß die nach herkömmlicher Art vorbereiteten Bodenhydrolysate zur Oxidation aufgrund des großen Anteils niedermolekularer Huminsäurevorstufen sich als ungeeignet erwiesen. Deshalb wurden die Hydrolysate vor dem Abdampfen der überschüssigen Salzsäure mit verdünnter Na OH auf pH 7.5 - 8.0 eingestellt, wobei der ausfallende Niederschlag durch Zentrifugieren und Filtrieren abgetrennt und verworfen wurde. Das gereinigte und neutralisierte Hydrolysat war nunmehr besser für die vorgesehenen Oxidationsversuche geeignet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 13 und 14 zusammengestellt.

Tabelle 13: Hydrolysierbare Aminosäuren in dem Ah-Horizont einer Rendsina, Standort Klosterforst Weende (Göttinger Wald), Mitte, Boden stark mit Pilzmycel durchsetzt. (Angaben in Nanomol Aminosäure pro 4 mg Boden, Werte in Spalten (2a) und (3a) jeweils Mittelwerte aus 5-facher Wiederholung)

Aminosäuren	hydrolysi nicht oxi Mittelwert (n Mol)	ert diert Streuung(s) (n Mol)	hydrolys: Enzym ox: Mittelwert (n Mol)	iert idiert Streuung(s) (n Mol)	Signifi _x kanzen zwischen (2a) und (3a)
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)	(4)
Asp	28,1	0.6	31.7	1.9	(++)
Thr	32.0	1.3	36.9	1.3	(++)
Ser	43.2	3.1	37.8	2.8	+
Glu	38.6	0.3	40.8	2.8	-
Pro	29.2	2.7	32.0	3.0	-
Ala	71.2	5.5	50.1	2.5	++
Val	26.5	1.3	30.6	2.8	(++)
Ile	11.5	0.9	14.0	0.7	(++)
Leu	26.9	1.1	30.3	1.7	(++)
Tyr	4.1	0.4	7.3	1.1	(++)
Phe	13.3	0.5	15.5	1.4	(++)
Lys	28.1	0.6	31.4	3.1	(+)
His	6.2	0.3	6.9	0.6	(+)
Arg	10.9	0.5	11.0	0.8	-
NH4	228.0	5.9	408.0	35.3	++
٤D-AS			26.5		
Z AS	369.8		376.3		

Signifikanzgrenzen: - = nicht signifikant

+ = signifikant bei GD = 5 %

++ = hoch signifikant bei GD = 1 %

* In den Fällen, wo in dem oxidierten Ansatz größere Mengen an Aminosäuren gefunden wurden als in dem nicht oxidierten Ansatz, sind die markierten Signifikanzen eingeklammert.

Tabelle 14: Hydrolysierbare Aminosäuren in dem Ah-Horizont einer Rendsina (innerhalb des Hexenringes) Standort Klosterforst Weende, Göttinger Wald. (Angaben in Nanomol Aminosäure pro 4 mg Boden, Werte in Spalten (2a) und (3a) jeweils Mittelwerte aus 5-facher Wiederholung)

Aminosäuren	hydrolys nicht ox Mittelwert (n Mol)	iert idiert Streuung(s) (n Mol)	hydrolysi Enzym Mittelwert (n Mol)	ert oxidiert Streuung(s) (n Mol)	Signifi- kanzen zwischen (2a) und (3a)
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)	(4)
Asp	18.2	1.1	18.6	4.5	-
Thr	24.2	1.4	26.8	2.9	-
Ser	31.0	2.6	27.2	2.5	+
Glu	29.8	1.1	27.2	2.1	++
Pro	21.0	1.8	21.0	3.0	-
Ala	53.4	4.1	39.6	7.8	++
Val	20.5	0.9	23.8	2.1	(++)
Ile	8.9	1.5	10.4	1.5	-
Leu	20.2	0.6	23.1	1.6	(++)
Tyr	3.0	0.5	5.8	0.3	(++)
Phe	9.8	0.5	12.4	1.8	(++)
Lys	22.7	1.3	24.3	1.0	-
His	4.0	0.4	5.5	0.3	(++)
Arg	8.6	0.4	8.0	0.6	+
NH4	142.4	4.4	318.8	13.6	
€D-AS			20.8		
Z AS	275.3	-	273.7		

Signifikanzen und Erläuterungen wie in Tabelle 13.

Aus der Tabelle 13 ist zu entnehmen, daß nur beim Serin und beim Alanin statistisch gesicherte Mengen an D-Aminosäure nachgewiesen werden konnten. Weiterhin fällt auf, daß der Gehalt an Aminosäure pro Oxidations-Ansatz bei fast allen anderen Aminosäuren (ausgenommen Glutaminsäure, Prolin und Arginin) höher ist als in dem äquivalenten nicht oxidierten Ansatz. Diese Unterschiede sind alle bei Grenzdifferenzen von 5 % und darunter statistisch abgesichert.

Die entsprechenden Analysenbefunde an dem Habitat "innerhalb des Hexenringes" (siehe Tabelle 14)

weisen im Vergleich dazu ein etwas differenzierteres Gesamtbild auf. Neben D-Serin und D-Alanin konnten noch zusätzlich D-Glutaminsäure und D-Arginin mit signifikanter bis hoch signifikanter Sicherheit nachgewiesen werden. Bei den Aminosäuren Valin, Léucin, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin war der Gehalt der Aminosäure in dem oxidierten Ansatz wiederum statistisch gesichert größer als in dem nicht oxidierten Ansatz.

4.5 <u>D-Aminosäuren im Ahe-Horizont einer sauren Locker-</u> Braunerde

Das Bodenprofil der sauren Locker-Braunerde liegt in der wärmeklimatischen Höhenstufe "obere Hanglagen" des Nationalparks Bayerischer Wald in südlicher Hangrichtung des Lusen. Dieses Profil ist anläßlich der Tagung der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft in Regensburg 1975 auf der Exkursion B unter der Führung von W. ELLING, W. BAUBERGER, H. BECHER, B. WILKE und W. ZECH (1975) beschrieben worden. Weitere Einzelheiten sind dem Exkursionsführer der oben genannten Tagung zu entnehmen. Diese saure Locker-Braunerde, insbesondere deren Ah_{e1}-Horizont war von Interesse, weil der Kohlenstoffgehalt mit 14,5 % Ct sehr hoch liegt, die Durchwurzelung sehr stark ist und die Humusform aus einem relativ schwarzen Moder besteht, der lediglich von einigen gebleichten Quarzkörnern durchsetzt ist. Der N_t-Gehalt beträgt 0.97 %, die C/N-Relation = 15 , pH (KCl) = 3.5^{1})

- 45 -

Die Bodenproben dieses Profils wurden freundlicherweise von Herrn Dr. B. Wilke, Institut für Bodenkunde der TU München, Weihenstephan, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 15: Hydrolysierbare Aminosäuren in dem Ahe₁-Horizont der sauren Locker-Braunerde des Nationalparks Bayerischer Wald. (Angaben in Nanomol Aminosäure pro 2 mg Boden)

Aminosäuren	hydrolysier oxidiert Mittelwert (n Mol)	t,nicht Streuung(s) (n Mol)	hydrolysier Enzym Mittelwert (n Mol)	t, oxidiert Streuung(s) (n Mol)	Signifi- kanz- * Grenzen (2a) und (3a)
Spalte (1)	(2a)	(2b)	(3a)	(3b)	(4)
Asp	37.4	3.5	35.9	4.1	-
Thr	25.2	3.7	24.6	1.6	-
Ser	30.8	2.5	27.4	2.2	-
Glu	26.1	1.6	23.5	2.8	-
Pro	19.0	3.7	17.6	0.8	-
Ala	33.1	4.1	29.1	2.0	-
Val	18.7	1.4	18.2	1.5	-
Ile	12.6	2.1	14.8	1.2	-
Leu	17.9	1.9	20.4	4.1	-
Tyr	2.3	0.2	5.0	1.1	-
Phe	8.9	0.8	9.4	1.4	-
Lys	17.8	1.9	17.7	1.0	-
His	6.8	0.7	6.6	0.8	-
Arg	8.2	1.2	7.1	0.9	-

Signifikanzgrenzen: - = nicht signifikant + = signifikant bei GD = 5 %

* Angaben in Spalte (2a) Mittelwert aus sieben, in Spalte (3a) aus vier Wiederholungen.

In der Tabelle 15 sind die Gehalte der hydrolysierbaren Aminosäuren in dem Ah_{e1}-Horizont dieser sauren Locker-Braunerde vor und nach der Oxidation mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase angegeben.

Aus der Tabelle 15 wird ersichtlich, daß in keinem Falle bei allen untersuchten Aminosäuren ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen dem oxidierten und dem nicht oxidierten Ansatz ermittelt werden konnte. Hervorzuheben ist, daß die Gehalte bei den Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin im oxidierten Ansatz geringfügig höher sind als in dem nicht oxidierten Ansatz.

5. Diskussion

5.1 <u>Zur Methode der enzymatisch-chromatographischen Bestimmung</u> von D-Aminosäuren in Bodenhydrolysaten

Die in der Tabelle 3, S. 20 ermittelten Relativzahlen zur Effektivität des Enzyms D-Aminosäure-Oxidase zeigen, daß das Enzym unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen gegenüber den meisten der dort getesteten D-Aminosäuren eine sehr gute Effektivität besitzt. Das D-Lysin und das D-Histidin wurden zu 94 % bzw. 90 % oxidiert, während die D-Asparaginsäure zu 55 % und die D-Glutaminsäure nur zu 19 % oxidativ desaminiert wurden.

Bei allen im Abschnitt 4 mitgeteilten Ergebnissen sind diese von 100 % abweichenden Effektivitäten bei der Berechnung des prozentualen Anteils der betreffenden D-Aminosäuren durch Einsetzen eines entsprechenden Faktors nicht berücksichtigt worden. Insofern sind die mitgeteilten Ergebnisse insbesondere bei den beiden sauren D-Aminosäuren D-Glutaminsäure und D-Asparaginsäure eher niedriger als der Realität entsprechend ausgefallen. In diesem Stadium der Untersuchungen schien das Weglassen entsprechender Korrekturfaktoren aber gerechtfertigt, als für solche detaillierten Berechnungen zahlreichere Wiederholungen an dem gleichen Boden erforderlich wären.

Im übrigen stimmen die hier ermittelten Effektivitäten des Enzyms recht gut mit den Befunden von LARSON et al., (1971) überein. Allerdings besitzt dieses Verfahren im Vergleich zu der von LARSON et al. (1971) ausgearbeiteten Methode einen weiteren Vorteil, der darin zu sehen ist, daß durch Hinzufügen eines internen Standards in Form einer C^{14} -D-Aminosäure (in diesen Untersuchungen C^{14} -D-Valin) in jedem Inkubationsgefäß die Effektivität des Enzyms zusätzlich sehr genau überprüft werden kann.

Ferner ist darauf hinzuweisen, daß die Werte der berechneten D-Aminosäuren, die hinsichtlich des prozentualen Anteils nur bis zu 5 % der im nicht oxidierten Ansatz vorhandenen DL-Aminosäure ausmachen, im Fehlerbereich der Methode liegen können.

5.2 <u>Zur Frage der Racemisierung von optisch aktiven Aminosäuren</u> während der salzsauren Hydrolyse in Gegenwart von Boden

Die Frage nach der Racemisierung von optisch aktiven Aminosäuren während der salzsauren Hydrolyse ist im Abschnitt 3.2 im Zusammenhang mit den dort mitgeteilten Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen bereits ausführlich diskutiert worden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die salzsaure Hydrolyse auch in Gegenwart von Bodenmaterial keinen Racemisierungseffekt auf die proteinogenen Aminosäuren der natürlichen L-Reihe ausübt.

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von POLLOCK und OYAMA (1966) überein, die im sauren Hydrolysat eines Bovin-Albumins mit Hilfe einer gas-chromatographischen Methode keinen nennenswerten Racemisierungseffekt feststellen konnten.

Der geringfügige Racemisierungseffekt, der bei der salzsauren Hydrolyse auf die dem Hydrolyseansatz in verhältnismäßig hoher Konzentration zugesetzten D-Aminosäuren registriert wurde, ist für den methodischen Nachweis des Vorkommens von D-Aminosäuren im Boden, wie er in dieser Arbeit geführt wurde, uninteressant, da hier bekanntlich nur die D-Aminosäuren im Hydrolysat erfaßt werden, die nach der Hydrolyse auch noch als solche vorliegen. Außerdem ist der größere Racemisierungseffekt beim N-Acetyl-D-Valin und beim N-Acetyl-D-Leucin (siehe Tabelle 6) möglicherweise auf gewisse Unreinheiten der Präparate zurückzuführen, da vom Hersteller keine Angaben über den Reinheitsgrad der D-Aminosäuren in den N-Acetyl-Derivaten und im Gramicidin zu erhalten waren.

5.3 <u>Zum Vorkommen von D-Aminosäuren in verschiedenen Böden</u> und Regenwurmlosungen (Abschnitte 4.1; 4.2; 4.3)

Da die in den Abschnitten 4.1; 4.2 und 4.3 mitgeteilten Ergebnisse nur aus Untersuchungen mit zweifacher Wiederholung resultieren, sollen diese gesondert erörtert werden.

Die Untersuchungen zum Gehalt an D-Aminosäuren in den verschiedenen Böden und Regenwurmlosungen (siehe Tabelle 8, 10 und 12) haben gezeigt, daß die einzelnen Böden und benachbarten Standorte sich sowohl nach der Anzahl wie auch nach dem Gehalt der einzelnen D-Aminosäuren charakteristisch unterscheiden. Leider liegen zu diesem Fragenkomplex in der Literatur bis heute keine weiteren Befunde vor, so daß über die mögliche ökologische Bedeutung der D-Aminosäuren zur Charakterisierung des Standortes sowie zur N-Metabolik des organisch gebundenen Stickstoffs im Boden kaum etwas ausgesagt werden kann. Das Ziel dieser ersten grundlegenden Untersuchungen war vielmehr darauf gerichtet, an verschiedenen Böden gewissermaßen eine Bestandsaufnahme zum Vorkommen von D-Aminosäuren zu erstellen.

Aus diesem Grunde sind in der Tabelle 16 die gefundenen D-Aminosäuren in den untersuchten 11 Substraten einmal nach der Häufigkeit des Vorkommens zusammengestellt worden. Dabei sind die Gehalte an D-Aminosäuren, die weniger als 5 % der insgesamt als Einzelkomponente bestimmten DL-Aminosäure ausmachen, unberücksichtigt geblieben.

Unterteilt man dann nach der Häufigkeit des Vorkommens in drei Gruppen, dann erscheinen in der Gruppe I (größte Häufigkeit) nur drei, in der Gruppe II sieben und in der Gruppe III fünf D-Aminosäuren. Interessanterweise ist in der Gruppe I mit dem D-Alanin eine D-Aminosäure vertreten, die auch maßgeblich als D-Isomere in den Zellwänden und Kapselsubstanzen von Bakterien vorkommt. Dieser Befund stimmt auch mit den Ergebnissen von WAGNER und MUTATKAR (1968) überein, die nachweisen konnten, daß am Ende eines sechs Monate dauernden Boden-Inkubationsversuches mit C¹⁴-Glukose die höchsten spezifischen C¹⁴-Aktivitäten in den durch Hydrolyse aus der organischen Substanz des Bodens freigesetzten Aminosäuren Alanin, Glycin, Glutaminsäure und Lysin vorhanden waren. WAGNER und MUERATKAR (1968) schließen daraus, daß offenbar das Zellwandmaterial von Bakterien, die Glukose abbauen können, einem langsameren Abbau unterworfen ist, als etwa zytoplasmatische Proteine. Leider ist die optische Aktivität der Aminosäuren von WAGNER und MUTATKAR nicht bestimmt worden, so daß über den Anteil der D-Aminosäuren in den spezifisch stark markierten Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin und Lysin nur Vermutungen angestellt werden können.

Aus den Ergebnissen in unseren Untersuchungen kann mit einiger Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß die D-Glutaminsäure ebenfalls in der Häufigkeitsgruppe I aufgetaucht wäre, wenn das Enzym D-Aminosäure-Oxidase eine höhere Substratspezifität zur D-Glutaminsäure entfaltet hätte.

Um einen Überblick darüber zu bekommen, in welcher Relation der in den D-Aminosäuren gebundene Stickstoff zum N_t bzw. zum Gesamt-Aminosäure-N des Bodens steht, ist in der Tabelle 17 nun der Anteil des D-Aminosäure-N in % des N_t (Sp. 4) bzw. in % des insgesamt im Boden vorhandenen Aminosäure-N der ein Chiralitätszentrum aufweisenden proteinogenen Aminosäuren (Sp. 5) aufgeführt.

Aus der Tabelle 17 ist zu entnehmen, daß der D-Aminosäure-N in den untersuchten Böden und Regenwurmlosungen etwa zwischen 1,5 und 4,2 % des N_t ausmacht. Hingegen liegt der Anteil des D-Aminosäure-N bezogen auf den DL-Aminosäure-N der proteinogenen Aminosäuren zwischen 3,7 % (Sauer-Braunerde III) und 13,6 % (Regenwurmlosung I).

Damit ist mit relativ großem methodischen Aufwand erstmals quantitativ nachgewiesen worden, daß der proteinogene Aminosäure-Stickstoff des Bodens zu etwa 5 - 13 % aus D-Aminosäure-N besteht. Um zu überprüfen, ob die besonders hohen Werte in der Spalte (5) der Tabelle 17 beim Podsol II und den beiden Regen-

Tabelle 16: Angaben zur Häufigkeit des Vorkommens der bestimmten D-Aminosäuren in 11 Böden. (D-Aminosäuren, die weniger als 5 % der betreffenden DL-Aminosäure ausmachten, sind in der Tab.16 nicht berücksichtigt).

D-Aminosäuren	Häufigkeit des	Grup	penzuordnu	ng *
	Vo r kommens	I	II	III
D-Asp	5		+	
D-Thr	5		+	
D-Ser	5		+	
D-Glu	4			+
D-Pro	9	+		
D-Ala	9	+		
D-Val	3			+
D-Met	3			+
D-Ile	4			+
D-Leu	8		+	
D-Tyr	4			+
D-Phe	6		+	
D-Lys	9	+		
D-His	5		+	
D-Arg	8		+	

* Anzahl der untersuchten Substrate:11
Gruppe I: Häufigkeit = 9-12
Gruppe II: Häufigkeit = 5- 8
Gruppe III: Häufigkeit = 0- 4

wurmlosungen I und II ein charakteristisches Merkmal der organischen Substanz dieser Böden ist, wären weitere Untersuchungen an isolierten Huminsäuren und Fulvosäuren dieser Substrate erforderlich.

Tabelle 17: Angaben zum N₁-Gehalt und zum DL-Aminosäure-N der ein Chiralitätszentrum besitzenden proteinogenen Aminosäuren sowie der Anteil des D-Aminosäure-N in % der beiden vorgenannten N-Fraktionen

^N t (%)	proteino-* gener DL- As-N in % des ^N t	D-As-N** in % des ^N t	D-As-N** in % des DL-As-N
(2)	(3)	(4)	(5)
0,40	36,5	2,3	6,4
0,24	45,3	4,2	9,2
0,22	41,0	1,5	3,7
0,19	45,6	3,7	8,1
0,125	16,3	1,6	9,5
0,10	26,6	3,6	13,4
0,136	39,8	2,0	5,0
0,174	11,1	1,5	13,6
0,114	20,9	2,4	11,3
0,095	23,5	1,7	7,1
, 0,176	21,6	2,1	9,9
	Nt (%) (2) 0,40 0,24 0,22 0,19 0,125 0,10 0,136 0,174 0,114 0,095	Nt proteino-* gener DL- As-N in % des Nt (%) Nt (2) (3) 0,40 36,5 0,24 45,3 0,22 41,0 0,19 45,6 0,125 16,3 0,10 26,6 0,174 11,1 0,114 20,9 0,095 23,5 0,176 21,6	N_t proteino-* gener DL- As-N in % des NtD-As-N** in % des Nt(%)(3)(4)(2)(3)(4)0,4036,52,30,2445,34,20,2241,01,50,1945,63,70,12516,31,60,1026,63,60,17411,11,50,11420,92,40,09523,51,7721,62,1

As = Aminosäure

- * hier sind nur die Racemate der proteinogenen Aminosäuren berücksichtigt.
- ** Die absoluten Werte für den DL-As-N und den D-As-N in den betreffenden Böden sind aus den Angaben der Tabellen 8, 10 und 12 berechnet und sind hier nicht im einzelnen aufgeführt.

5.4 <u>Zum Vorkommen von D-Aminosäuren im Ah_{e1}-Horizont der Sauren</u> <u>Locker-Braunerde und im Ah-Horizont der Rendsina des</u> <u>Göttinger Waldes</u>

Diese beiden Böden wurden insbesondere deswegen in die Untersuchungen einbezogen, weil sie vom Standort, von der Vegetation und von der genetischen Entwicklung her betrachtet sehr stark voneinander abweichen. Bei der Sauren Locker-Braunerde ist die Humusart des Ah_e-Horizontes als typischer Moder, bei der Rendsina in beiden Fällen als Mull zu bezeichnen.

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, konnten in dem Bodenhydrolysat des Ah_e-Horizontes der Sauren Locker-Braunerde keine D-Aminosäuren nachgewiesen werden. In den Bodenhydrolysaten der Rendsina hingegen wurden an beiden Standorten D-Serin und D-Alanin und in dem Boden,durch den der Pilz Clitocybe nebularis bereits "hindurchgewandert" war, (Tabelle 14) zusätzlich noch D-Glutaminsäure und D-Arginin gefunden.

Die beiden Böden der Rendsina sind ferner insofern von besonderem Interesse, als in dem Bodenhydrolysat nach der Behandlung mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase, teils nur geringfügig erhöhte, teilweise aber mit statistischer Sicherheit größere Mengen an Aminosäuren vorhanden waren als in dem aliguoten Volumen einer nicht oxidierten Probe. Aus entsprechenden Null-Versuchen, in denen nur der interne Standard D-Methionin zur Oxidation gelangte, kann ausgeschlossen werden, daß die größeren Mengen der Aminosäuren eventuell durch Autolyse aus den verwendeten Enzymen Katalase und D-Aminosäure-Oxidase selbst stammen könnten. Da bei der Oxidation von D-Aminosäuren pro Mol oxidiertes Substrat jeweils ein Moläquivalent Ammoniak frei wird, dürfte der statistische Mittelwert für Ammoniak in den oxidierten Ansätzen im Vergleich zu den nicht oxidierten Ansätzen nur um den äquivalenten Molbetrag höher liegen, der sich aus der Summe der im einzelnen durch Oxidation nachgewiesenen D-Aminosäuren ergibt. Daß diese Schlußfolgerung bei beiden Rendsina-Proben auch nicht annähernd realisiert ist, geht aus den letzten drei Zeilen der Tabellen 13

und 14 hervor. In der letzten Zeile der Tabellen ist jeweils die Summe aller Aminosäuren angegeben, die in dem betreffenden Ansatz analysiert wurden. Hier ergeben sich keine großen Differenzen zwischen den beiden zu vergleichenden Werten (Spalte (2a) und Spalte (3a)). Die zweitletzte Zeile in Spalte (3a) enthält jeweils die Menge an D-Aminosäuren, die insgesamt durch Oxidation nach der beschriebenen Methode bestimmt wurden.

In der drittletzten Zeile der Tabellen 13 und 14 sind die korrespondierenden Werte für Ammoniak angegeben, wie sie mit dem automatischen Aminosäure-Analysator bestimmt wurden. Dabei ist der NH_4 -Wert in Spalte (3a) bereits um die Menge an NH_4 vermindert, die in dem betreffenden Vergleichsansatz jeder Inkubationsserie nur durch Oxidation des verwendeten internen Standards frei wird. Mithin hätte im Idealfall der Wert für Ammoniak in Spalte (3a) nur um den in der zweitletzten Zeile der Tabellen 13 und 14 erscheinenden Betrag an Nanomolen D-Aminosäuren größer sein dürfen als der Wert für Ammoniak in der nicht oxidierten Probe (drittletzte Zeile, Spalte (2a)).

Es ist daher zu vermuten, daß die wesentlich größeren Mengen an Ammoniak in den Oxidationsansätzen zumindest anteilig aus niedermolekularen Fulvosäuren und Hum**in**säure-Vorstufen stammen, die bei der Reinigungsprozedur der Bodenhydrolysate nicht erfaßt wurden, andererseits aber bei der Behandlung mit den Enzymen D-Aminosäure-Oxidase und Katalase zusätzlich Ammonium-Ionen und möglicherweise auch geringe Mengen an Aminosäuren aus eben diesen Fulvosäuren freisetzten. Für diese Argumentation gibt es einige konkrete Hinweise und Befunde.PIPER und POSNER (1972) konnten nachweisen, daß die salzsaure Hydrolyse in Gegenwart von H₂O₂ (3% H₂O₂ in 6 NHCl) bei Huminsäuren mehr Aminosäuren freisetzte als wenn die salzsaure Hydrolyse ohne Wasserstoffperoxid durchgeführt wurde. In Erweiterung dieses Konzeptes haben wir (ALDAG, 1976) feststellen können, daß sich die Stickstoff-Fraktion des Hydrolysat-Rest-N in Boden - oder Huminsäure-Hydrolysaten ganz ähnlich verhält. Wir konnten zeigen, daß die Verteilung des N auf die verschiedenen N-Fraktionen des salzsauren Hydrolysates nach einer zweiten Hydrolyse-Behandlung - unter Zusatz von H₂O₂ sich sehr wesentlich veränderte, nämlich dergestalt, daß der N-

Gehalt der Fraktion Hydrolysat-Rest-N sehr deutlich abgenommen hatte. während die Menge an Pseudo-Amid-N und solcher Aminosäuren, die eine zweite funktionelle Gruppe am Molekül besitzen, wie z.B. Lysin, stark zunahm (ALDAG, 1976). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die mit statistischer Sicherheit nachgewiesene Erhöhung der Aminosäure- und der Ammoniak-Gehalte in den Oxidationsansätzen im Vergleich zu den nicht oxidierten Proben (siehe Tabelle 13 und 14) durch die oxidativen Bedingungen, die zu einer vermehrten Freisetzung eben dieser Amino-Komponenten aus sogenannten "N-Phenyl-Aminosäure-Komplexen" geführt haben, hervorgerufen wurde. Auch die Tatsache, daß in der Tabelle 13 gerade die Aminosäuren mit einer zweiten funktionellen Gruppe, wie Asparaginsäure, Threonin und Tyrosin, und in der Tabelle 14 ebenfalls Tyrosin sich mit hochsignifikanter Sicherheit von den korrespondierenden Werten im nicht oxidierten Ansatz unterscheiden, spricht für diese Begründung.

6. Zusammenfassung

Einleitend wird auf die besøndere Stellung des Aminosäure-Stickstoffs als mengenmäßig größte N-Fraktion im Vergleich zu allen anderen analytisch sicher bestimmbaren Stickstoff-Fraktionen des Bodens hingewiesen.

Basierend auf der Hypothese, daß möglicherweise die unnatürlich konfigurierten D-Aminosäuren bei biologischen Auf- und Abbauprozessen der organischen Substanz im Boden eine besondere ökologischökochemische Funktion besitzen, werden im theoretischen Teil dieser Arbeit erstmals die Partner des Ökosystems Boden vorgestellt, bei denen D-Aminosäuren bis heute gefunden und nachgewiesen worden sind. Die wichtigsten Produzenten von D-Aminosäuren sind im Bereich der Mikroflora und -fauna sowie der Meso- und Makrofauna des Bodens zu finden.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: I. <u>Methoden und Voruntersuchungen:</u>

Zur Bestimmung von D-Aminosäuren im Boden wird eine enzymatischchromatographische Methode beschrieben, die die Erfassung geringer Mengen an D-Aminosäuren in Gegenwart größerer Mengen an L-Aminosäuren (Nanomol-Bereich) gewährleistet.

<u>In Hydrolyse-Modellversuchen</u> zur Frage der Racemisierung von proteinogenen L-Aminosäuren des Caseins in Gegenwart von Boden konnte in keinem Falle ein statistisch gesicherter Einfluß der sauren Hydrolyse auf eine mögliche Racemisierung festgestellt werden. Lediglich in den Fällen, <u>wo ohne Zugabe einer Bodenprobe</u> <u>hydrolysiert worden war</u>, wurde beim Prolin ein signifikanter und beim Histidin und Arginin ein hoch signifikanter Einfluß der Hydrolyse auf die Racemisierung registriert.

In <u>anderen Voruntersuchungen</u> wurde die Frage nach der Racemisierung von monomer oder von in Peptid-Bindung vorliegenden D-Aminosäuren während der salzsauren Hydrolyse <u>in Gegenwart von Boden</u> geprüft. Auch hier ist der Racemisierungseffekt als äußerst gering anzusehen.

Bezogen auf die zugegebene Ausgangsmenge der D-Aminosäure liegt der Racemisierungseffekt durchschnittlich zwischen 0,4 und 2,6 %. Der höhere Racemisierungseffekt bei den N-Acetyl-Derivaten des D-Leucins und des D-Valins wird auf mögliche Verunreinigungen des Präparates zurückgeführt.

II. Ergebnisse:

Die Untersuchungen zur Bestimmung von D-Aminosäuren in 14 verschiedenen Böden bzw. Horizonten haben ergeben, daß der Anteil der D-Aminosäuren offensichtlich sehr stark von den spezifischen Standortbedingungen abhängig ist.

Während zum Beispiel in dem Ah_{e1}-Horizont der sauren Locker-Braunerde des Bayerischen Waldes überhaupt keine D-Aminosäuren nachgewiesen werden konnten,sind in den Ah-Horizonten der Rendsina des Göttinger Waldes zahlreiche D-Aminosäuren enthalten.

Die umfangreichen Untersuchungen an dem Standort der ^Rendsina des Göttinger Waldes (siehe Abschnitt 4.4), der von dem Basidiomyceten Clitocybe nebularis stark beeinflußt war, haben ergeben, daß in beiden Profilen D-Serin und D-Alanin und in dem Profil "Innen" zusätzlich noch D-Glutaminsäure und D-Arginin statistisch gesichert vorkommen.

Im Abschnitt 5.4 der Diskussion wird besonders darauf hingewiesen, daß im salzsauren Boden-Hydrolysat in der Stickstoff-Fraktion <u>Hydrolysat-Rest-N</u> Aminosäuren vom Typ der "N-Phenyl-Aminosäure-Komplexe" vorliegen, die möglicherweise von dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase angegriffen werden können und somit zur Erhöhung der Aminosäure-Mengen in den mit Enzym behandelten Proben beitragen (siehe Abschnitt 4.4 Tabellen 13 und 14).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der Anteil des D-Aminosäure-Stickstoffs bezogen auf den Gesamt-Aminosäure-Stickstoff im Bodenhydrolysat zwischen 3,7 bis 13,6 % ausmacht. Diese Ergebnisse zur Charakterisierung und zur quantitativen Bestimmung des *A*-Aminosäure-N hinsichtlich seiner Zugehörigkeit zur nichtproteinogenen D-Reihe sind unseres Wissens erstmals in Versuchen erhalten worden.

7. Methoden und Material

7.1 Gewinnung der gebundenen Aminosäuren des Bodens

In der Regel 1 g Boden (ca. 0,1-0,25 % N enthaltend, lufttrocken, <60 μ - 120 μ) 12 Stunden am Rückflußkühler mit 6N HCl hydrolysieren, dann abfiltrieren, überschüssige HCl bei 60 - 70° Celsius im Vakuum entfernen, anschließend in einem aliquoten Volumen H₂0 dest. aufnehmen (5 - 10 ml) und bei 5° Celsius im Kühlschrank aufbewahren.

7.2 Material

Verwendete Chemikalien, Enzyme etc.:

D-Aminosäure-Oxidase:

Herkunft: Worthington Biochemical Corporation Freehold, New Jersey, USA Code: DAOFF (gewonnen aus Schweinenieren, ist ein besonders hochwertiges Enzym, elektrophoretisch gereinigt und isoliert, enthält das intakte Flavoprotein, daher keine Coenzym-Zugabe erforderlich, setzt keine freien Aminosäuren frei). Minimale spezifische Aktivität: 2 Einheiten pro mg Enzym.

Katalase:

Herkunft: Sigma Chemical Company St. Louis MO. USA Code: C 100 2 x kristallisiert isoliert aus Rinderleber, ca. 30 000 bis 40 000 Sigma-Einheiten pro mg Enzym

Aminosäuren:

Herkunft: alle L- und D-Aminosäuren: E. Merck, Deutschland C¹⁴-D-Valin: Calbiochem, Los Angeles, Calif. USA spezif. Aktivität: 9,8 m Ci/m Mol C¹⁴-L-Leucin: Amersham-Buchler, Braunschweig Code: CFA 272 Spezifische Aktivität: 466 µ Ci/mg Aminosäure

Die optische Reinheit der D-Aminosäuren D-Leucin und D-Lysin wurde mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase überprüft und Übereinstimmung mit den Angaben der Hersteller festgestellt.

Die optische Reinheit der D-Glutaminsäure, des D-Ornithins, der beiden N-Acetyl-Derivate sowie aller verwendeten L-Aminosäuren wurde nicht überprüft.

```
Weitere Aminosäuren und Peptide:
Poly-D-Tyrosin (MG ca. 44 000)
Gramicidin (G 5002) (soll identisch sein mit Gramicidin D oder
DF)
Poly-D-Alanin (MG ca. 42 000)
D-Ornithin
N-Acetyl-D-Leucin
N-Acetyl-D-Valin
Alle bezogen von: Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA
D-Alanin und D-Arginin bezogen von der Fluka AG,Schweiz.
```

8. Literaturverzeichnis	
ALDAG, R.:	Zur Bestimmung und Zuordnung des echten Amidstickstoffs in Proteinen, Böden, Huminsäuren und Klärschlamm. Mitteilungen der Deutschen Boden- kundlichen Gesellschaft <u>20</u> , 393-399 (1974)
ALDAG, R.W.:	Relations between pseudo-amide nitrogen and humic acid nitrogen released under different hydrolytic conditions. Soil Organic Matter Studies, Vol.I; 293-299 (1977a) Vienna IAEA-SM-211/28
ALDAG, R.:	Humusabbau durch Basidiomyceten in einer Lehmrendsina des Göttinger Waldes. Mitteilg. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch. 25, 305-312 (1977 b)
ALDAG, R.:	Verfügbarkeit des Stickstoffs in Ackerböden. Bestimmungsprobleme aus der Sicht der Umverteilung der Stickstoff-Bindungsformen durch Bebrütung. Ldw. Forschung 32/I. Sonderheft 1976, Kongreßband 1975. S.91-99
ALDAG, R., DREWS, HJ. und MEYER, B.:	Die Umverteilung des Stickstoffs in verschiedenen N-Fraktionen von Acker- böden durch Bebrütung in Abhängigkeit von der zugesetzten Kohlenstoff- Quelle. Ldw. Forschung 1977, SH 33 (im Druck)
ALDAG, R.:	Vernachlässigte Aminosäuren des Bodens und ihre Wirkung auf höhere Pflanzen. Dissertation, Landw. Fakultät Göttingen, 1966
ALDAG, R.W. and YOUNG, J.L.:	D-Amino autds in Soils. I. Uptake and metabolism by seedling Maize and Ryegrass. Agronomy Journal <u>62</u> , 184-189 (1970a)
ALDAG, R.W. and YOUNG, J.L.:	Aspects of D-Leucine and D-Lysine metabolism in Maize and Ryegrass seedlings. Planta <u>95</u> , 187-201 (1970b)
ALDAG, R.W., YOUNG, J.L. and YAMAMOTO, M.:	An enzymatic chromatographic proce- dure for the determination of D- Amino acids in plant and soil extracts. Phytochemistry <u>10</u> , 267-274 (1971)

D-Valine metabolism in sunflower ALDAG, R. W., YOUNG, J.L., KICKUTH. R. and VARDAKIS, F .: seedlings. Biochem. Physiol.Pflanzen <u>163</u>, 363-374 (1972) C¹⁴O₂ Evolution as evidence of D-Valine metabolism in corn and ALDAG, R.W. and YOUNG, J.L.: sunflower seedlings. Z. Pflanzenphysiologie 71, 83-85 (1974)ALLISON, F.E.: The fate of applied nitrogen to soils. Advances Agron. <u>18</u>, 219-258 (1966) BAUBERGER, W., ELLING, W., Der Bayerische Wald unter besonderer und RUECKERT, G .: Berücksichtigung des Nationalparks. Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, Exkursionsführer 21, 55-102 (1975) 'Uncommon' amino acids in plants. BELL, E.A.: FEBS Letters 64, 29-35 (1976) D-Amino acids in yeast pool. BHATTACHARYYA, S.K. and Canad. J.Microbiol.15, 1107-1109 BANERJEE, A.B.: (1969)BODANSZKY, M. and PERLMAN, D.: Peptide Antibiotics. Science 163, 352-358 (1969) BREMNER, J.M.: The ammino acid composition of the protein material in soil. Biochem. J. <u>47</u>, 538-542 (1950) CORRIGAN, J.J.: D-amino acids in animals. Science 164, 142-149 (1969) EGAWA, H., TSUDA, M., Formation of abnormal mycelium of UEYAMA, A. and MATUO, T .: Fusarium roseum Link. on a modified Czapek-D-amino acid medium. Experientia 24, 403-404 (1968) ESCHRICH. W. and HARTMANN. T.: Translokation und biochemisches Verhalten von D- und L-Phenylalanin bei Vicia faba. Planta 85, 213-227 (1969) FLEIGE, H.: Fraktionierungsmethoden des Bodenstickstoffs und ihre Anwendung auf die Erfassung der N-Metabolik und N-Bilanz in einer Acker-Parabraunerde. Dissertation, Landw.Fakultät Göttingen, 1970

Fraktionierung des Stickstoffs für FLEIGE, H., MEYER, B. und N-Haushaltsbilanzen. SCHOLZ, H.: Göttinger Bodenkundl. Berichte 18, 1-37 (1971) Bilanz und Umwandlung der Bindungs-Formen von Boden- und Dünger-Stick-FLEIGE, H., MEYER, B. und SCHOLZ, H.: stoff (N¹⁵) in einer Acker-Parabraunerde aus Löß. Göttinger Bodenkundl. Berichte 18, 39-86 (1971) FLEIGE, H. und BÄUMER, K .: Effect of zero-tillage on organic carbon, total nitrogen and distri-bution in different N-fractions in loessial soils. (submitted for publication: Agro-Ecosystems, 1,19-29 (1974) FOWDEN, L.: The chemistry and metabolism of recently isolated amino acids. Annual Review of Biochemistry 33, 173-204 (1964) FRIES, K.: Antimetabolische Hemmung des Strekkungswachstums von Haferkoleoptilsegmenten durch ortho- und meta-DL-Tvrosin. Naturwissenschaften 58, 57 (1971) FUHR, F. und STEFFENS, W.: Untersuchungen zum Stoffwechsel von D-Leucin in Pflanzen. 1. Wurzelaufnahme aus Nährlösung und Boden und Verteilung in Vicia faba L. Landw. Forschung 25, 226-236 (1972) GAFFNEY, T.J., ROSENBERG, H. The purification and properties of and ENNOR, A.H.: Adenosine Triphosphate-Lombricine Phosphotransferase. Biochem. J. 90, 170-176 (1964) GRAY, D.O.: Trans-4-0-hydroxymethyl-D-proline from Eriobotrya japonica. Phytochemistry 11, 751-756 (1972) GROHMANN, K. and PARR, W .: Investigation of the diastereoisomeric association complex for the separation of amino acid enantiomers on optically active stationary phases. Chromatographia 5, 18-22 (1972)

HAMDI, Y.A.:	Effect of D-, L- and DL-Methionine on growth and efficiency of Rhizobium Meliloti strains. Plant and Soil <u>31</u> ,111-121 (1969)
HARE, P.E.:	Geochemistry of proteins, peptides and amino acids. In: Organic geo- chemistry p.438-463; Eglinton, G., and Murphy, M.T.J. eds.; Springer- Verlag, Heidelberg, New York (1970)
HUNTJENS, J.L.M.:	Influence of living plants on im- mobilization of nitrogen in permanent pastures. Plant and Soil <u>34</u> , 393-404 (1971)
HUNTJENS, J.L.M.:	Amino acid composition of humic acid-like polymers produced by streptomycetes and of humic acids from pasture and arable land. Soil Biol. Biochem. <u>4</u> , 339-345 (1972a)
HUNTJENS, J.L.M.:	Availability of microbial and soil organic nitrogen to a Pseudomonas strain and the effect of soil organic matter on the availability of casein nitrogen. Soil Biol. Biochem. <u>4</u> , 347-358 (1972b)
JANSSON, S.L.:	Use of N ¹⁵ in studies of soil nitrogen in: Soil Biochemistry Vol.2, McLaren, A.D. and Skujins, J., eds., p.129-166; M. Dekker Inc. New York, 1971
KEENEY, D.R. and BREMNER, J.M.	.: Effect of cultivation on the nitro- gen distribution in soils. Soil Sci. Am. Proc. <u>28</u> , 653-656 (1964)
KEGLEVIĆ, D., LADESIĆ, B. and POKORNY, M.:	Biochemical Studies in tobacco plants. IV. N-Malonylmethionine, metabolite of D-Methionine in Nicotiana rustica. Arch. Biochem. Biophys. <u>124</u> , 443-449 (1968)
KHAN, S.U. and SOWDEN, F.J.:	Distribution of nitrogen in the black solonetzic and black chernozemic soils of Alberta. Canad. J. Soil Sci. <u>51</u> , 185-193 (1971)
KICKUTH, R. und ALDAG, R.:	Einwirkung von D-Aminosäuren auf Kulturpflanzen. Angewandte Botanik XLI, 165-175 (1967)
KRISTENSEN, J., LARSEN, O.P. und SØRENSEN, H.:	Free amino acids and <i>p</i> -glutamyl- peptides in seeds of Fagus Silvatica. Phytochemistry <u>13</u> , 2803-2811 (1974)

Azetidine-2-carboxylic acid deriva-KRISTENSEN, I. und tives from seeds of Fagus Silvatica L. LARSEN. O.P.: and a revised structure of nicotianamine. Phytochemistry 13, 2791-1798 (1974) KURAMITSU, H.K. and SNOKE, J.E.: The biosynthesis of D-amino acids in Bacillus Licheniformis. Biochim. Biophys. Acta 62, 114-121 KVENVOLDEN, K.A., PETERSON, E., Racemization of amino acids in and BROWN, F.S.: sediments from Saanich Inlet.British Columbia, Science 169, 1079-1082 (1970) LADESIC, B., POKORNY, M. Metabolic patterns of L- and D-Serine and KEGLEVIC, D.: in higher and lower plants. Phytochemistry 10, 3085-3091 (1971) LARSEN. P.O.: Meta-carboxy-substituted aromatic amino acids in plant metabolism. III Biochim. Biophys. Acta 141, 27-46 (1967)LARSON, D.M., SNETSINGER, D.C., Procedure for determination of Dand WAIBEL. P.E.: amino acids. Analyt. Biochem. <u>39</u>, 395-401 (1971) LOWE, L. E.: Amino acid distribution in forest humus layers in British Columbia. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 569-572 (1973) MANNING, J.M. and MOORE, S.: Determination of D- and L-amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L Dipeptides. The Journal of Biological Chemistry 243, 5591-5597 (1968) NAKAPARKSIN, S., BIRELL, P., Gas chromatography with optically GIL-AV, E. and ORO, J.: active stationary phases: Resolution of amino acids. J. Chromatogr. Sci. 8, 177-182 (1970) PIPER, T.J. and POSNER, A.M.:Humic acid nitrogen. Plant and Soil 36, 595 (1972) POCKLINGTON, R.: Free amino acids dissolved in North Atlantic Ocean waters. Nature 230, 374-375 (1971) POKORNY, M., MARCENKO, E., Comparative Studies of L- and Dand KEGLEVIC, D.: Methionine metabolism in lower and higher plants. Phytochem. 9, 2175-2188 (1970)

131 (1966)

acid.

1968)

The extent of racemization of some

Analyt. Biochem. 24, 18-26 (1968)

amino acids by gas chromatography. Analytical Chemistry <u>40</u>, 1356-1358

amino acids in dilute alkalitreated protein and soil humic and fulvic

Resolution of racemic aspartic acid, tryptophan, hydroxy and sulfhydryl

POLLOCK, G.E. and FROMMHAGEN, L.H.:

POLLOCK, G.E. and KAWAUCHI, A.H.:

RICHTER, W.: Vergleichende Untersuchungen des Wasserhaushaltes und Untersuchungen der Wasserdynamik in einem repräsentativen Parabraunerde-Areal mit mächtiger Lößdecke. Dissertation, Landw. Fakultät der Universität Göttingen, 1974

RODEBAUGH, R.M. and CROMWELL, N.H.: Resolution of DL-Azetidine-2-Carboxylic acid. J. Heterocycl. Chem. <u>6</u>, 993 (1969)

ROSA, N., and NEISH, A.C.: Formation and occurrence of N-Malonylphenylalanine and related compounds in plants. Canad. J. Biochem. <u>46</u>, 797-806 (1968)

ROSENBERG, H., and ENNOR, A.H.: Occurrence of free D-Serine in the earthworm. Nature, <u>187</u>, 617-618 (1960)

SALTON, M.R.J.: The bacterial cell wall. Elsevier Inc. 1964, Amsterdam, London, New York

SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969, S.36

SCHMIDT, J.H. und ZENK, M.H.: Determination of D-amino acids by stereospecific enzymatic acetylation. Analyt. Biochem. <u>23</u>, 433-441 (1968)

SCHONLAU, H.: Die divergierende Humus-Metabolik benachbarter Sauer-Braunerden und Rendsinen unter Wald im Licht organischer Stoffgruppen-Untersuchungen. Dissertation, Landw. Fakultät Göttingen (1969)

Loss of effectiveness and infectivity SCHWINGHAMER. E.A.: in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors. Canad. J. Microbiol. 14, 355-367 (1968)Microdetermination of D-amino acids SODA, K.: and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Analyt. Biochem. 25, 228-235 (1968) SÖRENSEN, L.H.: Stabilization of newly formed aminoacid metabolites in soil by clay minerals. Soil Sci. 114, 5-11 (1972a) SÖRENSEN. L.H.: Role of amino acid metabolites in the formation of soil organic matter. Soil Biol. Biochem. 4, 245-255 (1972b) TAKEBE, J.: Extent of cross linkage in the murein sacculus of Escherichia coli B.cell wall. Biochim. et Biophys. Acta 101, 124-126 (1965)THOMPSON, J.F., MORRIS, C.J., New naturally occuring amino acids. and SMITH. I.K.: Annual Review of Biochemistry 38, 137-158 (1969) VAN ANDEL, O.M.: Amino acids and plant deseases. Ann. Rev. Plant Phytopathology, 4. 349-368 (1966) WAGNER, G. and MUTATKAR, V.K.: Amino components of soil organic matter formed during humification of C¹⁴-Glucose. of C¹⁴-Glucose. Soil Sc. Soc. Am. Proc. <u>32</u>, 683-686 (1968)WEHMILLER, J. and HARE, P.E.: Racemization of amino acids in marine sediments. Science, 173, 907-911 (1971) YOUNG, J.L. and YAMAMOTO, M.: Comparative effectiveness of several D-amino acid oxidases. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 4, 129-135 (1973) ZÄHNER, H .: Biologie der Antibiotika. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965

ZENK,	M.H.	und	SCHERF,	Н.:	D-Tryptophan in höheren Pflanzen. Bioch∉m. Biophys. Acta <u>71</u> , 737-738 (1963)
				12101	

ZENK, M.H. und SCHERF, H.: Verbreitung der D-Tryptophan-Konjugationsmechanismen im Pflanzenreich. Planta <u>62</u>, 350-354 (1964)


ALDAG, R.:

UNTERSUCHUNGEN ZUR STEREOSPEZIFISCHEN SORPTION VON D- UND L-AMINOSÄUREN AM MONTMORILLONIT

Göttinger Bodenkundliche Berichte <u>58,</u>69–131 (1979)

INHALT

•

1.	Einl	eitung	und Problemstellung	72			
2.	Mate	rial un	d Methoden	79			
	2.1	Beschr	eibung der Sorptionsversuche	79			
	2.2	Kennda	ten der verwendeten Tonsuspensionen	81			
	2.3	Herkun	ft der Aminosäuren	82			
3.	Erge	bnisse		82			
	3.1	Vorunt	ersuchungen	82			
		3.1.1	Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit bei pH-Werten zwischen pH 7,0 - 8,5	82			
		 Voruntersuchungen 3.1.1 Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit bei pH-Werten zwischen pH 7,0 - 8,5 3.1.2 Sorptionsversuche mit D- und L-Glutamin- säure an Ca- und Na-Montmorillonit 3.1.3 Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca- und Na-Montmorillonit Hauptuntersuchungen 3.2.1 Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit 3.2.2 Messung der stereospezifischen Sorption der in einem Bacemat vorliegenden stereo- 					
		3.1.3	Säure an Ca- und Na-Montmorillonit Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin un Ca- und Na-Montmorillonit Sersuchungen				
	3.2	Hauptu	ntersuchungen	89			
		3.2.1	Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit	89			
		3.2.2	Messung der stereospezifischen Sorption der in einem Racemat vorliegenden stereo- isomeren Aminosäuren, dargestellt an der Sorption von D, C ¹⁴ -L-Leucin an Na- Montmorillonit	92			
		3.2.3	Sorptionsversuche mit den diastereoiso- meren Dipeptiden des Leucins sowie den Dipeptiden L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl- Glycin an Na-MontmorilMonit	97			
4.	Disk	ussion		102			
	4.1	Allgem	eine Anmerkungen	102			
	4.2	Vorunt	ersuchungen	104			
		4.2.1	Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit bei pH- Werten zwischen pH 7,0 und 8,5	105			

Seite

		4.2.2	Sorptionsversuche mit D- und L-	Seite
			Glutaminsäure an Ca- und Na-Mont- morillonit	106
		4.2.3	Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca- und Na-Montmorillonit	106
	4.3	Hauptu	ntersuchungen	108
		4.3.1	Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit	108
		4.3.2	Messung der stereospezifischen Sorption der in einem Racemat vorliegenden stereo- isomeren Aminosäuren, dargestellt an der Sorption von D, C ¹⁴ -L-Leucin an Na- Montmorillonit	- - 118
		4.3.3	Sorptionsversuche mit den diastereoiso- meren Dipeptiden des Leucins sowie den Dipeptiden L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl- Glycin an Na-Montmorillonit	119
5.	Zusam II di	menfass eser Ar	ende Diskussion der in den Teilen I und beit mitgeteilten Ergebnisse	121
6.	Zusam	menfass	ung	122
7.	Liter	aturver	zeichnis	125

,

1. Einleitung und Problemstellung

Die im <u>ersten Teil</u> dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zum Vorkommen und zur ökochemischen Bedeutung von einzelnen D-Aminosäuren an einem ganz bestimmten Standort, der durch seinen Bodentyp hinreichend charakterisiert ist, wirft natürlich die Frage auf, welches die entscheidenden Kriterien sind, die zu einer solchen Differenzierung hinsichtlich der Zugehörigkeit zur proteinogenen oder peptidogenen L- oder D-Reihe geführt haben. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die überwiegende Dominanz der natürlichen proteinogenen L-Aminosäuren im Boden ein Abbild der natürlichen Auf-, Um- und Abbauprozesse im Boden ist, oder ob bestimmte Partner des Systems möglicherweise einen gezielt steuernden Einfluß auf die Bildung der organischen Substanz des Bodens ausüben. Dies wirft vor allem die Frage nach den Wechselwirkungen zwischen organischer und mineralischer Substanz auf.

Zur Frage der Wechselwirkung zwischen Tonmineralen einerseits und definierten organischen Verbindungen der verschiedensten Stoffklassen und Huminsäuren andererseits haben GREENLAND (1965c, 1965d),MORTLAND (1970) und WEISS (1970) umfassend berichtet.

Nach GREENLAND (1965c) liegen - ausgenommen auf sehr sandigen Böden - etwa zwischen 60 und 90 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs in fester Verknüpfung mit dem Mineralkörper des Bodens vor. Daraus muß gefolgert werden, daß die sog. freien organischen Verbindungen im Boden sehr viel schneller metabolisiert werden können, als die organische Substanz, die in den Ton-Humus-Komplexen gebunden ist. In der Tabelle 1 sind die Bindungstypen und Bindungspartner zusammengestellt, die überhaupt bei den Wechselwirkungen zwischen Tonmineralen und organischen Verbindungen auftreten können.

Auf diese Bindungsmechanismen, die in Modelluntersuchungen vielfach studiert worden sind, soll hier nicht näher eingegangen werden. Es seien lediglich noch einmal die wichtigsten Eigenschaften der Bindungspartner genannt, die die Adsorption der organischen Verbindungen an Tonmineralen beeinflussen:

- 1. <u>Bindungspartner Tonmineral:</u> Gesamtoberfläche, Art und Struktur des Tonminerals (Abstände der Elementarschichten, Größe und Windungen der Poren), Dichte und Verteilung der Ladung an der Oberfläche, austauschbare und fixierte Ionen an der Oberfläche, Konfiguration der Oberfläche.
- 2. <u>Bindungspartner org. Verbindung:</u> Größe, Ladung, Polarität, Polarisierbarkeit, Konstitution, Konfiguration, Flexibilität, Löslichkeit.

Schließlich sind die Art und die Eigenschaften des Mediums (Fest-, Flüssig- oder Gasphase), in dem die Sorption stattfindet, ebenfalls von großer Bedeutung.

In jüngster Zeit haben die verbesserten Methoden der Infrarotspektroskopie zur Erweiterung des Wissens auf diesem Gebiet beigetragen (MORTLAND, 1970). Allerdings können die Erkenntnisse nur bedingt auf die Verhältnisse im Boden übertragen werden, weil dort sehr viel komplexere Bedingungen existieren.

Das soll am Beispiel der Aminosäuren, Peptide, Eiweiße und proteinhaltigen organischen Substanz kurz erläutert werden.

Es ist seit langem bekannt, daß Aminosäuren als Kationen von Tonmineralen sorbiert werden können. So konnte TALIBUDEEN bereits 1954 die Sorption einiger Aminosäuren an Montmorillonit im sauren Medium nachweisen. Tabelle 1: Verschiedene Bindungstypen, die für die Wechselwirkungen zwischen Tonmineralen und organischen Verbindungen verantwortlich sind in Anlehnung an GREENLAND (1965c) und SCHEFFER und ULRICH (1960)

Bindungstyp	Bindungskräfte	Bindungspartner Oberfläche des Tonminerals	Org. Verbindungen
Ionenbindung	Coulomb'sche Kräfte proportional:1/r ² pH-Abhängigkeit, Gültigkeit des Massen- wirkungsgesetzes	 a) negativ geladen b) positiv geladen (mit positiven Ionen belegt) 	positiv geladen (z.B.Aminosäuren, Amine, Proteine) negativ geladen (z.B. Glucuron- säuren, Huminsäuren)
Van-der- WAALS- Bindungen a) Polar Ion-Dipol Dipol-Dipol	schwache Ladungs- unterschiede geringe Reichweite	Tonoberfläche mit anor- ganischen und (oder) organischen Kationen belegt	Zahlreiche org. Verbindungen, je nach Größe, Struk- tur u.funktionellen Gruppen,Bildung von Zwitterionen,Dipo- len,Zuordnung von H-Brücken möglich (z.B.Alkohole,org. Säuren,Polysacchari- de)
b) unpolare Dis- persionskräfte	sehr schwache Ladungs- unterschiede, stark temperaturab- hängig		Fulvosäuren, Huminsäuren, Proteine, Fettsäuren

- 74 -

Die Basizität der Aminosäuren hat einen größeren Einfluß auf die Sorption als die Molekülgröße. Schließlich konnten GREENLAND et al. (1965a, 1965b) zeigen, daß physikalische Sorptionskräfte (hauptsächlich Van der WAALS – Kräfte) zusätzlich bei der Sorption von Aminosäuren an Tonoberflächen wirksam werden können. Der Bindungstyp dieser Sorption wurde aus der Tatsache hergeleitet, daß die Aminosäuren von mit Na- bzw. Ca-belegtem Montmorillonit selbst bei einem pH-Bereich, der in der Nähe des isoelektrischen Punktes der betreffenden Aminosäuren lag, sorbiert wurden, ohne daß ein Kationenaustausch am Ton festgestellt wurde.

Seit den grundlegenden Arbeiten von ENSMINGER und GIESEKING (1939, 1941) ist ebenfalls bekannt, daß Proteine von Montmorilloniten und anderen Dreischicht-Tonmineralen sorbiert werden können. Die Menge Protein, die pro g Ton sorbiert wirds hängt nicht nur vom Typ des Tonminerals sondern auch von der Art und der Basizität des Proteins ab. WEISS (1970) hat z.B. festgestellt, daß sich die Sorption des stark basischen Proteins Salmin (aus Heringssperma gewonnen) bei steigendem pH-Wert von 8,0 auf 11,4 in der Gleichgewichtslösung von 218 auf 488 mg pro g Montmorillonit erhöhte.

Daß ein Protein-Montmorillonit-Komplex das Protein weitgehend vor dem Abbau durch Bodenbakterien schützen kann, konnten PINCK und ALLISON (1951) sehr eindrucksvoll demonstrieren. In einem Inkubationsversuch hatten die Bodenbakterien nach zehn Tagen reine Gelatine zu etwa 60 %, in einem Gemisch aus Gelatine und Montmorillonit die Gelatine zu etwa 18 % und in einem Gelatine-Montmorillonit-Komplex die Gelatine nur zu ca. 1-2 % abgebaut.

Obwohl keine Zweifel darüber bestehen, daß meistens eine sehr feste Bindung zwischen der organischen Substanz des Bodens (Humus) und den Tonmineralen im Boden existiert, sind die Kenntnisse über diese Bildungsmechanismen sehr gering. Während einige Autoren

- 75 -

(u.a. McLAREN und PETERSON, 1965) mit Hilfe röntgenographischer Methoden keine Einlagerung von Huminsäuren in die Zwischenschichten von Montmorillonit feststellen konnten, haben SCHNITZER und KODAMA (1966) das Eindringen einer Fulvosäure in die Zwischenschichten von Montmorillonit bei sehr niedrigen pH-Werten (pH = 3 und geringer) beobachtet. Nach GREENLAND (1965c) werden Huminsäuren hauptsächlich über Ionenbindungen am Tonmineral sorbiert, wobei mehrwertige Kationen oder Oxide als Brückenglieder zwischen der Huminsäure und dem Tonmineral fungieren. MORTLAND (1970) konnte diese Interpretation besonders aufgrund seiner Erfahrungen mit infrarot- spektroskopischen Methoden teilweise bestätigen.

Ferner muß man annehmen, daß mit zunehmender Größe des Huminsäuremoleküls Bindungen vom Typ der Wasserstoff-Brücken und schwache Dispersionskräfte neben den Ionenbindungen zusätzlich wirksam werden und damit die Stabilität des Ton-Humuskomplexes noch erhöhen.

Welche Rolle nun etwa freie funktionelle NH2-, SH-, COOH- oder OH-Gruppen von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen, die in den Huminsäuren gebunden sind, bei der Sorption der organischen Substanz am Tonmineral spielen, ist bis heute kaum geklärt (SOWDEN, 1966; WANG et al. 1967; LADD and BRISBANE, 1967; PIPER und POSNER, 1968; JONES and PARSONS, 1972; BRISBANE et al. 1972; SOWDEN, 1970; CHALVIGNAC and MAYANDON, 1971; WITTHAUER und KLÖCKNING, 1971). Immerhin sind zahlreiche konkrete Hinweise dafür vorhanden, daß Ton-Aminosäure-Komplexe in natürlichen Böden existieren und daß diese Komplexe möglicherweise eine wichtige Funktion bei den Wechselbeziehungen zwischen Ton und Humus übernehmen. So konnten SCHARPENSEEL und KRAUSSE (1962) nachweisen, daß in vielen Böden und in ihren Huminsäureextrakten nach mehrmaliger Extraktion mit NaOH eine kontinuierliche Abnahme des C/N-Verhältnisses im Rückstand zu verzeichnen war. Allerdings konnte man selbst mit einer sich daran anschließenden erschöpfenden Hydrolyse (6NHCL) aus diesem Rückstand nicht sämtliches ninhydrinpositives Material freisetzen, da nach einer Zerstörung des Rückstandes mit HF noch Aminosäuren nachgewiesen werden konnten. Die Befunde von GOH (1972), nach denen der Aminosäure-Gehalt in Paläo-Horizonten höher als in den sich darüber befindlichen Horizonten war, deuten ebenfalls darauf hin, daß die Bindung der Aminosäuren und der mit ihnen verknüpften organischen Substanz zu den Tonmineraloberflächen außerordentlich stabil und fest ist, so daß sie selbst vor einem mikrobiologischen Angriff über Tausende von Jahren geschützt sind.

In neueren Untersuchungen haben SCHARPENSEEL (1970) und SCHARPENSEEL und KRUSE (1971, 1972) zu klären versucht, welche Rolle die Aminosäuren bei der Bildung des Ton-Huminsäure-Komplexes spielen. Man untersuchte das Fällungsverhalten einer C¹⁴-markierten Huminsäure über einen Zeitraum von 144 Stunden in Gegenwart von Montmorillonit, der zuvor mit verschiedenen sauren. neutralen oder basischen Aminosäuren belegt worden war. Das Vorhandensein der Aminosäuren gleich welcher Acidität beschleunigte den Fällungsvorgang des Ton-Huminsäure-Komplexes aus einer wässrigen Lösung bei pH 7. Allerdings konnte keine Beziehung zwischen der Menge an Aminosäure, die von dem Ton sorbiert worden war (Angaben als mg N/g Ton) und der Reduktion an C¹⁴-Aktivität in der überstehenden Lösung des Ansatzes nach einer bestimmten Schütteldauer festgestellt werden (SCHARPENSEEL und KRUSE. 1972). Leider werden keine gugntitativen Angaben darüber gemacht, wie das Aminosäurespektrum der C¹⁴-Huminsäure selbst aussieht, insbesondere, welche der "Huminsäure -Aminosäuren" möglicherweise C¹⁴-markiert sind. Es wäre immerhin denkbar, daß bis zu einem gewissen Grade ein bevorzugter oder konkurrierender Austausch von bestimmten peripher angeordneten C¹⁴"Huminsäure-Aminosäuren" gegen "Ton -Aminosäuren" am Montmorillonit während des Schüttelversuches stattfindet. Wechselbeziehungen dieser Art könnten die Messungen der Fällungsradiometrie und den Einfluß der ursprünglich am Ton sorbierten Aminosäure verfälschen.

Wenn auch über die einzelnen Bindungsmechanismen, die bei der Wechselwirkung zwischen einem Tonmineral und einer Huminsäure wirksam werden, bis heute noch wenig bekannt ist, so läßt sich an Hand dieser Untersuchungen doch erkennen, daß den Aminosäuren und möglicherweise in stärkerem Maße noch den Proteinen in den Huminsäuren eine bedeutende Funktion als Brückenglied zwischen mineralischer und organischer Substanz beizumessen ist.

Da man aus den bisherigen Ergebnissen zum Vorkommen von D-Aminosäuren (Teil I dieser Arbeit) in den untersuchten Böden nur einige allgemeine Schlußfolgerungen ziehen kann, sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit möglicherweise optisch aktive Aminosäuren stereoselektiv von Tonmineralen sorbiert werden.

Diese Frage ist insofern hoch aktuell, als unlängst darüber in der Literatur, wenn auch z.T. widersprüchlich, berichtet wurde. DEGENS et al. (1970) und JACKSON (1971) hatten mitgeteilt, daß L-Isomere von Aminosäuren im Vergleich zu den korrespondierenden D-Isomeren in Gegenwart von Kaolinit bevorzugt polymerisiert werden. BONNER und FLORES (1973) sowie FLORES und BONNER (1974) berichten jedoch, daß sie die Befunde von JACKSON (1971) hinsichtlich der bevorzugten stereospezifischen Sorption von L- gegenüber D-Phenylalanin an Kaolinit oder die asymmetrische Polymerisation von Asparaginsäure an Kaolinit nicht bestätigen konnten. Auch McCULLOUGH und LEMMON (1974) konnten keine asymmetrische Polymerisation von Asparaginsäure an Kaolinit nachweisen.

Unlängst konnten BONNER et al. (1975) andererseits zeigen, daß offensichtlich sogar an Quarzoberflächen eine selektive Sorption von optisch aktiven Aminosäuren stattfindet. Beispielsweise sorbierte D-Quarz bevorzugt D-Alanin und L-Quarz bevorzugt L-Alanin. Die Untersuchungen von ROHLFING und McALHANEY (1976) haben überzeugend gezeigt, daß selbst "ungereinigter" Quarzsand die Polymerisation von Aminosäuren unter geeigneten Versuchsbedingungen eher fördert als verhindert.

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Sorptionsversuche

Die Sorptionsversuche werden in Glaszentrifugenbechern (Volumen: 20 ml) durchgeführt. In der Regel werden die Zentrifugenbecher mit 5 ml einer 5 %igen Tonsuspension gefüllt, und nach Zugabe der Aminosäurelösung, der Salzsäurelösung etc. mit H_20 dest. genau bis zu einem Volumen von 10 ml gefüllt. Die Zentrifugenbecher sind mit einem Silikonstopfen und einer besonderen Schraubvorrichtung fest verschlossen. Sie werden dann in einem Schüttelgefäß, dessen Temperatur mit Hilfe eines Wasserbad-Thermostaten bei 20[°] Celsius konstant gehalten wird, in horizontaler Lage montiert und anschließend für die Dauer von 5 - 6 Stunden geschüttelt. Bei dieser Anordnung bleibt der Ton im Zentrifugenbecher voll suspendiert und - wie in Vorversuchen festgestellt wurde ist das Austauschgleichgewicht in der Lösung bereits nach 3 - 4 Stunden erreicht.

Dann werden die Proben in Stahlzentrifugenbecher überführt und 40 Minuten bei 10° bzw. 20° C und 15000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die Proben der Voruntersuchungen (siehe Abschnitt 3.1) und die unter 3.2.2. behandelten Proben sind bei 20° C adsorbiert und 10° C zentrifugiert worden. Die unter Abschnitt 3.2.1. und 3.2.3. behandelten Versuche wurden bei Temperaturkonstanz von 10° C durchgeführt. Unmittelbar nach Beendigung des Zentrifugierens gießt man die überstehende Lösung in 20 ml-Proben-Gefäße und bewahrt sie bis zur Analyse am automatischen Aminosäure-Analysator bei 5° C im Kühlschrank auf.

Im Gegensatz zu allen bisherigen Untersuchungen, in denen Sorptionsisothermen von Aminosäuren an Tonen aufgenommen wurden, unterscheiden sich diese Sorptionsversuche durch ihre beachtlich erhöhte Empfindlichkeit, die im Gegensatz zu den Versuchen von GREENLAND et al. (1962) z.B. um drei Zehnerpotenzen empfindlicher ist. Während GREENLAND et al. (1962) die Gleichgewichtskonzentration der Aminosäure-Lösung im Bereich zwischen 0,025 und 0,125 Mol/Liter einstellten, arbeiten wir in der Regel bei einer Gleichgewichtskonzentration von 0,2 - 0,75 m Mol/Liter. Die beachtliche Steigerung der Empfindlichkeit konnte nur unter Zuhilfenahme des Aminosäure-Analysators erreicht werden, indem die Konzentration der betreffenden Aminosäure in der Gleichgewichtslösung am Ende des Sorptionsversuches über die Ninhydrinreaktion am Aminosäure-Analysator (Nanomol-Bereich) ermittelt wurde. Bei GREENLAND et al. (1962) wurde die Sorption der Aminosäuren mit Hilfe der N-Bestimmung nach KJELDAHL ermittelt.

Da in unseren Sorptionsversuchen jeweils immer nur mit einer bestimmten Aminosäure gearbeitet wird, ist das chromatographische Trennverfahren am Aminosäure-Analysator folgendermaßen verändert worden:

Für diese Versuche wurde eine Austauscher-Säule von ca. 20 cm Länge (lichter Durchmesser: 9 mm, gefüllt mit Bio Rad Austauscher-Harz Aminex A5) benutzt. Nach dem Äquilibrieren der Säule für die Dauer von 25 Minuten, gibt man die Proben mit einer Injektionsspritze üher einen manuellen Probenaufgeber im Abstand von 10 - 15 Minuten auf die Säule. Die Proben werden mit einem Na-Citrat-Puffer pH = 5,28 (0,35 N) eluiert. Da sich herausstellte, daß etwa 25 -50 Nanomol NH,Cl 1) pro 1 ml Probelösung enthalten war, konnten nicht mehr als 5 - 6 Einzelanalysen nacheinander am Analysator getrennt und vermessen werden. Zwischendurch mußte jeweils die Austauscher-Säule gereinigt und äquilibriert werden. Die Berechnung und Auswertung der "Aminosäure-peaks" erfolgte jeweils unter Berücksichtigung des Standardwertes eines entsprechenden Schüttelgefäßes, das unter gleichen Bedingungen und Voraussetzungen bei jedem Sorptionsversuch - nur unter Weglassen des Tones - mit angesetzt wurde. Je nach Bedarf wurden von dem abzentrifugierten Ton nach einmaligem Waschen Tonpräparate (auf Objektträgern) hergestellt und lufttrocken nach der Methode der Röntgenbeugung (Müller, Micro 111 mit Zählrohrgoniometer, Cu-Strahlung, Kみ) vermessen.

¹⁾ Die Herkunft des NH_LCl ist nicht geklärt, teilweise wahrscheinlich als Verunreinigung in den Aminosäure-Präparaten und im Na-Citrat-Puffer selbst enthalten.

Die in den Tabellen teilweise angegebenen Δ -Werte errechnen sich aus dem gemessenen d(001)-Abstand vermindert um die Dicke einer Silikatschicht des Montmorillonits (= 9,5 Å).

2.2 Kenndaten der verwendeten Tonsuspensionen

Da in der Literatur vielfach mit Montmorillonit als Vertreter der Dreischicht-Silikate gearbeitet und ohnehin nur an diesen eine bedeutende Sorption von Aminosäuren erwartet werden kann, wurde entschieden, die Sorptionsversuche nur mit Montmorillonit durchzuführen.

Es wurde der amerikanische Standard-Montmorillonit Nr.25 aus Upton, Wyoming benutzt und zwar die Fraktion $< 2\mu$. Die wichtigsten Kenndaten sind in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Tonsuspensionen*

Austauschbares Kation	Ca	Na
Konzentration des Tones in g/100ml	4,22	5
Ca, bei der AK-Bestimmung von den Austauscherstellen freigesetzt (m val/100g)	89	7
Na, bei der AK-Bestimmung von den Austauscherstellen freigesetzt (m val/100g)	-	98
pH der wäßrigen Suspensions- lösung	6,95	7,0

 Die Austauschkapazität wurde nach der Methode von LEWIS (A.P.I. Project 49, 1951) bestimmt.

Ca-Montmorillonit:

Der Ca-Montmorillonit wurde in der Weise hergestellt, daß der Ton mit einer 1 M CaCl₂-Lösung versetzt und anschließend so lange mit H₂O dest. gewaschen wurde, bis kein Chlorid in der überstehenden Lösung mehr nachgewiesen werden konnte.

Na-Montmorillonit:

Der Na-Ton wurde mit einer 1N NaCl-Lösung versetzt und anschließend mit H₂O dest. so lange gewaschen, bis kein Chlorid mehr in der überstehenden Lösung nachgewiesen werden konnte. Die Austauschkapazität des Montmorillonits Wyoming Nr.25 wird von LEWIS (1951) mit 95 m val/100 g Ton angegeben.

2.3 Herkunft der Aminosäuren

Monomere der L- und D-Aminosäuren: E. Merck, Deutschland ¹⁴C-L-Leucin: Amersham-Buchler, Braunschweig Code: CFA 273 Spezif. Aktivität: 466 µ Ci/mg Aminosäure Di- und Tripeptide des Leucins: Sigma Chemical Company St.Louis, MO, USA L-alanyl-glycin, D-alanyl-glycin: "

Die optische Reinheit der D-Aminosäuren D-Leucin und D-Lysin wurde mit dem Enzym D-Aminosäure-Oxidase überprüft und Übereinstimmung mit den Angaben der Hersteller festgestellt. Die optische Reinheit der D-Glutaminsäure wurde nicht überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen

3.1.1 Sorptionsversuche mit D-und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit bei pH-Werten zwischen pH 7,0 und 7,5

Die Ergebnisse der Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Caund Na-Montmorillonit in dest. Wasser sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß bis auf den Ca-Montmorillonit bei den niedrigen Gleichgewichtskonzentrationen (0,1 und 0,2 mMol/Liter) keine statistisch gesicherten Unterschiede in der Sorption zwischen D- und L-Leucin gemessen wurden. Bei der Gleichgewichtskonzentration von 0,5 mMol/Liter konnte sowohl bei dem Ca-Montmorillonit als auch bei dem Na-Montmorillonit eine etwas stärkere Sorption des D-Leucins gegenüber dem L-Leucin ermittelt werden.

3.1.2 Sorptionsversuche mit D- und L-Glutaminsäure an Ca- und Na-Montmorillonit

Bei den Sorptionsversuchen mit D- und L-Glutaminsäure sind hinsichtlich der stereospezifischen Sorption uneinheitliche Ergebnisse erzielt worden. Nach Zugabe von 0,2 ml 0,1N HCl ist die Sorption der L-Glutaminsäure am Ca-Ton etwas größer als die der D-Glutaminsäure über den gesamten Bereich von 0,2 - 0,6 mMol/Liter Gleichgewichtskonzentration (Tabelle 4). Werden dagegen unter sonst gleichen Bedingungen 0,5 ml 0,1N HCl dem System hinzugefügt, dann ist lediglich bei der D-Glutaminsäure im Bereich von 0,2 - 0,3 mMol/Liter Gleichgewichtskonzentration eine nennenswerte Sorption festzustellen. Die L-Glutaminsäure wird unter diesen Bedingungen gar nicht sorbiert.

Vom Na-Montmorillonit wird bei pH-Werten um 4,0 (siehe untere Hälfte der Tabelle 4) weder die D- noch die L-Glutaminsäure sorbiert. Erst bei pH-Werten von 2,1 ist für beide Stereoisomeren der Glutaminsäure eine deutliche Sorption festzustellen. Von der D-Glutaminsäure wurden 330 Nanomol, von der L-Glutaminsäure 295 Nanomol pro 100 mg Ton sorbiert.

Tab.: 3 Angaben zur stereospezifischen. Sorption von D- und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit in destilliertem Wasser bei unterschiedlicher Gleichgewichtskonzentration (jede Angabe entspricht einem Mittelwert aus fünffacher Wiederholung, Gesamtvolumen: 10 ml)

Versuch Kr., Aminosäure		Gleichgewichts- konzent ration der Aminosäure [m Kol/Liter]	ng Ton insgesamt pro Gefäß	pH am Ende des Versuches	n Mole Aminosäure sorbiert pro 100 mg Ton	d (001) Abstand	△ Wert * a (001) - 9,5 [A]
				Ca - Montmorillon	it		
Ur.17a	D - Leucin	0.1	100	7.10	Sp.	-	_
	р – тезсти	0.1	100		8 6		
No. 10	D - Leucin	0.2	100	7.11		· · · ·	· _ /
NT.16	L - Leucin	0.2	100	1 2	104	_	
Nr. 34	D - Leucin	0.5	350	7.76	4 6	13.18	3.68
	L - Leucin	0.5	350	7.93	2 7	13.38	3.88
		-	100	6.95	- `	14.24	4.74
				Na - Montmorilloni	Lt		
1. 1. 1. 1.	D - Leucin	0.2	80	8.33	131	12.99	3.49
MF. 170	L - Leucin	0.2	8,0	8.45	162	12.66	3.16
N= 30	D - Leucin	0.4	160	7.81	136	13.18	3.68
	L - Leucin	0,4	160	7.93	155	12.98	3.48
"r 32	D - Leucin	0.5	160	7.89	179	12.80	3.30
ar.32	L - Leucin	0.5	160	7.90	114	13.38	3.88
Ur.33		-	160	8.50		12.62	3.12

★ Der∆ - Wert errechnet sich aus dem gemessenen d (001) - Abstand vermindert um die Dicke einer Silikatschicht des Montmorillonits (=9.5 Å).

Stereoisomere der Glutamin- säure	Gleichgewichts- konzentration [m Mol/Liter]	Zugabe 0,1 N HCl [ml]	pH am Ende des Versuches	n Mol Glu sorbiert an 100 mg Ton	Gleichgewichts- konzentration [m Mol/Liter]	Zugabe 0,1 M HCl [ml]	pH am Ende des Versuches	n Mol Glu sorbiert an 100 mg Ton
			Ca -	Montmorillonit	11 - C			
	0.2	0.2	4.21	213	0.2	0.5	2.68	373
	0.3	0.2	4.19	132	0.3	0.5	2.69	296
D - Glu	0.4	0.2	3.64	37	0.4	0.5	2.71	67
	0.5	0.2	4.08	240	0.5	0.5	2.71	83
	0.6	0.2	4.08	362	0.6	0.5	2.73	6 2
	0.2	0.2	4.32	282	0.2	0.5	2.72	_
	0.3	0.2	4.30	401	0.3	0.5	2.73	-
L - Glu	0.4	0.2	4.22	456	0.4	0.5	2.72	
. *	0.5	0.2	4.20	548	0.5	0.5	2.27	(2 4 6)?
	0.6	0.2	4.14	614	0.6	0.5	2.77	_
			Na -	Montmorillonit	<i></i>			
D - Glu	0.5	0.75	4.05				AL	
L - Glu	0.5	0.75	4.06			1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1		
D - Glu	0.5	2.00	2.11	-330				1.
L Glu	0.5	2.00	2.10	295				1

Tab.: 4 Sorptionsversuche mit D- und L-Glutaminsäure an Ca- und Na-Montmorillonit.

Versuchsbedingungen beim Ca-Montmorillonit: 5.9 %ige Tonsuspension, Gesamtvolumen: 20 ml, T = 20° C,

Schütteldauer: 22 Stunden, alle Daten jeweils Mittelwerte

aus zwei Wiederholungen.

Versuchsbedingungen beim Na-Montmorillonit: 5ml 4 %ige Tonsuspension, Gesamtvolumen: 10 ml, T = 20° C, Schütteldauer: 6 Stunden, alle Daten jeweils Mittelwerte

aus vier Wiederholungen.

- 85 -

3.1.3 Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca- und Na-Montmorillonit

Die absoluten Mengen an sorbiertem D- oder L- Lysin pro 100 mg Ton sind im Vergleich zu den Stereoisomeren der beiden bi**s**her geprüften Aminosäuren Leucin und Glutaminsäure unter ähnlichen Versuchsbedingungen größer, weil es sich um eine basische Aminosäure handelt, deren isoelektrischer Punkt bei pH = 9,74 liegt und die dadurch unter den Versuchsbedingungen als stärker dissoziiertes Kation vorliegt (siehe Tabellen 5 und 6).

In der Tabelle 5 sind die Daten der Sorptionsversuche von D- und L-Lysin ohne Zugabe von 0,1N HCl (Vers. Nr.8) und nach Zugabe von 0,2 ml 0,1N HCl (Vers. Nr.11) an Ca-Montmorillonit aufgeführt. Während bei Versuch Nr.8 die Unterschiede in der Sorption zwischen D- und L-Lysin gering sind, treten diese in Versuch Nr.11 bei pH-Werten zwischen 4,6 und 6,2 deutlicher hervor. In dem Bereich der Gleichgewichtskonzentration von 0,1 bis 0,3 m Mol/Liter (siehe Versuch Nr.11) ist demnach ein linearer Anstieg der Sorption zu verzeichnen, wobei die sorbierten Mengen des L-Lysins im Vergleich zum D-Lysin jeweils erheblich größer sind.

Wenn hingegen der pH-Bereich durch Zugabe von 0,5 ml 0,1N HCl auf ca. pH 2,7 - 2,8 herabgesetzt wird, nimmt die unterschiedliche stereospezifische Sorption des L-Lysins gegenüber dem D-Lysin offensichtlich mit zunehmender Gleichgewichtskonzentration am Ca-Montmorillonit ab.(Siehe Tabelle 6, Vers. Nr.13).

Diese Tendenz wird bei ähnlichen pH-Werten wie im Versuch Nr.11, aber bei höherer Gleichgewichtskonzentration im Versuch Nr.36a bestätigt, wo die Unterschiede zwischen den sorbierten Mengen an D-Lysin und L-Lysin nur noch gering sind.

Der Na-Montmorillonit sorbiert bei einer Gleichgewichtskonzentration von 0,5 m Mol/Liter und einem pH-Wert von 5,8 mehr D-Lysin als L-Lysin (siehe Vers. Nr.39a, "abelle 6). Bei pH-Werten um 5,0 (siehe Vers. Nr.39b) sind diese Unterschiede in der Sorption nicht mehr vorhanden, es deutet sich vielmehr eine stärkere Sorption des L-Lysins an.

		15	Versuch Nr.	8			Vers	uch Nr. 11		
Stereoisomere deš Lysins	Gleichge- wichts- konzem- tion [m Mol/~ Liter]	d(001)- Abstände [Å]	△-Werte	pH am Ende des Versuches	p Mole Lys sorbiert an 100 mg Ton	Gleichge- wichts- konzen- tration m Mol/ Liter]	d(001)- Abstände [Å]	△ -Werte	pH am Ende des Versuches	p Kole Lys sorbiert an 100 mg Ton
	0.05	14.95	5.45	7.09	0.467	0.1	15.08	5.58	4.55	(0.061)
	0.10	14.95	5.45	7.4.4	0.735	0.15	_	·	5.25	0.545
D - Lysin	0.15	14.95	5.45	7.46	0.888	0.2	_	_	4.90	0.962
•	0.20	14.86	5.36	7.49	1.176	0.25	_	_	5.46	1.200
	0.25	14.86	5.36	7.09	1.876	0.3	15.17	5.67	4.95	2.017
	0.05	14.86	5.36	7.30	0.400	0.1	15.39	5.89	4.83	0.539
	0.10	14.86	5.36	7.22	0.837	0.15	-	_	5.59	0.952
L - Lysin	0.15	14.73	5.23	7.30	1.149	0.2	-	—	5.58	1.515
	0.20	-	-	7.42	1.444	0.2	-		5.30	1.867
*	0.25	14.73	5.23	7.30	2.010	0.3	15.39	5.89	6.20	2.223
	<u>Versuchsbed</u>	lingungen: 2 Ge Sc	ml 5,9 %ige : samtvolumen: hütteldauer:	Tonsuspension 20 ml, T = 2 4 Stunden, a	0°C lle Daten	Versuchs	bedingungen:	2 ml 5,9 %ig 0,2 ml 0,1 N Gesamtvolume	e Tonsuspens: HCl, n: 20 ml, T =	ion, = 20 ⁰ C

Tab.: 5 . Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca-Montmorillonit

1 87

Wiederholungen.

1. 24 Daten jeweils Mittelwerte aus zwei Wiederholungen.

Tab.: 6

Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca- und Na-Montmorillonit.

Versuch Stereois Lysins	Nr., somere des	Gleichge- wichtskonzen- tration [m Mol/Liter]	d(001)- Abstand	△ -Werte	pH am Ende des Versuches	μ Mole Lysin adsorbiert an 100 mg Ton	∀ersuchsbedingungen:
	1			Ca - Montmorillo	nit		1
		0.2	_	-	2.72	0.94	1
		0.3	-	· · ·	2.76	1.77	2 ml 5.9 %ige Tonsuspension,
D -	- Lysin	0.4	-	_	2.77	2.50	Gesamtvolumen: 10 ml.
		0.5	-		2.77	3.04	$T = 20^{\circ} C$,
Vers.13-		0.6	-	-	2.80	3.65	Schütteldauer: 23 Stunden,
		0.2	-	· _	2.74	1.33	jeweils fünffache Wiederholung
		0.3	-	-	2.73	1.95	a
L-	- Lysin	0.4	· -	-	2.7.5	2.52	
		· 0 . 5	-	-	2.79	3.12	
		0.6	_	-	2.87	3.61	J •• ••
Vers.36a	D-Lysin	0.5	14.35	4.85	5.01	0.94	7.0 ml 4.2 %ige Tonsuspension,
	L-Lysin	0.5	14.35	4.95	4.98	0.99	0.5 ml 0.1 N HCl,
Vers 36h	D-Lysin	0.25	13.58	4.08.	4.75	0.47	Schütteldauer: 17 Stunden,
	L-Lysin	0.25	14.24	4.74	5.07	0.52	jeweils dreifache Wiederholung
÷			N	a - Montmorillo	nit .		
Vere 30a	D-Lysin	0.5	12.62	3.12	5.88	0.87	5 ml 4.5 %ige Tonsuspension,
	L-Lysin	0.5	12.62	3.12	5.82	0.79	T = 20° C, Schütteldauer: 6 Stunden, bei Vers. 39a: . 0.5 ml 0.1 m WGl
Vers.39b	D-Lysin	0.5	12.40	2.90	4.99	07 6	5-fache Wiederholung
	L-Lysin	0.5	12.62	3.12	5.03	0.77	bei Vers. 39b: + 0.6 ml 0.1 N HCl 2-fache Wiederholung

- 88 -

3.2.1 Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit

Da zu erwarten ist, daß kaum eine bedeutende Sorption der Aminosäure als Kation bei pH-Werten erfolgt, die oberhalb des isoelektrischen Punktes des Leucins (pI = 5,98, nach MEISTER, 1965) und in der Nähe des pK-Wertes der Aminogruppe des Leucins (pK = 9,60) liegen, wurde entschieden, den pH-Bereich im Sorptionsgefäß durch Zugabe von 0,1N HCl unmittelbar vor Versuchsbeginn herabzusetzen.

In weiteren Sorptionsversuchen, die bereits an anderer Stelle publiziert worden sind, (ALDAG, 1975) hatte sich ferner herausgestellt, daß die größten Unterschiede hinsichtlich der stereospezifischen Sorption zwischen D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit erzielt wurden, wenn durch Zugabe von 0,5 ml 0,1N HCl der pH-Wert zu Beginn des Schüttelversuches auf ca. pH = 3,5 herabgesetzt wurde.

Um diese Ergebnisse noch besser abzusichern, sind die Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit unter sehr sorgfältiger Einhaltung aller Randbedingungen noch einmal wiederholt worden. Darüber hinaus wurde neben der Messung der pH-Werte in den abzentrifugierten Schüttellösungen am Ende der Sorptionsversuche auch die Na-Ionen-Konzentration darin bestimmt, um über die Sorptions- bzw. Austauschreaktionen genauere Aussagen treffen zu können.

Alle Messungen wurden fünffach wiederholt.

In den Tabellen 7 und 8 sind die Ergebnisse dieser Sorptionsversuche zusammengefaßt.

Aus den Daten geht eindeutig hervor, daß unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen das L-Leucin vom Na-Montmorillonit offensichtlich im Vergleich zum D-Leucin bevorzugt sorbiert worden ist. Die statistische Verrechnung hat ferner ergeben, daß der Unterschied in der Sorption in allen Fällen bei der Grenzdifferenz von 1 % hochsignifikant abgesichert ist (siehe Tabelle 8). Tabelle 7: Angaben zur Sorption des D- und L-Leucins an Na-Montmorillonit bei verschiedenen Gleichgewichtskonzentrationen (Alle Angaben in µ Mol/100 mg Ton)

Aminosäure	Gleichgewichts- Konzentration (mMol/L)					0	8 1	Mittel- wert
D- Leucin	0.2	0.081	0.023	0.045	0.017	0.011	-	0.035
	0.3	0.289	0.219	0.233	0.229	0.273		0.248
	0.4	0.287	0.284	0.373	0.329	0.302		0.315
	0.5	0.523	0.353	0.403	0.558	0.525		0.473
	0.6	0.411	0.736	0.634	0.465	0.476		0.544
	0.7	0.706	0.632	0.680	0.639	0.576		0.647
	1.0	0.721	0.687	0.649	-	-		0.686
L- Leucin	0.2	0.158	0.196	0.182	0.249	0.206		0.198
	0.3	0.383	0.329	0.491	0.380	0.296	0.400	0.379
	0.4	0.835	1.123	1.165	1.123	1.085		1.066
	0.5	0.944	1.245	0.916	1.279	1.287		1.134
	0.6	0.995	0.976	1.376	1.388	1.240	1.250	1.204
	0.7	0.950	1.200	1.292	1.375	1.315		1.226
	1.0	1.309	1.249	1.217	-			1.258

Tabelle 8: Angaben zur stereospezifischen Sorption von D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit (Gesamtvolumen: 10 ml, 200 mg Ton und 0,5 ml 0,1N HCl pro Schüttelgefäß),GD_{5%}= *, GD_{1%} = **

Versuchs-Nr. Stereoisomere des Leucins		Gleich- gewichts- konzentra- tion (µg/ml)	pH am Ende des Versuchs	Hg As sorbiert pro 1g Ton	d(001)-Ab- stand (R)	∆- Wert (Grenzdif- ferenz bei 1% (ug As pro 1 g Ton)	Signifikanz zwischen D- und L- Isomere
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
[D-Leu	26.2	3.25	45.9	12.26	2.76	96 E	**
41	L-Leu	20.2	3.35	259.4	12.44	2.94	00.9	~ ~
4.2	D-Leu	39.3	3.20	324.9	12.26	2.76	112 6	**
42	L-Leu	29.2	3.38	496.5	(11.93)	(2.43)	112.0	
1.7	D-Leu	52.4	3.30	412.7	12.09	2.59	260.9	**
49	L-Leu	92,4	3.39	1396.5	12.09	(2.43)	209.0	~~
1.1.	D-Leu	65 5	3.30	619.6	12.09	2.59	407 4	**
44	L-Leu	0,.)	3.40	1485.5	12.26	2.76	407.4	
45	D-Leu	78 6	3.27	712.6	12.09	2.59	416 6	**
47	L-Leu	10.0	3.37	1577.2	(11.93)	(2.43)	410.0	
46	D-Leu	01 7	3.26	847.6	12.09	2.59	3/11 0	**
40	L-Leu	51.1	3.36	1606.1	12.30	2.80	J+1•9	
47	D-Leu	131 0	5 10 T	898.7	-	-		
47	L-Leu	131.0		1647.9	-	-		

- 91

ı

3.2.2 Messung der stereospezifischen Sorption der in einem Racemat vorliegenden stereoisomeren Aminosäuren, dargestellt an der Sorption von D, C¹⁴-L-Leucin an Na-Montmorillonit

Bisher war die stereospezifische Sorption zweier stereoisomerer Aminosäuren durch Vergleich in Parallel- Versuchen unter absolut identischen Versuchsbedingungen ermittelt worden, wobei jeweils nur <u>eine</u> Stereoisomere mit dem Ton in Kontakt gebracht wurde. Damit ist zunächst noch nicht der Beweis erbracht, daß die <u>beiden</u> optischen Antipoden genau das gleiche stereospezifische Sorptionsverhalten zeigen, wenn sie von Beginn an <u>zusammen</u> als Racemat in der Gleichgewichtslösung vorliegen.

Aufgrund der Ergebnisse zum Vorkommen von D-Aminosäuren in Böden, die im Teil I dieser Arbeit mitgeteilt werden,müssen wir davon ausgehen, daß die Aminosäuren im Boden in Proteinen und Peptiden gebunden vorliegen, die sowohl aus proteinogenen L-Isomeren als auch aus nichtproteinogenen D-Isomeren aufgebaut sind. Nach erfolgtem Hydrolyse-Aufschluß finden wir im Boden-Hydrolysat racemische Gemische von Aminosäuren vor, die betreffs der Zugehörigkeit zur proteinogenen L-Reihe oder zur nichtproteinogenen D-Reihe unterschiedlich zusammengesetzt sind.

Um in Zukunft möglichst solche "bodenähnlichen" Verhältnisse an Hand von Modellversuchen nachahmen und untersuchen zu können, wurde ein neuer methodischer Ansatz entwickelt, der das unterschiedliche stereospezifische Sorptionsverhalten zweier in einem Racemat vorliegenden optischen Antipoden von Aminosäuren zu bestimmen erlaubt. Diese Methode soll hier beschrieben und an Hand von ersten experimentellen Ergebnissen erläutert werden.

Diese Versuche wurden ausschließlich mit den Isomeren des Leucins durchgeführt.Die Versuchsanordnung die im Abschnitt 2.1 näher beschrieben wurde, ändert sich nicht. Lediglich die verwendeten Leucinlösungen unterscheiden sich von den bisher benutzten dadurch, daß in dem künstlich hergestellten Racemat nur das L-Leucin als C¹⁴-markierte Verbindung vorliegt. Ein Sorptionsversuch, in dem die stereospezifische Sorption der in dem Racemat vorliegenden Stereoisomeren D-Leucin und C¹⁴-L-Leucin untersucht werden soll, setzt sich aus zwei Testreihen zusammen.

In der <u>Testreihe I</u> wird die Sorption von C¹⁴-L-Leucin allein an Na-Montmorillonit bestimmt.

Die Ermittlung der Sorptionsmenge des C¹⁴-L-Leucins kann nun mit Hilfe unserer apparativen Ausrüstung (Aminosäure-Analysator und angeschlossener Flüssigszintillationszähler zum Messen von C¹⁴-Zerfällen im Durchflußverfahren, siehe auch Abschnitt 3.1.2 im Teil I dieser Arbeit) in zweifacher Hinsicht erfolgen;

- Die erste Auswertung besteht wie bisher darin, daß die Menge der insgesamt sorbierten Aminosäure über die Ninhydrinreaktion im Vergleich zu einem in der Testserie mitgeschüttelten Standard (ohne Ton) am Ende des Versuches ermittelt wird.
- 2) Die zweite Auswertung erfolgt bei der C¹⁴-markierten Aminesäure mit dem Flüssigszintillationszähler über die Registrierung der C¹⁴-Zerfälle ebenfalls im Vergleich zu dem in der Testserie mitgeschüttelten Standard (ohne Ton) am Ende des Sorptionsversuches. (Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen, daß diese doppelte Registrierung und Auswertung an der gleichen Probe in einem Arbeitsgang erfolgt).

In der <u>Testreihe II</u> ermittelt man die Sorption des künstlich hergestellten Racemats von D, C¹⁴-L-Leucin bei gleicher Gleichgewichtskonzentration wie in der Testreihe I.

Im Falle des zur Sorption eingesetzten reinen Racemats D, C^{14} -L-Leucin kann die stereospezifische Sorption des C^{14} -L-Leucins nun allein mit dem Flüssigszintillationszähler bestimmt werden, während die "Gesamt"-Sorption des Racemats zugleich über die Ninhydrinreaktion am Aminosäure-Analysator ermittelt wird. Durch Differenzrechnung der Gesamt-Sorptionsmenge D, C^{14} -L-Leucin zur spezifischen Sorptionsmenge C 14 -L-Leucin kann dann bestimmt werden, wie groß der prozentuale Anteil des C^{14} -L-Leucins und

- 93 -

des D-Leucins an der Gesamt-Sorptionsmenge D, C¹⁴-L-Leucin ist.

Die oben beschriebene Testreihe I kann für derartige Untersuchungen auch wegfallen. Sie wurde aber in das Programm mit aufgenommen, um gleichzeitig einen Methodenvergleich zwischen der Registrierung der C¹⁴-Aminosäure über die C¹⁴-Zerfälle und der Quantifizierung der gleichen C¹⁴-Aminosäure über die Ninhydrinreaktion anstellen zu können.

In der Tabelle 9 sind die Ergebnisse mehrerer solcher Methodenvergleiche zusammengestellt.

Die Auswertung zeigt in Tabelle 9, daß im allgemeinen eine sehr gute Übereinstimmung der nach unterschiedlichen Methoden gewonnenen Werte erreicht wird (siehe Versuche Nr.26, 27 und 30). Größere Abweichungen, wie sie bei Versuch Nr.28 festgestellt wurden, rechtfertigen eine Wiederholung des Versuches.

In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse aufgeführt, die nun die stereospezifische Sorption des C¹⁴-L-Leucins, das zu Beginn des Versuchs mit dem D-Leucin zu gleichen Molanteilen als Racemat vorgelegen hat, an Na-Montmorillonit demonstrieren.

Die Versuche Nr. 28, 26 und 17 sind in der Tabelle 10 nach steigender Gleichgewichtskonzentration angeordnet. In der Spalte 3 sind die absoluten Mengen an Leucin angegeben, die unter den vorgegebenen Bedingungen von 100 mg Ton sorbiert worden sind. In der Spalte 5 sind die relativen Anteile des C^{14} -L-Leucins von der insgesamt sorbierten Menge an D. C^{14} -L-Leucin berechnet.

Wenn man einmal die Gleichgewichtskonzentration 0,25 m Mol/Liter (Vers. Nr.28) unberücksichtigt läßt, dann werden bei Versuch Nr.26 84 % und bei Versuch Nr.27 74 % des insgesamt sorbierten D, C¹⁴-L-Leucins vom C¹⁴-L-Leucin gestellt. Damit ist mit Hilfe der hier vorgestellten Methode einwandfrei nachgewiesen, daß die bevorzugte stereospezifische Sorption des L-Leucins gegenüber dem D-Leucin unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch stattfindet, wenn beide Stereoisomere zu gleichen Molanteilen als Racemat in der Tabelle 9: Sorptionsversuche mit C¹⁴-L-Leucin an Na-Montmorillonit. Vergleich der Werte des Aminosäure-Analysators mit denen des Flüssigszintillationszählers an der gleichen Probe in einem Arbeitsgang *

Versuch Nr.	Gleichgewichts- konzentration (m Mol/Liter)	pH am Ende des Versuches	C ¹⁴ -Zerfälle pro ml Tonsus- pension (cpm)	n Mole C ¹⁴ - sorbiert pr (Ninhydrin- methode)	L-Leucin to 100 mg Ton (Methode C ¹⁴ -Mesung)	Differenz von (5b) zu (5a) in % von (5a)
Spalte (1)	(2)	(3)	(4)	(5a)	(5b)	(6)
28	0,25	3,70	4,74 x 10 ⁵	97	75 .	- 22,6
26	0,5	3,76	9,48 x 10 ⁵	719	709	- 1,4
30	0,6	3,95	11,4 x 10 ⁵	255	248	- 2,8
31	0,7	3,68	13,27 x 10 ⁵	513	583	+ 13,6
27	1,0	3,88	18,96 x 10 ⁵	691	707	+ 2,3

* Versuchsbedingungen: 4 ml 4% ige Tonsuspension, Gesamtvolumen 10 ml; $T = 20^{\circ}C$, Schütteldauer: 6 Stunden.

Alle Daten jeweils Mittelwerte aus vierfacher Wiederholung, außer bei Versuchen Nr. 30 und 31 Mittelwerte aus zweifacher Wiederholung. - 95

л Г Tab.: 10

'Sorptionsversuche mit ¹⁴C-L-Leucin und mit D, ¹⁴C-L-Leucin an Na-Montmorillonit. Bestimmung der **st**ereospezifischen

Sorption der im Racemat vorhandenen Isomeren ¹⁴C-L-Leucin und D-Leucin #

Versuch Nr., Testreihe		Gleichgewi [m M D, ¹⁴ C-L-Leu	chtskonzent: Nol / Liter] ¹⁴ C-L-Leu	D-Leu	Nanomole 100 mg Na D, ¹⁴ C-L-Leu (Ninhydrin Methode)	Leucin so: - Montmori: ¹⁴ C-L-Leu (Ninhydrin Methode)	llonit # # ¹⁴ C-L-Leu (Methode ¹⁴ C-Messung	D-Leu [Differenz)(3a)-(3c)]	Differenz von (3c) zu (3b) in % von (3b) [%]	¹⁴ C-L-Leu sorbiert in % von D, ¹⁴ C-L- Leu [(3c)in % von (3a)]	D-Leu sorbiert in % von D, ¹⁴ C-L-Leu [(3d) in % von (3a)]
Spalte	(1)	· · · ·	(2)		•	(3)		(4))	(5)	(6)
		(2a)	(2Ъ)	(2c)	(3a)	(3b)	(30)	(3ª)			
28	Testreihe I		0.25			97	75		-22.6		
	Testreihe II	0.25	(0.125)	(0 . 125)	99		59	4 0		5966	40.4
26	Testreihe I		0.5			719	709	1 0	- 1.4		
	Testreihe II	0.5	((0.25)	′(0 . 2 5)	8177		687	130		84.1	15.9
27	Testreihe I		1.0			691	70,7	(-16)	+ 2.3		
	Testreihe II	1.0	(0.5)	(0.5)	602		445	157		73.9	26.1

- 96 -

Versuchsbedingungen: 4 ml 4 %ige Tonsuspension, Gesamtvolumen: 10 ml, T = 20°C, Schütteldauer: 6 Stunden

🗱 🕷 Alle Daten jeweils Mittelwerte aus vierfacher Wiederholung.

Gleichgewichtslösung vorliegen.

3.2.3 Sorptionsversuche mit den diastereoisomeren Dipeptiden des Leucins sowie den Dipeptiden L-alanyl-glycin und Dalanyl-glycin an Na-Montmorillonit

Aufgrund bereits mitgeteilter Ergebnisse zum Sorptionsverhalten der diastereoisomeren Dipeptide des Leucins (ALDAG, 1975) sollte hier unter Berücksichtigung zahlreicherer Wiederholungen überprüft werden, ob sich die dort gemachten Beobachtungen bestätigen lassen.

Diese Untersuchungen wurden jeweils nur bei der Gleichgewichtskonzentration von 0,5 und 1,0 m Mol Dipeptid/Liter und unter Zugabe von 0,5 ml 0,1N HCl durchgeführt. Jedes Versuchsglied wurde fünffach wiederholt. Die entsprechenden Einzeldaten sind in den Tabellen 11 und 12 angegeben.

Die errechneten Mittelwerte, die Daten der Röntgenbeugung und die pH-Werte sind in der Tabelle 13 zusammengefaßt. Aus den Tabellen 11 und 13 geht eindeutig hervor, daß offensichtlich die Sorption der betreffenden stereoisomeren Dipeptide von deren Konfiguration bestimmt wird.

Der besseren Übersicht halber sind die Angaben zur Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgliedern in der Tabelle 14 zusammengefaßt.

Daraus ist zu ersehen, daß beispielsweise das Dipeptid L-Leucyl-L-Leucin bei einer Grenzdifferenz von 1 % sich durch eine stärkere Sorption von den Dipeptiden L-Leucyl-D-Leucin und D-Leucyl-L-Leucin im Konzentrationsbereich 1,0 m Mol/Liter unterscheidet. Bei der Gleichgewichtskonzentration 0,5 m Mol/Liter ist dieser Unterschied noch bei einer Grenzdifferenz von 5 % gesichert.

Hingegen bestehen keine gesicherten Unterschiede in der Sorption zwischen den beiden Dipeptiden L-Leucyl-L-Leucin und D-Leucyl-D-Leucin, also jenen Dipeptiden, die jeweils nur von einer Stereoisomere des Leucins aufgebaut sind. Tabelle 11: Angaben zur Sorption der diastereoisomeren Dipeptide des Leucins sowie der Dipeptide L-alanyl-glycin und D-alanyl-glycin an Na-Montmorillonit (Volumen: 10 ml, 200 mg Ton pro Gefäß;0,5 ml 0,1N HCl, Gleichgewichtskonzentration: 0,5 m Mol Peptid/Liter; alle Angaben in µMol sorbiertes Peptid pro 100 mg Ton)

L-Leucyl- L-Leucin	L-Leucyl- D-Leucin	D-Leucyl- L-Leucin	D-Leucyl- D-Leucin	L-alanyl- glycin	D-alanyl- glycin
1.33	0.83	0.14	1.18	1.39	1.46
1.28	0.84	0.23	1.23	1.45	1.35
1.23	0.93	0.23	1.17	1.35	1.38
1.17	0.85	0.16	1.03	1.30	1.43
1.28	0.89	0.16	1.10		1.36
		0.21	1.16		

- 86 -

Tabelle 12: Angaben zur Sorption der diastereoisomeren Dipeptide des Leucins sowie der Dipeptide L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl-Glycin an Na-Montmorillonit.

(Volumen: 10 ml, 200 mg Ton pro Gefäß, 0,5 ml 0,1N HCl; Gleichgewichtskonzentration: 1,0 m Mol/Liter; alle Angaben in µ Mol sorbiertes Peptid pro 100 mg Ton)

L-Leucyl- L-Leucin	L-Leucyl- D-Leucin	D-Leucyl- L-Leucin	D-Leucyl- D-Leucin	L-Alanyl- Glycin	D-Alanyl- Glycin
2.65	1.93	0.61	2.41	2.64	2.68
2.53	1.78	0.37	2.36	2.47	2.75
2.33	1.74	0.46	1.64	2.27	2.62
2.28	1.89	0.27	2.26	2.35	2.55
2.24	1.75	0.57	2.21	2.40	2.52
			2.32		

- 99

Tabelle 13: Angaben zur Sorption der diastereoisomeren Dipeptide des Leucins sowie der Dipeptide L-alanyl-glycin und D-alanyl-glycin an Na-Montmorillonit. (Gesamtvolumen: 10 ml. 200 mg Ton und 0.5 ml 0.1N HCl pro Gefäß; alle Angaben zur Sorption Mittelwerte aus fünf- bzw. sechsfacher Wiederholung)

Peptid	Gleich- gewichts- konzentration (m Mol/L)	pH am Ende des Versuchs	A Mol Peptid sorbiert pro 100 mg Ton	ug Na/ml in der Aus- tauscher- lösung	d(001)- Abstand (Å)	∆- Wert (🎗)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
L-Leucyl-	0.5	3.62	1.26	551	12.8	2.68
L-Leucin	1.0	3.68	2.41	562	12.26	2.76
L-Leucyl-	0.5	3.53	0.87	574	12.26	2.76
D-Leucin	1.0	3.61	1.82	572	12.09	2.59
D-Leucyl-	0.5	3.52	0.19	568	12.09	2.59
L-Leucin	1.0	3.58	0.46	571	12.267	2.76
D-Leucyl– D-Leucin	0.5 1.0	3.62 3.69	1.15 2.20	555 560	12.44- 12.09 12.44- 12.09	2.94- 2.59 2.94- 2.59
L-Alanyl-	0.5	3.46	1.37	547	12.09	2.59
Glycin	1.0	3.54	2.43	540	12.26	2.76
D-Alanyl-	0.5	3.46	1.40	540	12.26	2.76
Glycin	1.0	3.53	2.62	540	12.26	2.76

I. 100 1

Tabelle 14: Angaben zur Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsvarianten in der Sorption an Na-Montmorillonit bei den Gleichgewichtskonzentrationen 0,5 und 1,0 m Mol/Liter; alle Angaben in µ Mol sorbiertes Peptid pro 100 mg Ton)

Gleichgewichts- konzentration	L-Leu- L-Leu	L-Leu- D-Leu	D-Leu- L-Leu	D-Leu- D-Leu	Grenzdif 5 %	ferenzen 1 %
0.5 1.0	1.26 2.41	0.87* 1.82**	0.19** 0.46**	1.15 2.20	0.317 0.263	0.437 0.363
	L-Ala- gly	D-Ala- gly			5 %	1 %
0.5 1.0	1.37 2.43	1.40 2.62			0.098 0.174	0.149 0.253

- 101 -

Ferner ist zu vermerken, daß auch zwischen den beiden Dipeptiden L-Leucyl-D-Leucin und D-Leucyl-L-Leucin signifikante Unterschiede in der Sorption bei der GD = 1 % bestehen.

Zwischen den beiden Dipeptiden L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl-Glycin konnten keine gesicherten Unterschiede in der Sorption an Na-Montmorillonit festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Anmerkungen

Da die neutralen Aminosäuren sowohl eine saure wie eine basische funktionelle Gruppe im Molekül besitzen, können sie je nach den pH-Werten des Reaktionsmediums als Kationen, Zwitterionen oder Anionen reagieren. Bei den sauren und basischen Aminosäuren verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht entsprechend stärker in den sauren oder basischen Bereich. Demzufolge kann eine Monoamino-Monocarboxy-Aminosäure folgende Grenzformen annehmen:

$$\begin{array}{c} R & - \stackrel{H}{\underset{c}{\text{c}}} - \text{ cooh} \xrightarrow{K_1} R & - \stackrel{H}{\underset{c}{\text{c}}} - \text{ coo}^{\Theta} \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} R & - \stackrel{H}{\underset{c}{\text{c}}} - \text{ coo}^{\Theta} \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} R & - \stackrel{H}{\underset{c}{\text{c}}} - \text{ coo}^{\Theta} \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} R \xrightarrow{K_2} R \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} R \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2} R \xrightarrow{K_2} \xrightarrow{K_2}$$

(saure Bedingungen) (nahezu neutrale (basische Bedingungen) Bedingungen)

Daraus geht hervor, daß eine nennenswerte Sorption zwischen einer in der Regel negativ geladenen Oberfläche eines Tonminerals und der Aminosäure nur dann eintritt, wenn die Aminosäure als Kation (RH⁺) oder als Zwitterion (RH⁻) vorliegt. Obwohl die pH-Werte der Bodenlösung zahlreicher Böden im Bereich zwischen pH 4,5 - 7,0 schwanken, und alle ackerbaulichen Maßnahmen darauf gerichtet sind, diesen pH-Bereich für einen optimalen Pflanzenertrag zu erhalten, gibt es heute mehrere Hinweise dafür, daß der pH-Wert

- 102 -

in unmittelbarer Nachbarschaft der Tonmineraloberfläche im Boden um einige pH-Einheiten niedriger als in der Bodenlösung liegen kann. Dies tritt besonders dann ein, wenn der Wassergehalt des Bodens etwa den Grenzwert des permanenten Welkepunktes erreicht oder darunter abfällt (MORTLAND, 1968; SCHEFFER-SCHACHTSCHABEL, 1976). So muß damit gerechnet werden, daß im Boden an den Tonmineraloberflächen pH-Werte auftreten, die zumindest die basischen und neutralen Aminosäuren als Kationen an Austausch- und Sorptionsvorgängen teilnehmen lassen.

Zahlreiche Arbeiten in der Literatur haben nun gezeigt (SIESKIND, 1960; CLOOS et al., 1966; McLAREN et al., 1958; GILES et al., 1960; GREENLAND et al., 1962, 1965a, 1965b; RAUSELL-COLOM und SALVADOR, 1971; THENG, 1972, 1974), daß die Sorption von Aminosäuren und Peptiden an Tonmineralen von dem pH-Wert des Reaktionsmediums, von der Basizität und Größe der Aminosäure sowie von der relativen Position der funktionellen Gruppen im Aminosäure-Molekül (Unterschiede zwischen d-, β -, und γ -Aminobuttersäure z.B.) beeinflußt wird. Ferner spielt auch der Typ des Kations, mit dem die Austauscherstellen des Tonminerals belegt sind, bei der Sorption eine Rolle. Diese Faktoren sind maßgeblich daran beteiligt, ob die Sorption von Aminosäuren hauptsächlich von physikalischen Bindungskräften (Van der WAALS – Bindung u.a.) bestimmt wird, oder ob sie durch Kationenaustausch und Protonentransfer zustande kommt.

Außer Arbeiten von DEGENS et al. (1970) und JACKSON (1971), die eine bevorzugte Sorption und Polymerisation von L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin im Vergleich zu den entsprechenden D-Isomeren an der Oberfläche von Kaclinit nachgewiesen haben wollen, ist dem Autor seines Wissens bis heute keine Untersuchung bekannt geworden, in der über eine stereospezifische Sorption von optisch aktiven Aminosäuren an Montmorillonit oder anderen Dreischicht-Silikaten berichtet wird. Lediglich PAECHT-HOROWITZ et al. (1970) und KATCHALSKY (1973) teilten unlängst mit, daß in Gegenwart von Montmorillonit und aktivierten Alanin-Adenosinderivaten Polypeptide des Alanins im wäßrigen Medium und bei ca. 25⁰ Celsius gebildet wurden. Obwohl es nicht besonders erwähnt wurde, muß angenommen werden, daß man die L-Isomere des Alanins in diesen Versuchen eingesetzt hat.

THOMPSON und TSUNASHINA (1973) untersuchten u.a. den oxidativen Abbau der optischen Antipoden des Tyrosins in Gegenwart von Montmorillonit, wobei die Tonoberfläche wahlweise durch Erhitzen oder durch Belegung mit Cu-, Al-, oder Hg-Ionen verändert wurde. Sie kommen zu der Schlußfolgerung, daß weder das D- noch das L-Tyrosin von Montmorillonit stereospezifisch bevorzugt sorbiert wird, daß aber der Montmorillonit den oxidativen Abbau des L-Tyrosins oberhalb pH = 3 schneller einleitet als den des D-Tyrosins.

Diese wenigen Hinweise und unsere bereits in früheren Untersuchungen gemachten Erfahrungen (ALDAG, 1975) waren u.a. der Anlaß dafür, daß man weiter der Frage nachging, ob nicht stereospezifische Sorptionsmechanismen zwischen Tonmineralen und optisch aktiven Aminosäuren oder deren Oligo- und Polypeptiden mit dafür verantwortlich zu machen sind, daß D-Aminosäuren trotz ihres zahlreichen Vorkommens vor allem im Bereich der Mikroflora und -fauna des Bodens nur in geringen Mengen im Boden selbst nachgewiesen werden können.

Unter diesem Aspekt müssen auch die Voruntersuchungen betrachtet werden, die im folgendem Abschnitt nur kurz diskutiert werden sollen.

4.2 Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen dienten vor allem dem Zweck, weitere Randbedingungen zu erforschen, die bei der unterschiedlichen Sorption stereoisomerer Aminosäuren an Tonmineralen von Bedeutung sein können.
4.2.1 Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Ca- und Na-Montmorillonit bei pH-Werten zwischen pH 7,0 und 8,5

Bei dem Sorptionsversuch mit D- und L-Leucin an Ca-Montmorillonit (Nr.34 in Tabelle 3, S. 77) nimmt der d(001)-Abstand im Vergleich zu dem d(001)-Abstand, der an dem in reinem Wasser suspendierten Ton gemessen wurde, ab und zwar um so stärker, je mehr Nanomole Aminosäure pro 100 mg Ton sorbiert wurden. Bei den Sorptionsversuchen mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt (siehe Tabelle 3, S. 77). Im Vergleich zu dem in reinem Wasser suspendierten Ton nehmen die d(001)-Abstände mit zunehmender Sorption der Aminosäure zwar zu, jedoch ist die Erhöhung des d(001)-Abstandes bei dem Ton, der die größere ^Menge Aminosäure sorbiert hat, jeweils kleiner als bei dem Ton, der weniger Nanomole Aminosäure pro 100 mg Ton sorbiert hat.

Die pH-Werte weichen beim Ca-Montmorillonit trotz der Unterschiede in der Sorption zwischen dem D- und dem L-Leucin jeweils am Ende des Versuchs nicht wesentlich voneinander ab. Beim Na-Montmorillonit hingegen geht zumindest bei den niedrigeren Gleichgewichtskonzentrationen mit der größeren Sorption eine leichte Erhöhung des pH-Wertes einher. Die berechneten A-Werte (siehe letzte Spalte in Tabelle 3) zeigen indes an, daß in allen Versuchen die Aufweitung der Schichtpakete geringer ist, als es der minimalen Schichtdicke des Leucinmoleküls entspräche (die minimale Dicke des Leucinmoleküls dürfte etwa 4 - 5 Å betragen). Dieses Phänomen ist auch von anderen Autoren bei Montmorillonit registriert worden (GREENLAND, 1962). Bei Versuchen mit Kalotten-Modellen, in denen man die Oberfläche des Montmorillonits und die entsprechenden Moleküle der Aminosäuren nachbaute, konnte man zeigen, daß die offensichtlich bei der Einlagerung der Aminosäure in den Zwischenschichtraum des Montmorillonits eingetretene Verringerung des Basisabstandes möglich ist, indem die Seitengruppen der Aminosäure in die ditrigonalen Vertiefungen der Silikatoberfläche eintauchen.

Da sich andererseits aber der pH-Wert in der Gleichgewichtslösung am Ende des jeweiligen Sorptionsversuches im Vergleich zu dem der Ausgangslösung nur unwesentlich veränderte und sich eine Erhöhung der Ca- und Na-Werte in der Gleichgewichtslösung am Ende des Versuches ebenfalls nicht nachweisen ließ, muß in Übereinstimmung mit GILES et al. (1960) und GREENLAND et al. (1962) angenommen werden, daß die Stereoisomeren des Leucins unter diesen Bedingungen als Zwitterionen an der äußeren Oberfläche des Tones sorbiert wurden und die Sorption hauptsächlich durch physikalische Bindungskräfte zustande kommt.

4.2.2 Sorptionsversuche mit D- und L-Glutaminsäure an Ca- und Na-Montmorillonit

Diese Versuche sollen hier nicht weiter diskutiert werden (siehe Tabelle 4, Abschnitt 3.1.2), da die Ergebnisse z.T. widersprüchlich sind und für eine eingehende Diskussion umfangreichere Untersuchungen erforderlich wären. Es sei lediglich darauf verwiesen, daß aufgrund der Ergebnisse bei der D- und L-Glutaminsäure auch mit einer stereospezifischen Sorption zu rechnen ist.

Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise während des Schüttelvorganges auch eine Polypeptidbildung eingetreten ist, wie sie von JACKSON (1971) in unterschiedlichem Ausmaß bei den Stereoisomeren der Asparaginsäure in Gegenwart von Kaolinit beobachtet wurde. Dieser Frage wurde im Rahmen dieser Untersuchungen aber nicht weiter nachgegangen.

4.2.3 Sorptionsversuche mit D- und L-Lysin an Ca- und Na-Montmorillonit

Aus der Tabelle 5, S. 80) geht eindeutig hervor, daß unter geeigneten Bedingungen eine unterschiedlich starke Sorption zwischen D- und L-Lysin an Ca-Montmorillonit stattfindet.

Die teilweise geringeren Unterschiede in der Sorption zwischen D- und L-Lysin in Versuch Nr.8 (Tabelle 5) und Versuch Nr.13 (Tabelle 6) im Vergleich zu Versuch Nr.11 (Tabelle 5) dürften auf die unterschiedlichen pH-Werte in der Austauscherlösung zurückzuführen sein. Da der pK_3 -Wert der \mathcal{E} -NH₂-Gruppe des Lysins mit 10,53, der pK_2 -Wert der α -NH₂-Gruppe des Lysins mit 8,95 (MEISTER, 1965) angegeben wird, ist zu erwarten, daß in Versuch Nr.8 (keine Zugabe von 0,1N HCl) im Bereich zwischen pH 7,1 und 7,4 die \mathcal{E} -NH₂-Gruppe stärker als die α -NH₂-Gruppe des Lysins dissoziiert ist. Mithin sind – unabhängig von der Konfiguration – drei unterschiedliche Zwitterionen des Lysins möglich:



Da aber das & -C-Atom des Lysins kein Chiralitätszentrum besitzt, kann unter diesen Bedingungen vom Typ I des Zwitterions allein keine stereospezifische Sorption gesteuert werden, es sei denn, das ganze Lysinmolekül wanderte ausschließlich in die aufweitbaren Zwischenschichten des Montmorillonits ein. Es muß also darauf verwiesen werden, daß bei den Sorptionsvorgängen mit dem D- und L-Lysin je nach dem pH-Wert der Gleichgewichtslösung sich mehrere Sorptionsmechanismen unterschiedlich stark dissoziierter Zwitterionen überlagern können. JANG und CONDRATE (1972) konnten mit Hilfe von Infrarot-Spektren zeigen, daß das Lysin, das an mit H- und Ca-Ionen belegtem Montmorillonit sorbiert worden war, vorwiegend als Zwitterion des Typs III vorlag.

Aus den pH-Werten des Versuches Nr. 11 (Tabelle 5) läßt sich ferner ablesen, daß sich parallel mit der höheren Sorption des L-Lysins im Vergleich zum D-Lysin in der Gleichgewichtslösung am Ende des Schüttelversuches höhere pH-Werte einstellen, was auf einen zunehmenden Protonentransfer und Kationenaustausch schlie-Ben läßt. Neuere Untersuchungen von RAUPACH und JANIK (1976), die die Orientierung und Sorption von Ornithin und 6-Amino-Hexansäure auf der Oberfläche von Vermikulit untersuchten, stützen diese Schlußfolgerung.

4.3 Hauptuntersuchungen

4.3.1 Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit

Die Sorptionsversuche mit D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit sind etwas breiter angelegt worden, weil hier geklärt werden sollte, ob die bereits früher (ALDAG, 1975) festgestellten Unterschiede in der Sorption als reine Kationenaustausch- oder Sorptions-Mechanismen erklärt werden können. Bei der Versuchsanstellung (siehe auch Abschnitt 2.1) wurde bewußt darauf abgehoben, in einem - im Vergleich zu ähnlichen Versuchen anderer Autoren -<u>niedrigeren Konzentrationsbereich</u> zu arbeiten, weil wir mit Hilfe der Aminosäure-Analytik über die Ninhydrinreaktion in einem sehr empfindlichen Bereich (Nanomol-Bereich) arbeiten können.

Dieser Umstand führt zum anderen dazu, daß durch das Einstellen einer relativ niedrigen Gleichgewichtskonzentration der in den Schüttelgefäßen eingesetzten Aminosäure (0,2 - 0,7 m Mol/Liter) zwangsläufig damit zu rechnen ist, daß unabhängig vom Mechanismus der Sorption nur die <u>äußere Oberfläche</u> des eingesetzten Tones an der Sorption beteiligt sein wird, was im folgenden noch zu diskutieren ist.

Zur Klärung der Frage, auf welchem Sorptionsmechanismus die unterschiedlich starke Sorption der beiden Stereoisomeren des Leucins an Na-Montmorillonit zurückgeführt werden kann und welche Flächenbezirke des Tones (äußere oder innere Oberfläche) daran beteiligt sind, bieten sich grundsätzlich drei Ansätze an:

- I Ermittlung der Faktoren K und n aus der FREUNDLICH-Gleichung zur Beschreibung des Sorptionsvorganges,
- II Berechnung des Selektivitätskoeffizienten SK,

III Berechnungen zur Flächenbelegung der äußeren Oberfläche des Tones durch das Aminosäure-Molekül.

Ansatz I: Ermittlung der Faktoren K und n aus der FREUNDLICH-Gleichung zur Beschreibung des Sorptionsvorganges

Die Formel für die FREUNDLICH'sche Sorptionsisotherme lautet bekanntlich:

$$\frac{\mathbf{x}}{\mathbf{m}} = \mathbf{K} \cdot \mathbf{C}^{\frac{1}{\mathbf{m}}} \tag{1}$$

Für unsere Sorptionsuntersuchungen bedeuten:

- x = Sorbat (sorbierte Leucinmenge in µg)
- m = Sorbens (sorbierende Tonmenge in g)
- K = Sorptionskonstante = Verteilungskoeffizient (Verhältnis von sorbierter Leucinmenge zur in Lösung befindlicher Leucinmenge) bei der Gleichgewichtskonzentration 1 (μg/ml)
- C = Gleichgewichtskonzentration (Sorbend μ g/ml)
- n = Materialkonstante.

Nach Transformation durch Logarithmieren erhält die FREUNDLICH-Gleichung folgende Form:

 $\log \frac{x}{m} = \log K + \frac{1}{n} \cdot \log C$ (2)

Diese Gleichung ist dann mit der allgemeinen Regressionsgleichung

$$y = \log A + B \cdot \log x \tag{3}$$

identisch.

Zur Berechnung der Konstanten K und n sind die entsprechenden Werte für log $\frac{x}{m}$ bzw. log C aus der Tabelle 7 (S. 83) für die jeweils 6 pro Na-Ton und Stereoisomere des Leucins ermittelten Gleichgewichtskonzentrationen in ein Programm für einfache lineare Korrelation und Regression eingegeben worden. Dann entspricht das Absolutglied A der Regressionsgleichung (3) dem Wert log K und der Anstieg B dem Wert $\frac{1}{n}$ der FREUNDLICH-Gleichung. Die entsprechenden Isothermen der Sorption von D- und L-Leucin an Na-Montmorillonit sind in der Abbildung 1 dargestellt. Die Abweichung der beiden Sorptionsisothermen für das D- und L-Leucin wird durch die stark differenzierten Werte der Sorptionskonstante K deutlich.

Nach HAMAKER und THOMPSON (1972) gibt der Verteilungskoeffizient K der FREUNDLICH-Gleichung ein Maß für die Stärke der Sorption an, und der Quotient $\frac{1}{n}$ zeigt den Grad der Nichtlinearität zwischen der Konzentration in der Lösung und der Sorption an.

Bei typischen Sorptionsvorgängen, die bei zahlreichen Untersuchungen zur Sorption von Herbiziden z.B. an Böden oder reinen Tonmineralen gemessen wurden, liegen die berechneten K-Werte in der Regel zwischen 1 und 100 und die Angaben für n um den Wert 1 (HAMAKER und THOMPSON, 1972, BÖTTGER, 1977).

Da der K-Wert für das D-Leucin beispielsweise mit 0,34 deutlich kleiner als 1 ist, deutet sich schon an, daß die Sorption für diesen Fall – unabhängig von deren Mechanismus – nur sehr schwacher Natur ist.

Ansatz II: Berechnung des Selektivitätskoeffizienten SK

Das selektive Verhalten eines Austauschers gegenüber einem Ionenpaar A-B läßt sich grundsätzlich am einfachsten durch den empirischen Selektivitätskoeffizienten $(SK_{A/B})$ ausdrücken. Er stellt den Quotienten zwischen dem Verhältnis der sorbierten Kationen (s) am Austauscher und demjenigen in der Außenlösung (a) dar.

$$SK_{A/B} = \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix}_{S} / \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix}_{a}$$
(1)

Wenn der SK-Wert dieses Quotienten größer als 1 ist, dann besagt dies, daß das Kation A im Vergleich zum Kation B bevorzugt sorbiert wird. Liegt der SK-Wert unterhalb 1, so wird das Kation B bevorzugt sorbiert. Ist SK = 1, so werden A und B gleich stark sorbiert. Abb. 1



- 111 -

Die Ursachen für das Selektionsvermögen von Austauschern liegen in den Eigenschaften der Kationen und der Austauscher selbst begründet.

Ein bekanntes Beispiel in der Bodenkunde für eine spezifische Sorption von Kationen ist die auffallend starke Selektivität bestimmter Illit- und Vermikulit-Minerale für K - bzw. NH₄ -Ionen, - ein Phänomen -, das allgemein als K -bzw. NH₄ -Fixierung bezeichnet wird.

Will man in diesen Versuchen den Selektivitäts-Koeffizienten berechnen, so müssen wir die Kenngrößen der beiden Kationen Na⁺ und Leucin⁺ im sorbierten Zustand und in der Lösung messen.

Da bei diesen Sorptionsversuchen in allen Fällen zusätzlich 0,5 ml einer 0,1N HCl-Lösung hinzugegeben wurden, muß zusätzlich der Anteil der Na⁺-Ionen bekannt sein, der gegen Protonen der 0,1N HCl in Abwesenheit des Aminosäure-Kations ausgetauscht wird und in der Lösungsphase mit den sorptiv gebundenen Na⁺-Ionen am Montmorillonit im Gleichgewicht steht.

Die Ergebnisse eines solchen Vorversuches sind in der Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Einfluß steigender Volumina an 0,1N HCl auf den pH-Wert und auf die Freisetzung des Na-Ions in der Gleichgewicht Lösung sowie auf die d(001)-Abstände. (Volumen: 10 ml, 200 mg Na-Montmorillonit, Schüttelzeit 5 Stunden).

Zugabe von O,1N HCl (ml)	pH am Ende des Ver- suches	µg Na/ml in der Lösung am Ende des Versuches	μ Val Na ⁺ pro Ansatz	d(001)- Abstand (Å)	⊿-Wert (Â)
0.2 0.3 0.4	7.0 5.42 4.44 3.87	478 489 495 515	208. 213. 215. 224.	12.09 11.94 12.09 12.09	2.59 2.44 2.59 2.59
0.5	3.53	523	227.	12.09	2.59
0.6 0.7 0.8	3.34 3.16 3.01	532 538 544	231. 234. 237.	12.18 12.44 12.33	2.68 2.94 2.83

Aus der Tabelle 15 geht hervor, daß ohne Zugabe von 0,1N HCl 208 Wal Na⁺-Ionen mit dem Austauscherkomplex im Gleichgewicht stehen und somit auch vom Montmorillonit sorbiert werden können. Dieser Wert liegt etwas höher, als der theoretisch zu berechnende Wert von 196 µ Val Na⁺, der sich für 200 mg Ton lt. Kenndaten aus Tabelle 2, S. 74 ergibt.

Dieser Unterschied könnte dadurch bedingt sein, daß die in allen Versuchen verwendete Tonsuspension nicht exakt 5%ig war oder beim Pipettieren geringfügige Fehler aufgetreten sind.

Aus der Tabelle 15 geht ferner hervor, daß nach Zugabe von 0,5 ml 0,1N HCl 227 μ Val Na⁺, also im Vergleich zum entsprechenden Versuch ohne Zugabe von 0,5 ml 0,1N HCl offensichtlich 19 μ Val Na⁺ gegen Protonen der Salzsäure zusätzlich freigesetzt werden.

Zur Berechnung des Selektivitäts-Koeffizienten zwischen dem Ionenpaar Na⁺ und Leucin⁺ muß korrekterweise der Anteil der Protonen , die aufgrund der Zugabe der 0,5 ml 0,1N HCl zu jedem Sorptionsversuch einen äquivalenten Anteil der Na⁺-Ionen am Austauscher verdrängen, berücksichtigt werden.

Durch die Zugabe von 0,5 ml der 0,1N HCl-Lösung sind jedem Versuchsansatz zusätzlich 50 μ Val Protonen beigegeben worden. Wenn also durch die Zugabe der HCl-Lösung im Vergleich zum entsprechenden Kontrollversuch (keine Zugabe von 0,1N HCl) 19 μ Val Na⁺-Ionen mehr freigesetzt werden (siehe Tabelle 15), dann sind im Austausch dafür 19 μ Val Protonen vom Austauscher sorbiert worden. Mithin können wir im folgenden davon ausgehen, daß ohne Zugabe der Aminosäure am Austauscher pro Schüttelansatz jeweils 208 μ Val Kationen (Summe aus Na⁺-Ionen und Protonen) und in der Lösung 258 μ Val Kationen (Na⁺- und H⁺-Ionen) vorhanden sind.

In der Tabelle 16 sind die entsprechenden µ-Äquivalente für die Stereoisomeren des Leucin-Kations, der Na⁺-Ionen und der Protonen, wie sie in der sorbierten oder in der gelösten Phase des jeweiligen Schüttelansatzes gemessen bzw. berechnet wurden, aufgeführt. Dabei muß betont werden, daß die angegebenen µ-Äquivalente für die Protonen lediglich berechnet sind, und daß sie aufgrund von Befunden aus der Literatur (HELSEN, DRIESKENS und CHAUSSIDON, 1975; KARICKHOFF und BAILEY, 1976) nicht komplett den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen müssen. Die Berechnung des Selektivitäts-Koeffizienten zwischen dem Na⁺-Ion einerseits und dem Leucin-Kation andererseits (siehe Spalte (9) in der Tabelle 16) zeigt, daß bei allen Versuchen bis auf eine Ausnahme beim L-Leucin (Versuch Nr.43) der Selektivitäts-Koeffizient SK größer als 1 ist, also das Na-Ion stärker als das Leucin-Kation sorbiert wird.

Die bevorzugte Sorption des L-Leucins gegenüber dem D-Leucin kommt allerdings dadurch zum Ausdruck, daß der betreffende Selektivitäts-Koeffizient des D-Leucins jeweils erheblich größer ist als der des L-Leucins.

Aus diesem Befund kann abgeleitet werden, daß die unterschiedlich starke Sorption der beiden Stereoisomeren des Leucins vor allem durch einen differenziert zunehmenden Austausch mit den am Ton bereits sorbierten Protonen bestimmt wird. Aus den Spalten (3) und (4) der ^Tabelle 16 geht eindeutig hervor, daß mit Erhöhung der Gleichgewichtskonzentration und damit verbundener zunehmender Sorption des Leucins die Menge an sorbierten Na⁺-Ionen am Montmorillonit ebenfalls <u>zunimmt.</u> Die geringfügig höheren pH-Werte, die sich in den Schüttelansätzen mit L-Leucin-Zugabe im Vergleich zu denen mit D-Leucin-Zugabe am Ende des Sorptionsversuches einstellen (siehe Tabelle 8, Spalte (3)), lassen sich dadurch erklären, daß die bereits sorbierten Protonen an der Tonoberfläche mit den zusätzlich sorbierten Leucin-Kationen einen Protonentransfer vollziehen.

Der Protonentransfer ließe sich folgendermaßen formulieren:

Ton - H_30^+ + Leu _____ Ton - Leu-H + H_20

Zahlreiche Autoren haben sich in jüngster Zeit mit der Oberflächenazidität und der Ladungsdichte bei Montmorillonit befaßt

Tabelle 16: μ -Äquivalente der Stereoisomeren des Leucins und der Kationen Na⁺ und H₃0⁺ sorbiert bzw. gelöst (Alle Angaben in μ Val pro Schüttelansatz)

Versuc	hs Nr.,	Gleichgewichts-	µ Val	sorbie	ert	µ Val	in Lös	ung	SK _{Na} +/Leu ⁺
des Le	sucins	(µ Mol/ml)	Na ⁺	Leu ⁺	н ₃ 0+	Na ⁺	Leu ⁺	н ₃ 0+	
Spalte	Nr.(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
41	D-Leu L-Leu	0.2	189 189	0.07 0.39	18.8 18.2	227 227	1.930 1.604	29.2 29.8	22.9 3.42
42	D-Leu L-Leu	0.3	189 189	0.49 0.76	18.0 17.4	227 227	2.504 2.242	29.0 29.6	4.25 2.45
43	D-Leu L-Leu	0.4	188 201	0.63 2.13	18.6 2.8	228 215	3.370 1.868	27.4 43.2	4.41 0.81
44	D-Leu L-Leu	0.5	190 204	0.95 2.27	16.1 1.7	226 212	4.054 2.732	28.8 43.3	3.58 1.15
45	D-Leu L-Leu	0.6	194 206	1.09 2.41	11 . 8 -	222 210	4.912 3.592	32.2 44.0	3.93 1.46
46	D-Leu L-Leu	0.7	199 207	1.29 2.45	6.4	217 209	5.706 4.548	36.6 43.0	4.05 1.83

(FRENKEL, 1974; LAURA und CLOOS, 1975; STUL und MORTIER, 1974; CLOOS, LAURA und BADOT, 1975; KARICKHOFF und BAILEY, 1976; HELSEN, DRIESKENS und CHAUSSIDON, 1975). Daraus kann übereinstimmend gefolgert werden, daß die Protonisierung an der Tonoberfläche häufig sehr viel größer ist, als sie aufgrund von pH-Messungen in Lösungen von Tonsuspensionen abgeleitet werden kann, und daß die Protonisierung selbstverständlich auch von den Eigenschaften des Zwischenschichtkations (Polarisierbarkeit, Ionen-Radius, Ladungsdichte) abhängt.

Diese Zusammenhänge konnten HELSEN et al. (1975) überzeugend darstellen, indem sie über die Protonisierung des Triphenylmethanols zum korrespondierenden Carbonium-Ion an der Oberfläche von Montmorillonit nachwiesen, daß beispielsweise das Na⁺-Ion im Vergleich zum Li⁺-Ion eine geringere Protonisierung entfaltete. Mithin kann auch für diese Versuche nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der Protonen zumindest an der äußeren Oberfläche des Montmorillonits in sorbierter Form verblieben ist, während gleichzeitig die Sorption des Leucin-Kations zunahm.

Ansatz III: <u>Berechnungen zur Flächenbelegung der äußeren Oberfläche</u> <u>des Tones durch das Aminosäure-Molekül Leucin</u>

Nach Angaben von GREENLAND et al. (1962) hat der Montmorillonit eine Gesamtoberfläche von ca. 750 m²/g Ton, während die äußere Oberfläche, die durch Adsorption von Stickstoff gemessen wurde, mit ca. 50 m²/g Ton angegeben wird. Über die Angabe für die Gesamtoberfläche des Montmorillonits (750 m²/g) und seine ermittelte Austauschkapazität von 98 m Val/100 g Ton läßt sich die spezifische Ladungsdichte berechnen.

Für unseren Montmorillonit ergibt sich damit eine spezifische Ladungsdichte von 1.30 $\frac{m \text{ Val}}{cm^2 \cdot 10^7}$ Das entspricht 1.30 m Val/1000 m².

In unseren Schüttelansätzen sind insgesamt 200 mg Na-Montmorillonit eingesetzt worden. Die äußere Oberfläche von 200 mg Montmorillonit sind mit 10 m² anzugeben.

Mithin können auf dieser äußeren Oberfläche maximal aufgrund der oben dargestellten Berechnung 13.0 μ Val Kationen sorbiert werden. Die insgesamt sorbierte Menge von 2.45 μ Mol L-Leucin (bei der Gleichgewichtskonzentration von 0.7 μ Mol/ml, siehe Tabelle 7, S.83) hätte damit 18.8 % der äußeren Oberfläche des Tones belegt. Der entsprechende Wert für das sorbierte D-Leucin (insgesamt: 1.29 μ Mol) bei der Gleichgewichtskonzentration 0.7 μ Mol/ml beträgt jedoch nur 9.9 %.

Mit dieser Berechnung sollte lediglich gezeigt werden, mit welchem Anteil die aktuell zu berücksichtigende äußere Oberfläche des Tones an der Sorption überhaupt beteiligt ist.

Auch die in der Tabelle 8 mitgeteilten ⊿-Werte, die aufgrund der gemessenen d(001)-Abstände errechnet wurden, lassen keine Aufweitung über das Maß einer monomolekularen H₂O-Schicht hinaus erkennen. Die d(001)-Werte stimmen mit den Werten von GEBHARDT et al. (1970) überein, die das intrakristalline Quellungsverhalten des Wyoming-Montmorillonits als Funktion von Ionen-Belag und Wasserdampf-Partialdruck untersuchten.

Zieht man die Schlußfolgerung aus den in den Ansätzen I - III erfolgten Überlegungen, so läßt sich in Übereinstimmung mit GILES et al. (1960) und GREENLAND et al. (1962) folgern, daß der <u>Sorptionsvorgang</u> unter diesen gegebenen Versuchsbedingungen ausschließlich durch <u>Protonentransfer</u> gekennzeichnet ist. Dieser Befund stimmt auch mit den Ergebnissen von CLOOS et al. (1966) überein, die in Adsorptionsuntersuchungen mit Glycin und Glycylglycin den Kationen-Austausch und Protonentransfer an Na- und Ca-Montmorillonit studierten. Sie stellten fest, daß der Austausch von Na- und Ca-Ionen gegen das Kation der Aminosäure nur stöchiometrisch war, weil die Al-Ionen, die bei dem Säureangriff aus der Silikatschicht freigesetzt wurden, die Austauscherstellen des Tones besetzten. Der Protonentransfer, der den Austausch-Prozeß bestimmte, war ebenfalls von einer Erhöhung des pH-Wertes in der Austauscherlösung begleitet (siehe auch Tabelle 8, Spalte 3).

Welches nun die entscheidenden Kriterien sind, die zur stereospezifisch bevorzugten Sorption des L-Leucins an der Oberfläche des Montmorillonits führen, kann hier nicht schlüssig geklärt werden, zumal dieses Phänomen an Dreischicht-Tonmineralen unseres Wissens hiermit zum ersten Mal nachgewiesen worden ist. In den Arbeiten von DEGENS et al. (1970) und von JACKSON (1971) wird nur die Sorption und Polymerisation von optisch aktiven Aminosäuren an Kaolinit behandelt.

JACKSON (1971) glaubt, daß die stereospezifische Sorption des L-Phenylalanins an den Kristallecken des Kaolinits stattfindet, weil die Oktaederschicht des Kaolinits aufgrund der Anordnung der Sauerstoffatome, der OH-Gruppen, der Al-Atome und der unbesetzten Oktaederzentren enantiomorphe Strukturen entfaltet. Der Befund, daß ein gut durchkristallisiertes Mineral des Kaolinits (mit Ausnahme des Dickits) entweder komplett der L-Reihe oder der D-Reihe zugeordnet werden kann, ist von BAILEY (1963) überzeugend nachgewiesen worden. Es wäre für diese Untersuchungen denkbar, daß die Bruchflächen der Oktaederschicht des Montmorillonits eine ähnliche stereoselektive Rolle bei der Sorption optisch aktiver Aminosäuren spielen könnten, wie sie für die Ecken der Oktaederschicht des Kaolinits von JACKSON (1971) postuliert wurden.

4.3.2 Messung der stereospezifischen Sorption der in einem Racemat vorliegenden stereoisomeren Aminosäuren, dargestellt an der Sorption von D, C¹⁴-L-Leucin an Na-Montmorillonit

Auf die Notwendigkeit und Begründung, eine Methode zu entwickeln, die die stereospezifische Sorption der in einem racemischen Gemisch vorliegenden Aminosäuren an Tonen zu messen gestattet, wurde bereits in Abschnitt 3.2.2 eingegangen. Beim Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung des sorbierten C¹⁴-L-Leucins an Na-Montmorillonit (siehe Tabelle 9, Vers.Nr.28) dürfte die hohe Abweichung von 22 % in erster Linie darauf zurückzuführen sein. daß bei der relativ niedrigen Gleichgewichtskonzentration von 0.25 m Mol/Liter das C¹⁴-L-Leucin nicht mehr spezifisch stark genug markiert war, so daß bei der C¹⁴-Messung und der Auswertung der registrierten "peaks" der obere Bereich der Fehlergrenze erreicht wird. Im übrigen zeigen die Versuchsergebnisse der Tabelle 10, daß mit dieser Methode die stärkere Sorption des C¹⁴-L-Leucins gegenüber dem D-Leucin an Na-Montmorillonit, die beide zu Versuchsbeginn in einem echten Racemat vorgelegen haben, sehr überzeugend nachgewiesen werden kann. Es sei ferner darauf verwiesen, daß diese Methode auch geeignet wäre, die Racematealler proteinogenen Aminosäuren in ihrem stereospezifischen Sorptionsverhalten an Tonen in einem Arbeitsgang zu untersuchen. Die einzige Voraussetzung dafür wäre, daß jeweils eine Isomere jeder Aminosäure in C¹⁴-markierter Form vorliegt.

4.3.3 Sorptionsversuche mit den diastereoisomeren Dipeptiden des Leucins sowie den Dipeptiden L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl-Glycin an Na-Montmorillonit

Die Sorptionsversuche mit den diastereoisomeren Dipeptiden des Leucins haben interessanterweise bestätigt, daß offensichtlich die spezifische L-Konfiguration mit der das Dipeptid beginnenden freien A-Aminogruppe des L-Leucins an dem stereospezifischen Sorptionsvorgang entscheidend beteiligt ist.

Zwischenbemerkung:

Bei der treffenden Bezeichnung eines Peptids oder Polypeptids enden bekanntlich die in der Peptidkette startende Aminosäure und alle ihr folgenden Aminosäuren mit der Endsilbe -cyl. Lediglich die letzte Aminosäure des Peptidverbandes wird mit der Endsilbe ihres Namens ausgeschrieben.

Das Tetrapeptid des Glycins lautet beispielsweise:

glycyl - glycyl - glycyl - glycin.

Lt. Nomenklaturvorschrift (IUPAC - IUP, 1972) liegt - nach der oben angegebenen Schreibweise - die Aminogruppe der jeweils am Anfang des Peptids stehenden Aminosäure in freier Form vor und ihre Carboxyl-Gruppe ist an der ersten Peptidbindung mit der Aminogruppe der nächst folgenden Aminosäure beteiligt. Das Zwitterion des Dipeptids L-Leucyl-L-Leucin, mit dem auch in diesen Versuchen gearbeitet wurde, kann folgendermaßen formuliert werden (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Strukturformel des L-Leucyl-L-Leucins



L - Leucyl - L - Leucin

Aufgrund der Untersuchungen mit dem L- und D-Leucin an Na-Montmorillonit (siehe Abschnitt 3.2.1) war zu erwarten, daß sich die stereoisomeren Dipeptide L-Leucyl-L-Leucin und D-Leucyl-D-Leucin in der Sorption an Na-Montmorillonit ähnlich verhalten. Das hat sich mit diesen Versuchen voll bestätigt (siehe Tabellen 11, 12, 13. 14 und 2). Daß sich hingegen die diastereoisomeren Dipeptide D-Leucyl-L-Leucin und L-Leucyl-D-Leucin (siehe Tabelle 14) untereinander ebenfalls in ihrer Sorption an Na-Montmorillonit hoch signifikant unterscheiden, war von vornherein nicht zu erwarten. Dieser Befund weist sehr eindrucksvoll darauf hin, daß die in der L-Konfiguration im sauren Bereich als Kation dissoziierte Aminogruppe des Dipeptids L-Leucyl-D-Leucin maßgeblich an der stereospezifischen Sorption beteiligt sein muß, während die in der D-Konfiguration als Kation dissoziierte Aminogruppe des Dipeptids D-Leucyl-L-Leucin offensichtlich aus sterischen Gründen in sehr viel schwächerem Maße dazu befähigt ist.

Als interessant bleibt zu vermerken, daß die beiden Dipeptide L-Leucyl-L-Leucin und D-Leucyl-D-Leucin sich bei beiden Konzentrationsbereichen in ihrem Sorptionsvermögen nicht voneinander unterscheiden.

Zur Klärung dieser Frage könnte vielleicht die neuerdings von RAUPACH und JANIK (1976) verwendete ATR-Methode (polarisiertes Infrarotlicht in Verbindung mit gedämpfter totaler Reflexion, engl.: <u>attennated total reflectance</u>) beitragen, da man damit offensichtlich gute Aussagen zur molekularen Orientierung der sorbierten Moleküle auf der Tonoberfläche treffen kann.

Daß bei den beiden stereoisomeren Dipeptiden L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl-Glycin keine Unterschiede in der Sorption an Na-Montmorillonit vorliegen, könnte damit begründet werden, daß das Glycin kein optisch aktives & -C-Atom besitzt und somit für das Dipeptid bei beiden Stereoisomeren eine gleich günstige Attachierung zur Tonoberfläche möglich ist.

5. <u>Zusammenfassende Diskussion der in den Teilen I und II</u> dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse

Die in Teil I, Abschnitt 4 zum Vorkommen von D-Aminosäuren in Böden und in Teil II, Abschnitt 3 zum stereospezifischen Sorptionsverhalten einiger D-Aminosäuren an Montmorillonit mitgeteilten Ergebnisse lassen erkennen, daß den D-Aminosäuren im Boden möglicherweise eine große ökologische Bedeutung zukommt. Die stereo**spezifis**ch bevorzugte Sorption des L-Leucins gegenüber dem D-Leucin an Na-Montmorillonit und das in der Tendenz ähnliche Verhalten des L-Lysins im Vergleich zum D-Lysin an Ca-Montmorillonit lassen vermuten, daß die D-Aminosäuren im Boden allein **aufgrund** der ungünstigen Sorptionsbedingungen an den Tonmineralen von der Mikroflora schneller als die L-Aminosäuren metabolisiert werden.

Im Einklang mit anderen Arbeiten, die sich mit der Entstehung des Lebens und dem ausschließlichen Vorkommen der L-Aminosäuren in den Proteinen der Lebenwesen auf der Erde befassen (siehe u.a.: PAECHT-HOROWITZ et al., 1970; BERNAL, 1951; WALD, 1957; DEGENS

- 121 -

und MATHEJA, 1968, ORO, et al., 1974), hat sich damit erwiesen, daß der Boden als sehr komplexes System offensichtlich nur kleine ökologische Nischen bereit hält, die die Existenz der unnatürlich konfigurierten D-Aminosäuren garantiert.

Mit dem Befund der bevorzugten Sorption des L-Leucins gegenüber dem D-Leucin an Na-Montmorillonit ist ein weiterer Hinweis dafür erbracht worden, daß möglicherweise die Oberflächen der Tonminerale beim Entwicklungsprozeß des Lebens auf der Erde einen entscheidenden Einfluß ausübten, indem sie als Katalysatoren mit optisch aktiven Oberflächen die Synthese von Peptiden und Eiweißen, die sich ausschließlich aus L-Aminosäuren zusammensetzten, begünstigten.

6. Zusammenfassung

Die Sorptionsversuche wurden mit den D- bzw. L-Isomeren des Leucins des Lysins und der Glutaminsäure an mit Ca- oder Na-Ionen belegtem Montmorillonit (Upton Wyoming Nr.25) bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt.

Die Sorption der betreffenden Aminosäure wird mit Hilfe eines automatischen Aminosäure-Analysators gemessen, indem die Konzentration der Aminosäure am Ende des Sorptionsversuches in einem aliquoten Volumen der zentrifugierten Tonsuspensionslösung im Vergleich zu der Konzentration der Aminosäure in der Lösung eines entsprechenden Standardgefäßes bestimmt wird. Damit wird eine Nachweisempfindlichkeit erreicht, die die Sorptionsmenge der Aminosäure im Nanomol-Bereich anzugeben erlaubt.

Die Sorptionsversuche mit den Stereoisomeren des Leucins an Na-Montmorillonit und den Stereoisomeren des Lysins an Ca-Montmorillonit haben eindeutig eine stereospezifisch bevorzugte Sorption der L-Isomeren gegenüber den D-Isomeren angezeigt. Beispielsweise wurden bei einer Gleichgewichtskonzentration von 80 µg Aminosäure/ ml etwa 1500 µg L-Leucin und nur 800 µg D-Leucin pro g Na- Montmorillonit sorbiert.

- 122 -

Die registrierte stereospezifisch stärkere Sorption des L-Leucins gegenüber dem D-Leucin an Na-Montmorillonit wurde besonders eingehend untersucht und diskutiert.

- Mit Hilfe der Berechnung der Faktoren K und n aus der FREUNDLICH-Gleichung zur Beschreibung des Sorptionsvorganges,
- mit Hilfe der Berechnung des Selektivitätskoeffizienten SK für das Ionenpaar Na⁺ und Leu⁺ und
- mit Hilfe der Berechnung zur aktuellen Flächenbelegung der äußeren Oberfläche des Tones durch das Leucin-Molekül

wurde der Nachweis erbracht, daß der <u>Sorptionsvorgang</u> unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen ausschließlich durch <u>Protonen-</u> <u>transfer</u> gekennzeichnet ist.

<u>Die stereospezifisch stärkere Sorption</u> der L-Isomere im Vergleich zu der der D-Isomere einer Aminosäure könnte von den Bruchflächen der Oktaeder-Schichten des Montmorillonits aufgrund besonderer räumlicher Strukturen (optisch aktive Oberflächen) selektiv gesteuert werden.

Die stereospezifisch stärkere Sorption einer L-Aminosäure im Vergleich zu der korrespondierenden D-Aminosäure an Montmorillonit ist unseres Wissens erstmals nachgewiesen worden.

Weiterführende Sorptionsversuche mit den diastereoisomeren Dipeptiden des Leucins an Na-Montmorillonit haben eindeutig gezeigt, daß immer dann die größte Menge an Dipeptid sorbiert wurde, wenn die freie \triangleleft -Aminogruppe des Dipeptids Leucyl-Leucin in der L-Konfiguration vorliegt.

Hingegen konnte für die beiden Dipeptide L-Leucyl-L-Leucin und D-Leucyl-D-Leucin kein signifikanter Unterschied in der Sorption an Na-Montmorillonit gemessen werden. Auch die beiden stereoisomeren Dipeptide L-Alanyl-Glycin und D-Alanyl-Glycin zeigten kein signifikant unterschiedliches Sorptionsvermögen an Na-Montmorillonit.

Schließlich wurde eine neue Methode entwickelt, mit der die stereospezifische Sorption der in einem Racemat vorliegenden optischen Antipoden einer (oder mehrerer) Aminosäure(n) an Tonmineralen bestimmt werden kann.

Literaturverzeichnis

ALDAG, R.:	Zur stereospezifischen Sorption der Stereoisomeren des Leucins und seiner diastereoisomeren Dipeptide an Na- Montmorillonit. Mitteilungen Deutsch.Bodenkundl.Ges. 22, 433-440 (1975)
BAILEY, S.W.:	Polymorhism of the Kaolin minerals. American Mineralogist <u>48,</u> 1196-1209 (1963)
BERNAL, J.D.:	The Physical Basis of Life. Routledge and Keyan Paul, London 1951
BONNER, W.A., KAVASMANECK, P.R. and MARTIN, F.S.:	Asymmetric adsorption by Quartz: A model for the prebiotic origin of optical activity. Origins of Life <u>6</u> , 367-376 (1975)
BONNER, W.A. and FLORES, J.:	On the asymmetric adsorption of phenylalanine enantiomers by kaolin. Currents in Modern Biology <u>5</u> , 103- 113 (1973)
BÖTTGER, W.:	Zusammenhänge zwischen Sorption und Phytotoxizität in Abhängigkeit von Bodenmerkmalen am Beispiel der Her- bizide Methabenzthiazuron, Terbutryn und Chlortoluron. Dissertation, Ldw. Fakultät Göttingen, 1976
BRISBANE, P.G., AMOTO, M. and LADD, J.N.:	Gas chromatographic analysis of amino acids from the action of proteolytic enzymes on soil humic acids. Soil Biol. Biochem. <u>4</u> , 51-61 (1972)
CHALVIGNAC, M.A. and MAYAUDON, J.:	Extraction and study of soil enzymes metabolizing tryptophan. Plant and Soil <u>34</u> , 25-31 (1971)
CLOOS, P., CALICIS, B., FRIPIAT, J.J. and MAKAY, K.:	Adsorption of amino acids and peptides by montmorillonite. I. Chemical and x-ray diffraction studies. Proc.Int.Clay Conf., Jerusalem <u>1</u> , 223-232 (1966)
CLOOS, P., LAURA, R.D. and BADOT, C.:	Adsorption of ethylenediamine (EDA) on montmorillonite saturated with different cations. V. Ammonium- and triethylammonium-montmorillonite: ion exchange, protonation and hydrogen bonding. Clays and Clay Minerals <u>23</u> ,417-423 (1975)

McCULLOUGH, J.J. and LEMMON. R.M.:

DEGENS, E.T., MATHEJA, J. and JACKSON, T.A.:

ENSMINGER, L.E. and GIESEKING, J.E.:

ENSMINGER, L.E. and GIESEKING, J.E.:

FLORES, J.J. and BONNER, W.A.:

FRENKEL, M.:

GEBHARDT, H., HEITMANN, D. und MEYER, B.:

GILES, C.H., McEWAN, T.H., NAKHWA, S.N. and SMITH, D.:

GOH. K.M.:

The question of the possible asymmetric polymerization of aspartic acid on kaolinite. J.Molec. Evolution 3, 57-61 (1974)

DEGENS, E.T. and MATHEJA, J.: Origin, Development, and Diagenesis of Biogeochemical Compounds. J.of the British Interplanetary

Soc. 21, 52-82 (1968)

Template Catalysis: Asymmetric polymerization of amino acids on clay minerals. Nature, 227, 492-493 (1970)

The adsorption pf proteins by montmorillonitic clays. Soil Sci. 48, 467-473 (1939)

The adsorption of proteins by montmorillonitic clays and its effect on base-exchange capacity. Soil Sci. <u>51</u>, 125-132 (1941)

On the asymmetric polymerization of aspartic acid enantiomers by kaolin. J.Molec.Evolution 3, 49-56 (1974)

Surface acidity of montmorillonites. Clays and Clay Minerals <u>22</u>, 435-441 (1974)

Intrakristallines Quellungsverhalten montmorillonitischer Tonminerale als Funktion von Ionen-Belag und Wasserdampf-Partialdruck. Göttinger Bodenkundl.Ber. 14, 127-158 (1970)

Studies in adsorption. XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. J.Chem.Soc.III, 3973-3993 (1960)

Amino acid level as indicators of paleosols in New Zealand soil profiles. Geoderma 7, 33-47 (1972)

GREENLAND, D.J., LABY, R.H. Adsorption of Glycin and its Di-, and QUIRK, J.P.: Tri-, and Tetra-Peptides by Montmorillonite. Trans.Faraday Soc. <u>58</u>, 829-841 (1962)

GREENLAND, D.J., LABY, R.H. The adsorption of amino acids and and QUIRK, J.P.: peptides by montmorillonite and illite. Part I. Cation exchange and proton transfer. Trans. Faraday Soc. <u>61</u>,2013-2023 (1965a)

GREENLAND, D.J., LABY, R.H. The adsorption of amino acids and peptides by montmorillonite and illite. Part II. Physical adsorption. Trans. Faraday Soc. <u>61</u>, 2024-2035 (1965b)

GREENLAND, D.J.:

GREENLAND, D.J.:

HAMAKER, J.W. and THOMPSON, J.M.:

HELSEN, J.A., DRIESKENS, R. and CHAUSSIDON, J.:

IUPAC-IUP Commision on Biochemical Nomen-Clature (CBN):

JACKSON, T.A.:

Interaction between clays and organic compounds in soils. Part I. Mechanisms of interaction between clays and defined organic compounds. Soils and Fertilizers <u>28</u>,5,415-425 (1965c)

Interaction between clays and organic compounds in soils. Part II. Adsorption of soil organic compounds and its effect on soil properties. Soils and Fertilizers <u>28</u>,6, 521-532 (1965d)

Adsorption. In: Organic chemicals in the soil environment. Vol.I, page 49 ff; Eds.: C.A.I. GORING and J.W.HAMAKER Marcel Dekker Inc.New York, 1972.

Position of exchangeable cations in Montmorillonites. Clays and Clay Minerals, <u>23</u>, <u>334-335</u> (1975)

Symbols for Amino-Acid Dervatives and Peptides. Eur.J.Biochem. <u>27</u>,201-207 (1972)

Preferential polymerization and adsorption of L-optical isomers of amino acids relative to D-optical isomers on kaolinite templates. Chem.Geol.<u>7</u>, 295-306 (1971) JANG, S.D. and CONDRATE, R.A.: The I.R. Spectra of Lysine adsorbed on several cation substituted montmorillonites. Clays and Clay Minerals 20, 79-82 (1972)JONES. M.J. and PARSONS, J.W.: The nature of the nitrogen compounds in soil organic matter extracted by anyhydrous formic acid. Journal of Soil Sci. <u>23</u>, 128-134 (1972)KARICKHOFF, S.W. and Protonation of organic bases in clay-BAILEY, G.W.: water systems. Clays and Clay Minerals 24, 170-176 (1976)KATCHALSKY, A.: Prebiotic synthesis of bioploymers on inorganic templates. Naturwissenschaften 60,5,215-220 (1973)LADD, J.N. and BRISBANE, P.G.: Release of amino acids from soil humic acids by proteolytic enzymes. Austr.J.Soil.Res. 5, 161-171 (1967) McLAREN, A.D., Peterson, G.H. The adsorption reactions of enzymes and BARSHAD, I.: and proteins on clay minerals. IV. Kaolinite and montmorillonite. Soil Sc.Soc.Am.Proc.22, 239-244 (1958)McLAREN, A.D. and PETERSON, G.H.: zit. nach MORTLAND (1970) ASA (American Soc.Agron.) Monogr. 10, 259-284 (1965) LAURA, R.D. and CLOOS, P .: Adsorption of ethylenediamine (EDA) on montmorillonite saturated with diffe-rent cations. III Na-, K- and H- mont-morillonite: Ion exchange, protonation, coordination and hydrogen bonding. Clays and Clay Minerals 23, 61-69 (1975)MEISTER, A.: Biochemitry of the amino acids. 2.edition Vol. I and II 1965, Academic Press, New York, London MORTLAND, M.M.: Clay-organic complexes and interactions. Advances in Agronomy 22, 75-117 (1970)ORO, J., MILLER, S.L., Cosmochemical evolution and the PONAMPERUMA, C. and YOUNG, R.S.: origins of life. Vol.I. D.Reidel, Publ. Company, Dordrecht/Holland, Boston, USA (1974)

Praebiotic synthesis of polypeptides PAECHT-HOROWITZ, M., BERGER. J. and KATCHALSKY, A .: by heterogenous polycondensation of amino acid adenylates. Nature 228, 636-639 (1970) PIPER, T.J. and POSNER, A.M.: On the amino acids found in humic acid. Soil Sci. <u>106</u>, 188-192 (1968) RAUPACH, M. and JANIK, L .: The orientation of ornithine and 6-aminohexanoic acid adsorbed on vermiculite from polarized IR.ATR spectra. Clays and Clay Minerals 24, 127-133 (1976) Complexes vermiculite-Aminoacids. RAUSELL-COLOM, J.A. et SALVADOR, P.S.:, Clay Minerals 9, 139-149 (1971) The thermal polymerization of amino ROHLFING, D.L. and acids in the presence of sand. McALHANEY, W.W.: Bio Systems 8, 139-145 (1976) SCHARPENSEEL, H.W. und Aminosäureuntersuchungen an verschie-KRAUSSE, R.: denen organischen Sedimenten, besonders Grau- und Braunhuminsäurefraktionen verschiedener Bodentypen (einschließlich C¹⁴-markierter Huminsäuren). Z.Pflanzenernährg., Düng. u.Bodenkunde 96, 11-34 (1962) SCHARPENSEEL, H.W.: Aufbau und Bindungsform der Ton-Huminsäurekomplexe. Teil IV. Fällungsradiometrie mit Aminosäure-belegtem Ton. Z.Pflanzenernährg., Düng. u.Bodenkunde 125, 111-115 (1970) Aufbau und Bindungsform der Ton-Humin-säurekomplexe. Teil V. Fällungsradio-SCHARPENSEEL, H.W. und KRUSE, E.: metrie im System Montmorillonit (C⁴) -Aminosäure-(C¹⁴)-Huminsäure. Z.Pflanzenernährg.,Düng. u.Bodenkunde 129, 226-236 (1971) SCHARPENSEEL, H.W. und Amino acids in clay-humic acid complex KRUSE, E.: formation. Isotopes and Radiation in Soil-Plant Relationsships including Forestry. International Atomic Energy Agency, Vienna p.193-210 (1972)

SCHEFFER, F. und ULRICH, B.: Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde III.Teil. Humus und Humusdüngung. 2.Aufl. F.Enke-Verlag, Stuttgart, 1960

SCHNITZER, M. and KODOMA,H.:	Montmorillonite: Effect of pH on its adsorption of a soil humic com- pound. Science <u>153</u> , 70-71 (1966)
SIESKIND, O.:	Sur les complexes d'adsorption formés en milieu acide entre la montmorillo- nite-H et certains acides aminés: leur structure. Comp.rend.Acad.Sci., Paris <u>250</u> , 2392-2393 (1960)
SOWDEN, F.J.:	Nature of the amino acid compounds of soil. 2. Amino acids and peptides pro- duced by partial hydrolysis. Soil Sci. <u>102</u> , 264-271 (1966)
SOWDEN, F.J.:	Action of proteolytic enzymes on soil organic matter. Canad.J.Soil Sci. <u>50</u> , 233-241 (1970)
STUL, M.S. and MORTIER, W.J.	The heterogenity of the charge den- sity in montmorillonites. Clays and Clay Minerals <u>22</u> ,391-396 (1974)
TALIBUDEEN, O.:	Complexes formation between montmo- rillonoid clays and amino acids and proteins. Trans. Faraday Soc. <u>51</u> ,582-590 (1954)
THENG, B.K.G.:	Formation, properties, and practi- cal applications of clay-organic complexes. Journal of the Royal Society New Zealand <u>2</u> , 437-457 (1972)
THENG, B.K.G.:	The chemistry of clay organic reactions, Hilger,London (1974)
THOMPSON, Th. D. and TSUNASHINA, A.:	The alteration of some aromatic amino acids and polyhydric phenols by clay minerals. Clay and Clay Minerals <u>21</u> ,351-361 (1973)
WALD, G.:	The origin of optical activity. Ann. New York Acad. Sci. <u>69</u> , 352- 368 (1957)

WANG, T.S.C., YANG, T.K. and CHEN, S.Y.:

WEISS, A .:

Amino acids in subtropical soil hydrolysates. Soil Sci. <u>103</u>, 67-74 (1967)

Organic derivatives of clay minerals, zeolites, and related minerals, p.737-781. In: Organic Geochemistry, Eglinton, G. and Murphy. M.T.J. eds. Springer-Verlag, 1970

WITTHAUER, J. und KLÖCKNING, R.:

Bindungsarten des Sticksoffs in Huminsäuren. 1. Mitteilung. Stickstoffgehalt natürlicher Huminsäuren. Archiv Acker- und Pflanzenbau u. Bodenkunde <u>15</u>, 577-588 (1971)

Bönecke-Druck 3392-Clausthal-Z. 29