

Zur Biogenese des Lignins*

On the Biogenesis of Lignin

Von Karl Kratzl¹

Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien und Österreichisches Holzforschungsinstitut Wien

Einleitung — Isotopenarbeiten — Ligninkriterien — Synthesen der Vorstufen: Beispiele der Synthese markierter Kambialsaftglykoside; zur Definierung der Markierungsstellen — Die Applikation der Precursoren in der Pflanze — Isotopenbilanz — Autoradiographie — Mikroanalytische Methoden des Ligninabbaues — Strukturchemische Betrachtungen zur Theorie der Äthanololyse, Acidolyse und Sulfitierung der Ligninseitenkette — Die Bildung des aromatischen Ringes in der höheren Pflanze — Die Dünnschichtchromatographie zur Aufarbeitung von Ligninabbauprodukten — Zur Bildung des Angiospermenlignins — Schlußbetrachtung — Zusammenfassung — Schrifttum.

Einleitung

Die biologische Betrachtungsweise hat auch in die Chemie des Holzes, besonders aber in die des Lignins übergriffen. In den letzten 20 Jahren hat diese Betonung der dynamischen Aspekte in der Proteinchemie große Erfolge aufzuweisen. Naturstoffe werden heute eher als biologische Zwischenzustände und seltener als Endzustände aufgefaßt. Wie dies auf Pflanzenstoffe wie die Cellulose und das Lignin zutrifft, die ja vom biologischen Geschehen bei natürlichem Wachstum zumindestens teilweise ausgeschlossen sind, sei dahingestellt. Jedenfalls haben aber die Forschungen über die Entstehung der Stoffe auch konstitutionschemisch Fortschritte gebracht. Diese „Biochemie des Holzes“ wurde beim letzten, vierten internationalen Biochemischen Kongreß in Wien im Jahre 1959 referiert und ist in Buchform erschienen [1]. Besonders die genialen Theorien von H. Erdtman und K. Freudenberg haben in den letzten Jahren zu Erfolgen in der biogenetischen Betrachtung des Lignins geführt. H. Erdtman [2, 3] war es, der zuerst die Hypothese aussprach, daß das Lignin der Coniferen durch biologische Dehydrierung von Coniferylalkohol gebildet wird, fußend auf den Vorstellungen des Klassikers, des Schweden P. Klason. In den letzten 20 Jahren hat die Heidelberger Schule K. Freudenbergs diese Theorie zu einer festen Ansicht ausgebaut [4... 7] und durch die ausgezeichneten Versuche der Heidelberger Schule hat man heute ein umfassendes Bild über die Entstehung des Lignins. Von den theoretischen Vorstellungen bis zur Festigung der Erkenntnisse hat es aber vieler experimenteller Untersuchungen bedurft. Die Theorie von H. Erdtman und K. Freudenberg, die besonders der letztgenannte durch die *in vitro*-Synthese des Lignins, das heißt, durch die Dehydrierung des Coniferylalkohols zu einem Dehydrierungspolymerisat (DHP) sehr gefördert hat, wurde aber erst richtig biologisch geprüft, als man mit isotope-markierten Verbindungen in die verholzende Pflanze gehen konnte.

* Dem Manuskript liegt ein Vortrag zugrunde, der im August in den USA und im Oktober 1960 in Japan an Universitäten und in Zellstoff- und Papierfabriken dieser Länder gehalten wurde.

Die Österreichische Gesellschaft für Holzforschung hat diese Arbeiten stets unterstützt und es sei auch an dieser Stelle dafür gedankt. Mein Dank gilt auch allen meinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. G. Billek, Herrn Prof. Dr. J. Kisser danke ich für die Beratung bei botanischen Fragen.

¹ Herrn Prof. Dr. K. Freudenberg zu seinem 75. Geburtstag in aufrichtiger Verehrung gewidmet.

Isotopenarbeiten

Im Jahre 1950, als in Europa ¹⁴C verfügbar wurde, entschloß sich der Verfasser, die bis dahin nur *in vitro* durchgeführten Versuche *in vivo* durch Markierung zu verfolgen. Diese Veröffentlichung soll daher im wesentlichen nur ein kurzer Auszug einer fast 10jährigen Arbeit auf dem Gebiet der Isotopenforschung der Holzchemie sein und den Beitrag der Wiener Gruppe zur Biogenese des Lignins liefern und damit, wie sich herausstellte, zur Bekräftigung der K. Freudenberg'schen Theorie dienen. Vorweggenommen sei, daß vor allem in Wien die Synthese von Vorstufen (Cambialsaftglykosiden) die Isolierung von Phenylpropanderivaten aus dem Lignin, deren C-Folgebestimmung, die quantitative Isotopenbilanz und der Übergang Zucker-Ligninaromaten durchgeführt werden konnte.

Ligninkriterien

Es ist überhaupt schwierig einen Stoff als Lignin zu definieren. Deshalb wurden vom Verfasser die Forderungen aufgestellt, möglichst viele sogenannte Ligninkriterien zu schaffen, das heißt: alle bisherigen Ligninreaktionen, die zu definierten Abbauprodukten führen, möglichst quantitativ im Mikromaßstab zu untersuchen, bzw. neue aufzusuchen. Es war zunächst eine synthetische Gruppe aufzustellen, die in Mikrosynthesen die entsprechenden Precursoren, vor allem die Cambialsaftglykoside herstellen sollte². Eine weitere Gruppe sollte sich mit der Auffindung jener Ligninkriterien beschäftigen. Es war insbesondere die Äthanololyse Hibberts auf das mikroanalytische Maß zu reduzieren, d. h. vor allem papierchromatographische und später dünnschichtchromatographische Methoden auszuarbeiten, sowie die aufgefundenen Spaltung der Ligninsulfosäure zu Acetaldehyd und Vanillin im Mikromaßstab zu untersuchen.

Synthesen der Vorstufen

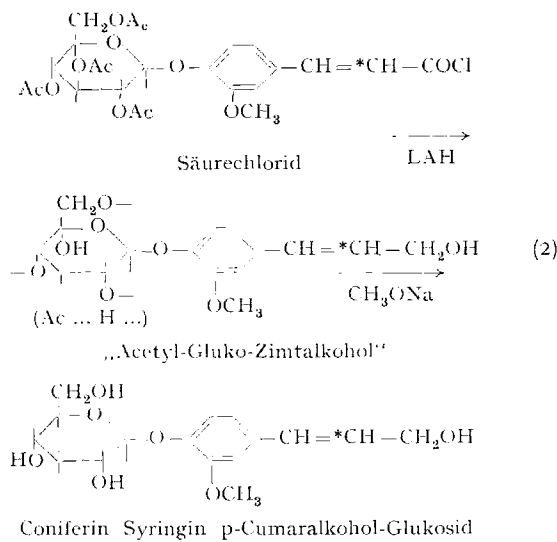
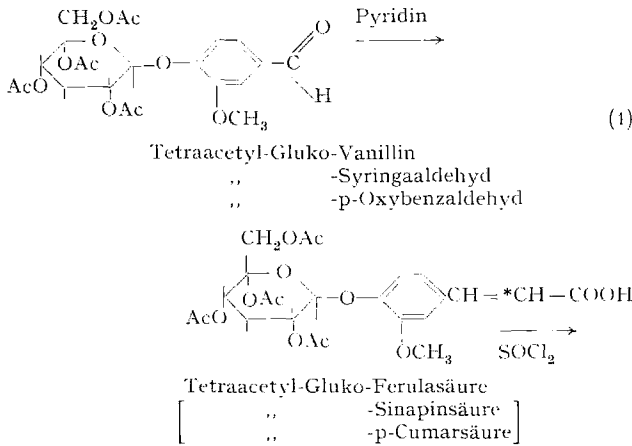
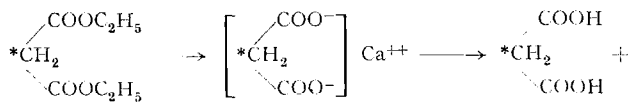
Beispiele der Synthese markierter Kambialsaftglykoside

Die Synthese dieser Verbindungen wurde an verschiedenen C-Atomen markierend durchgeführt, wobei insbesondere das C-Atom 3 (3) also das α C-Atom zum Phenylkern und das C-Atom 2 betont wurden (1) (2)³. K. Freudenberg hatte gleichzeitig Coniferin -1-¹⁴C hergestellt [8]. Die Synthese des Coniferins -2-¹⁴C hatte die im folgenden gezeigten Zwischenstufen, die hier nur in Formeln angegeben werden sollen [9]. Im wesentlichen handelt es sich um eine Knoevenagel-Synthese von Tetraacetylglukovanillin mit markierter Malonsäure. Coniferin -3-¹⁴C [10] wurde von 4-Bromguajacylbenzyläther ausgehend über eine Lithiumcarboxylierungssynthese (siehe (3)) hergestellt.

In gleicher Weise wurden so das Syringin, das p-Hydroxycumaralkoholglukosid sowie verschiedene andere Precursoren erhalten, so daß man heute etwa 30 solche Vorstufen

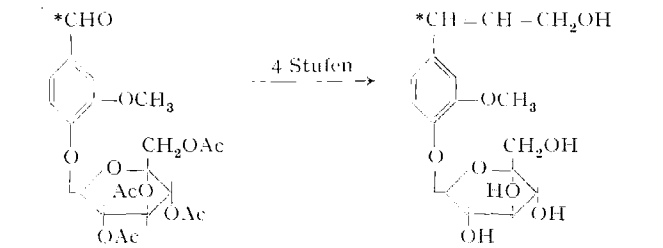
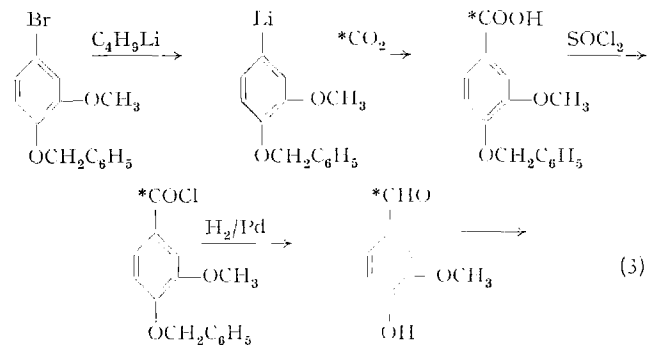
² Folgende Mitarbeiter haben in den Jahren 1952 bis 1960 im Rahmen der „Isotopen- und Ligninforschung“ an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt: G. Billek, H. Silbernagel, W. Schweers, E. Klein, K. Buchtela, A. Graf, G. Hofbauer, W. Kisser, H. Faigle, J. Gratzl, E. Herrmann, G. Puschmann, H. Simon und J. Zauner.

³ Die in runden Klammern () stehenden Zahlen geben die Nummern der Formelbilder an.



zur Untersuchung besitzt [11...15]. Aber auch die Endprodukte des ersten Ligninkriteriums, der Äthanolyse, wurden synthetisch hergestellt, erstens, um genau markierte Verbindungen zu haben, die der Isotopenmeßmethode zugänglich waren, um z. B. die Geräte zu eichen, und zweitens vor allem um definierte Markierungsstellen zu besitzen und nachher Abbaureaktionen studieren zu können. Da der pflanzliche Organismus ein sehr umfassendes Enzym-system besitzt, ist von vornherein keine Aussage möglich, wenn ein Precursor gegeben und ein Endprodukt erhalten wird (beide markiert), ob die Pflanze nicht doch eine totale Umwandlung und Verschmierung der Aktivität durchgeführt hat. Die Synthese (4) dieser Verbindungen [16], also vor allem der Hibbertschen Ketone und Ketole, wurde durch Variation der Friedel-Crafts Reaktion erreicht. Auch hier wurden im wesentlichen mikrosynthetische Methoden angewendet. Sehr wertvoll, sowohl für Synthese als auch für Abbau, erwies sich die Reinigung der Oxyaldehyde über die Metanitrobenzhydrazone [17] und Spaltung dieser mit Quecksilberoxyd und Alkali (5)

Diese Spaltung liefert auch in Mikrodimensionen quantitativ Vanillin zurück und kann so zur Reinigung bis zur Isotopenkonstanz verwendet werden. Es ist überhaupt das Reinheitskriterium der Isotopenkonstanz einzig und allein entscheidend, um eine Aktivitätsbilanz aufzustellen. Der Verfasser hatte sich vorgenommen, nur kristallisierte Produkte zu erhalten, die definierte Markierungsstellen aufzeigen und isotopenkonstant sind.



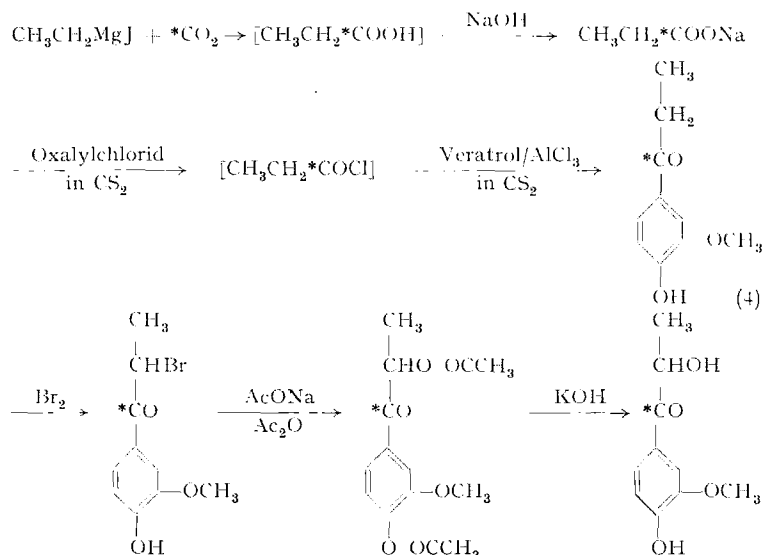
Zur Definierung der Markierungsstellen

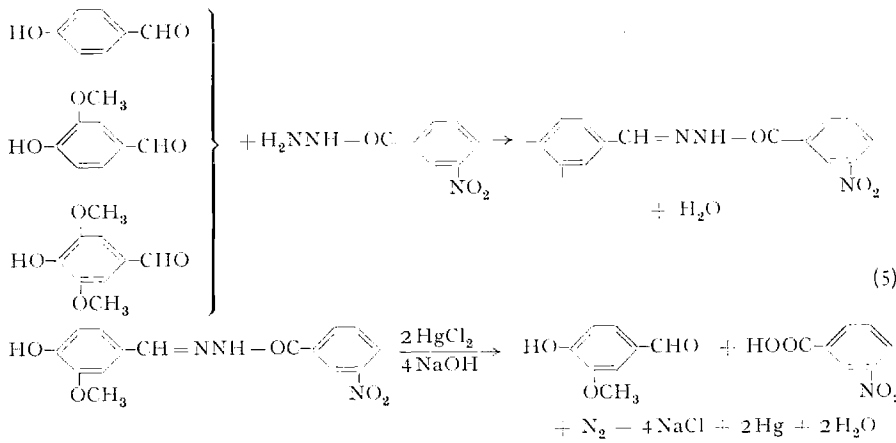
Um die C-Folge zu bestimmen wurden die in (6) und (7) dargestellten Reaktionen näher untersucht [11...15].

Im wesentlichen handelt es sich um die Perjodatoxydation (6) und um die Oxydation mit Alkali und Nitrobenzol zur Vanilloylameisensäure (7). Mit diesen Reaktionen können alle drei C-Atome der Seitenkette erfaßt werden.

Aber auch die Spaltung der Ligninsulfosäure zu Vanillinacetaldehyd lieferte eine Übersicht über die C-Folge der Seitenkette. Diese Reaktion wurde vom Verfasser 1948 aufgefunden, nachdem zahlreiche Modellversuche durchgeführt worden waren [18...28].

Nach den synthetischen Arbeiten [11...15] sei kurz auf die Möglichkeit des Einbringens in den pflanzlichen Organismus hingewiesen.



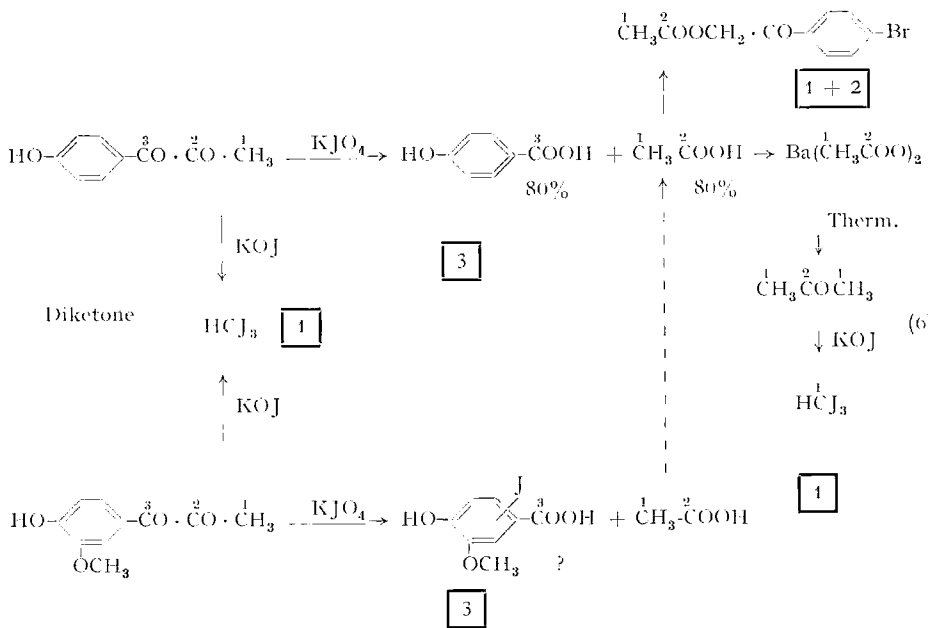


der Verdünnungsgrad [30...33] definiert. Ein Precursor gegebener molarer spezifischer Aktivität wird durch den Organismus in ein Produkt (z. B. Lignin) verwandelt und zu definierten Substanzen abgebaut (z. B. Vanillin, Diketone usw.). Diese kommen mit einer definierten spezifischen Aktivität, die durch die Isotopenkonstanz gegeben ist, heraus. Der Verdünnungsgrad ist dann:

$$\frac{\text{angewendete spez. molare Aktivität}}{\text{spez. molare Aktivität d. Endproduktes}}$$

Je größer der Verdünnungsgrad ist, desto mehr hat die Pflanze durch eigenen Metabolismus „verdünnt“, das heißt, desto weiter ist der Precursor von der Endstufe, also dem Lignin entfernt. Ein guter, also ein naher Precursor, hat einen geringen Verdünnungsgrad. In diesem Sinn sei in den folgenden Bildern der gleiche Versuch nach der Implantationsmethode und nach der Infusionsmethode verglichen. Es wurde vor allem die Äthanolyse und die Oxydation zu Vanillin herangezogen. Aus dem Verdünnungsgrad ist ersichtlich, daß bei der Implantation (8) zwar Coniferin eingebaut wird, das Produkt ein Lignin liefert, das im hohen Grade zu Vanillin abbaufähig ist, aber die Seitenkettenreaktion der spezifischen Äthanolyse nur in einem mehrfach niedrigeren Grad gibt.

Erst wenn alle Abbauprodukte den gleichen Verdünnungsgrad aufweisen, kann von einer biologischen Umwandlung gesprochen werden. Dies zeigt die Infusion (9). Bei der Infusion zeigen auch die Phenylpropankörper den gleichen Verdünnungsgrad wie das Vanillin.



Die Applikation der Precursoren in der Pflanze

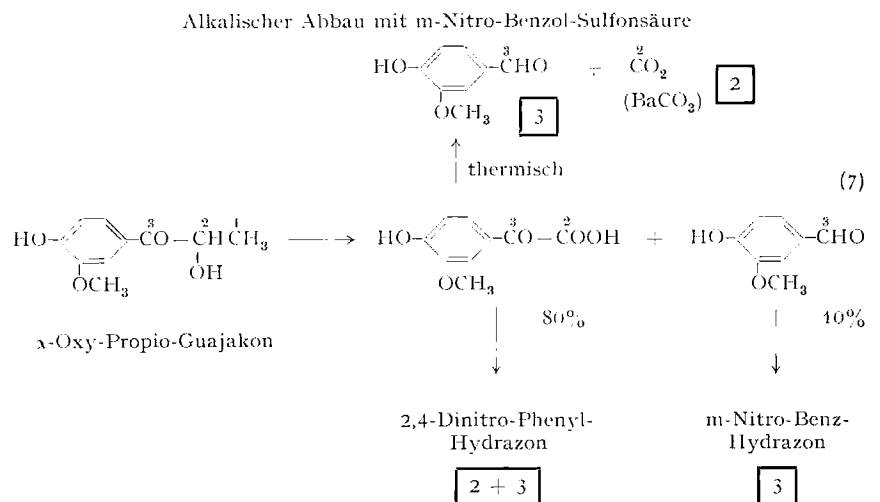
Gibt man wenige mg des Precursors unter die Rinde (Implantation) und läßt, nachdem man die Wunde mit Bast geschlossen hat, mehrere Wochen wachsen, so erhält man ein Produkt, das im wesentlichen im Kambium fixiert ist. K. Freudenberg verwendet den Tauchtrieb [4...7], während sich zur quantitativen Messung, das heißt zur Isotopenbilanz, die von A. Neish [29...33] verwendete Infusionsmethode eignete. Bei dieser werden Zweige unter Wasser abgeschnitten und in die vorbereitete Versuchslösung getaucht.

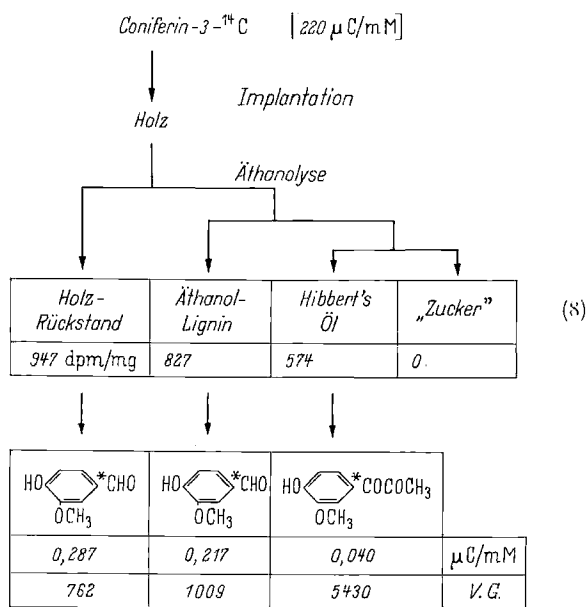
Isotopenbilanz (Quantitative Versuche)

Innerhalb von wenigen Stunden ist die Precursorlösung aufgesaugt und nur so kann man die quantitative Seite verfolgen. Es ist überhaupt überraschend, daß die Verholzung in 24 Stunden meist schon sehr weit vorgeschritten ist. Eine quantitative Bilanz gibt die Arbeit mit H. Faigle [34]. Ein Vergleich der Implantation mit der Infusion zeigte die folgende Arbeitsrichtung. Hierfür sei vorerst

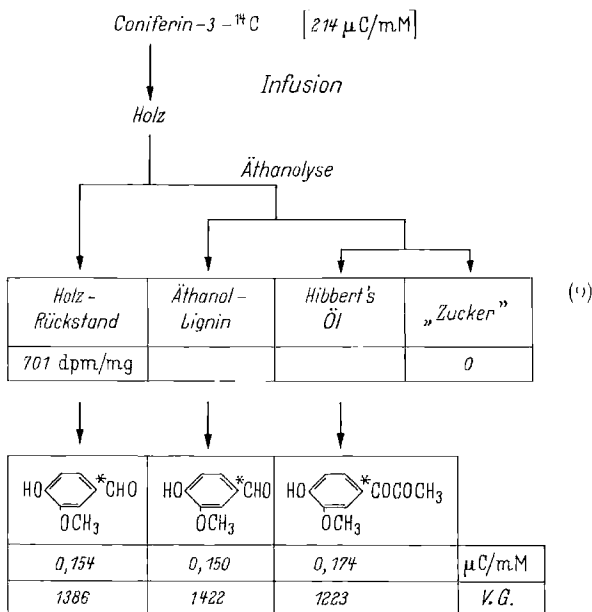
Autoradiographie

Um zu sehen, ob die infundierten Stoffe fixiert werden, wurde rein qualitativ die Autoradiographie herangezogen





(8)



(9)

[11...15]. Von einem Zweig wurden Nadeln sowie Rinde entfernt, der Zweig danach in der Mitte quer durchgeschnitten, ein Teil extrahiert und ein Teil im nichtextrahierten Zustand auf Röntgenfilm aufgelegt. Durch die Extraktion, die mit Wasser, Alkohol und anderen Lösungsmitteln durchgeführt wird, werden die Precursoren und die niederen Vorstufen entfernt (Bild 1, links). Was verhaftet ist, ist in der Kambiumzone fixiert. Von den vielen radiographischen Aufnahmen sollen hier nur Beispiele von Substanzen mit Phenolgruppen (Vanillin) und verätherten Phenolgruppen (Veratrumaldehyd) gegenübergestellt werden. Wie die Bilder 1 und 2 jeweils in der linken Bildhälfte (e = extrahierte Teile) zeigen, werden nur freie Phenole in der Kambiumzone resorbiert.

Methylierte Phenole werden nicht aufgenommen, was in guter Übereinstimmung mit den Theorien der Phenoldehydrierung steht. Ähnliche Versuche [11...15] wurden mit der Temperaturabhängigkeit und mit Hemmstoffen [37] durchgeführt. Diese schnelle Übersichtsmethode gibt nun Auskunft, ob eine Substanz im Kambium verhaftet ist oder nicht. K. Freudenberg und H. Reznik [4...7] haben durch Anwendung mikroskopischer Schnittmethoden

mit der Radioautographie weitere sehr interessante Einzelheiten der Verholzung zutage gefördert.

Mikroanalytische Methoden des Ligninabbaues

Vor allem wurde die Umwandlung des Coniferylalkohols in die höhere Oxydationsstufe, die bei der Äthanolyse die Hibbertschen Ketole liefert, studiert. Die Äthanolyse wurde vom Verfasser schon sehr frühzeitig als charakteristisch für Lignin erkannt [1] und es wurden papierchromatographische Methoden [38...41] ausgearbeitet, um mit kleineren Substanzmengen Hibbertsche Ketole erhalten zu können. So wurde erstmalig am DHP, aber auch an den Zwischenprodukten der biologischen Dehydrierung nach

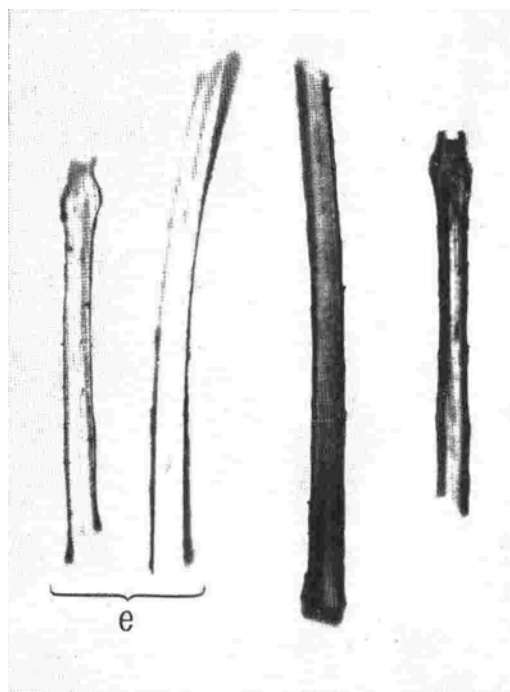


Bild 1. Autoradiographie eines mit Vanillin infundierten Fichtenzweiges. e extrahierte Teile.

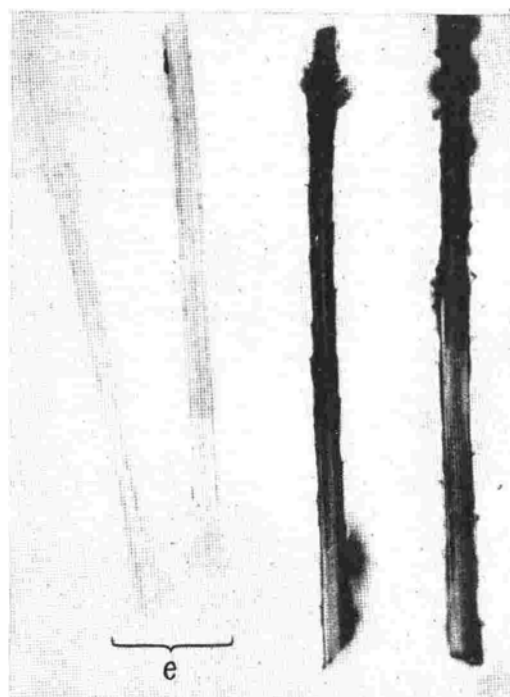
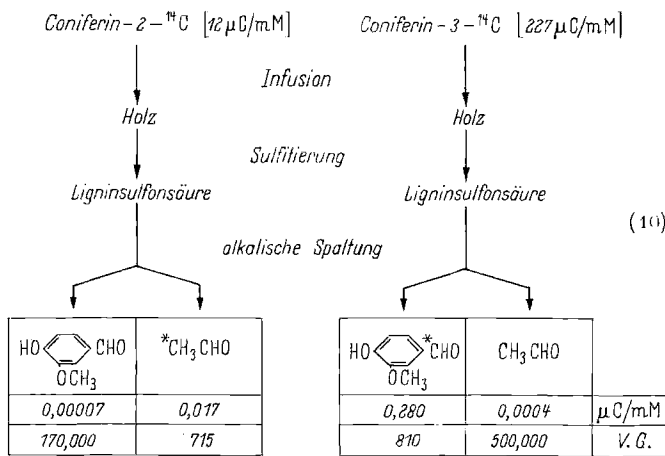
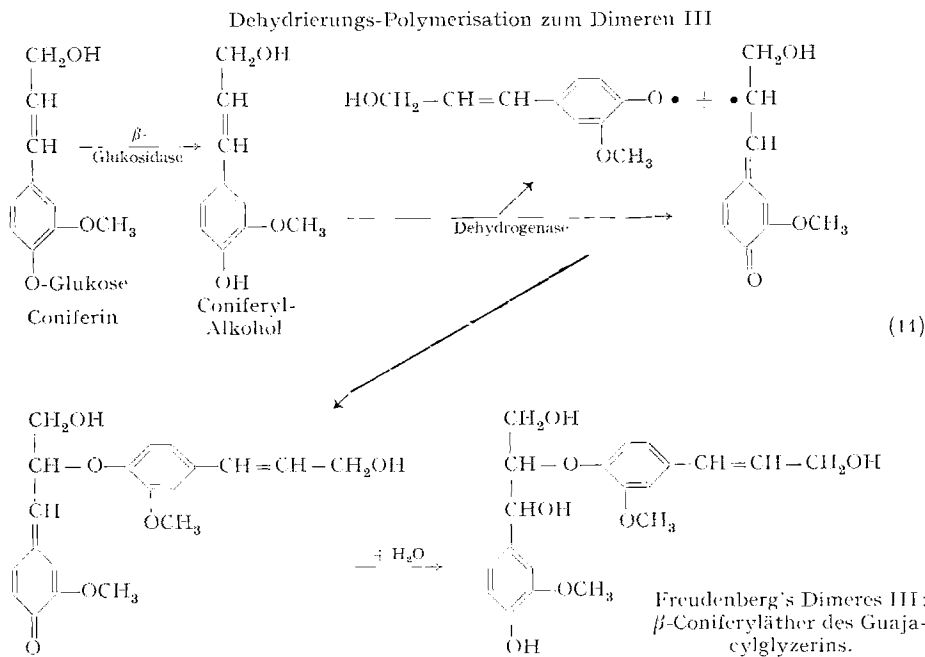


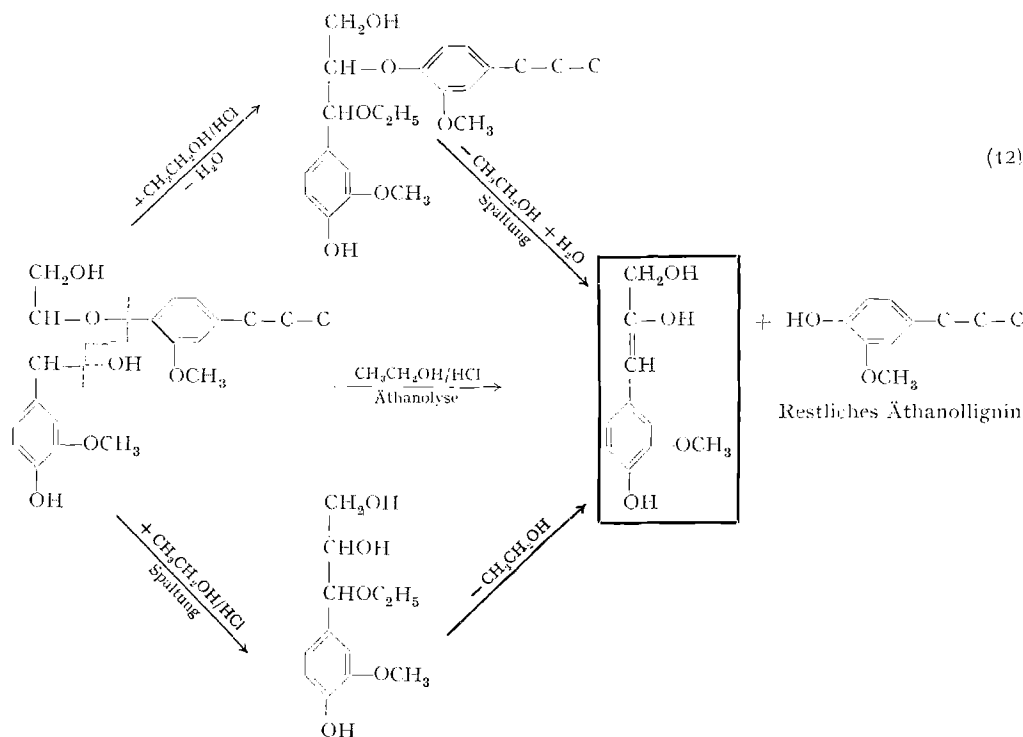
Bild 2. Autoradiographie eines mit Veratrumaldehyd infundierten Fichtenzweiges. e extrahierte Teile.



K. Freudenberg, die Äthanolyse untersucht und sowohl das DHP als auch Zwischenprodukt III zu den Hibbertschen Ketonen abbaufähig gefunden. Die Hibbertsche Äthanolyse liefert aber bei Gymnospermenlignin 5 Produkte, bei Angiospermen 10 und vermutlich bei Monocotyledonen 15. Es mußte deshalb, um ein kristallisiertes Endprodukt zu haben, die Zahl der Produkte reduziert werden, was besonders durch die Oxydation mit Ferrichlorid geschah [42...44]. In diesem Sinn wurde im wesentlichen das α -Äthoxypropionguajakon als das Hauptprodukt zum Vanilloylacetyl (Diketon) oxydiert. So konnte in neuester Zeit die Äthanolysierbarkeit der Monocotyledonen (Stroh, Bambus) zu den Hibbertschen Ketonen bzw. zu p-Hydroxybenzoylacetyl nachgewiesen werden [45]. T. Higuchi [46] hatte bei der Äthanolyse des Bambus fast alle Hibbertschen Bausteine des Vanillin- und Syringa Elementes nachgewiesen. Dadurch, daß sich der Verfasser und seine Mitarbeiter auf das Diketon konzentrierten, wurde ein leicht zu reinigendes Endprodukt erzielt, das über das Dioxim und Nickel-salz in fester Form zur Messung gebracht werden konnte. Auf diese Weise kann man hier verhältnismäßig leicht zu isotopenkonstanten Produkten gelangen, die als wichtiges Ligninkriterium geführt werden.



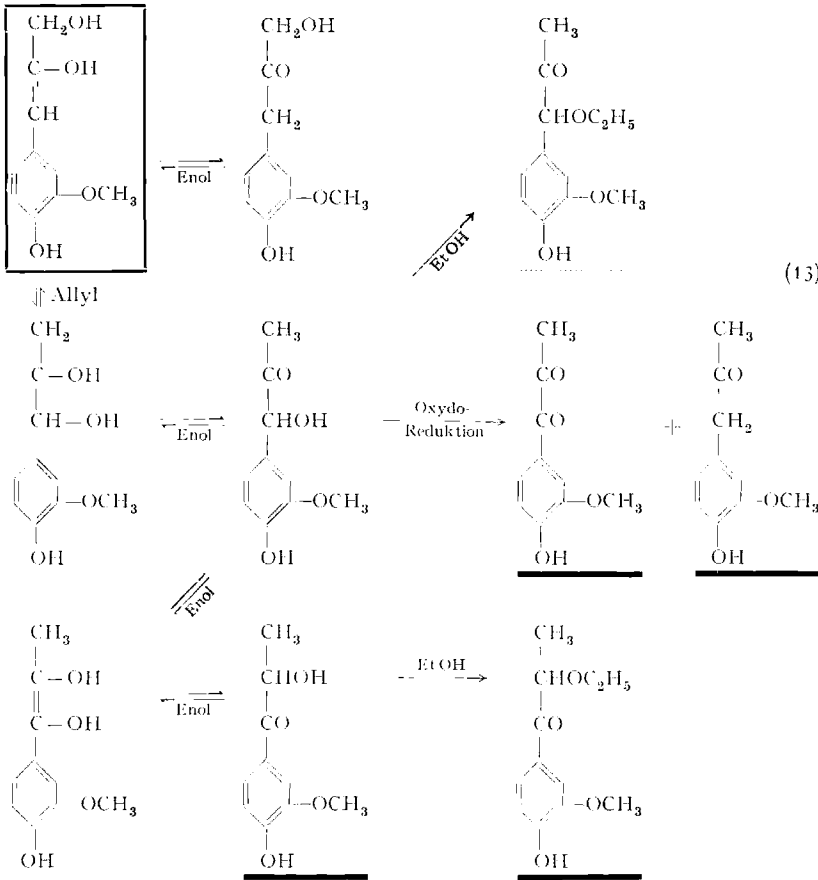
Als weiteres Ligninkriterium wurde die anaerobe Spaltung der Ligninsulfonsäure zu Vanillin und Acetaldehyd untersucht [47]. Diese Spaltung wurde zuerst an Brauns Lignin und am DHP geprüft und danach für C-3 und C-2 markierte Coniferine bzw. ^{14}C -Methylkresol eingesetzt. Bei Zugabe von C-2-Coniferin und C-3-Coniferin wurden die in (10) dargestellten Ergebnisse erhalten.



Daraus ist ersichtlich, daß erstens beide Aldehyde aus derselben Seitenkettenkonfiguration stammen und zweitens, daß eine Verschmierung der Aktivität fast nicht eingetreten ist. Der Verdünnungsgrad entspricht durchaus der Erwartung, die Aktivität im inaktiven Teil liegt im Rahmen des experimentellen Fehlers. Allerdings haben die neuesten Versuche ergeben [52], daß auch hier wohl intermediär die Guajacylglycerin-äthergruppierung durchschritten wird.

Strukturchemische Betrachtungen zur Theorie der Äthanolyse, Acidolyse und Sulfiterung der Ligninseitenkette

In überzeugender Weise hatte E. Adler [48...50]

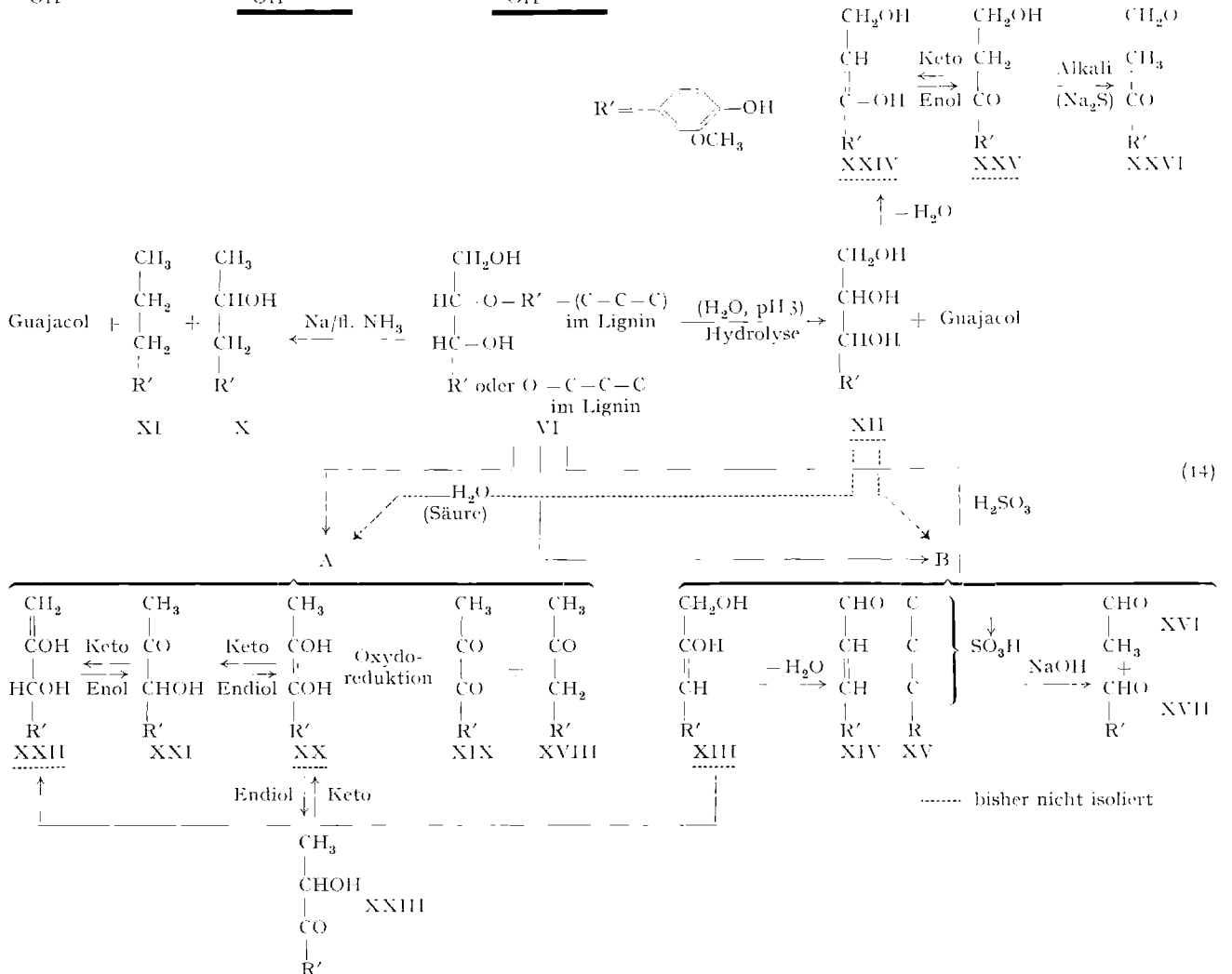


zeigt, daß diese Gruppierung Ursache der Äthanolysierbarkeit ist.

Etwa ein Drittel der Ligninseitenkettenkonfigurationen sollen nach diesen ausgezeichneten Arbeiten von E. Adler diese Konfiguration besitzen. K. Freudenberg zeigte in der Strukturaufklärung des Zwischenproduktes III, daß bei der biologischen Dehydrierung des Coniferylalkohols der β -Coniferyläther des Guajacylglycerins isoliert werden kann. Dies war übrigens die einzige Substanz, die von den Zwischenprodukten (I, II, III und IV) K. Freudenbergs die Äthanolyse Hibberts bei den eigenen Versuchen ergab [38...41]. Die theoretische Formulierung dieser Reaktion über Radikale (nach E. Adler ev. über Ionen) [1], die zu dieser Gruppierung führt, wäre etwa wie in (11) und (12) zu schreiben.

Die Äthanolyse würde dann so verlaufen:

Die von H. Hibbert [51] bewiesenen Umlagerungsreaktionen (13) wurden in jeder dieser hier beschriebenen Stufen exakt erhalten, so daß man heute über die Theorie der Äthanolyse recht gut Bescheid weiß. Diese vielen Endstufen wurden dann

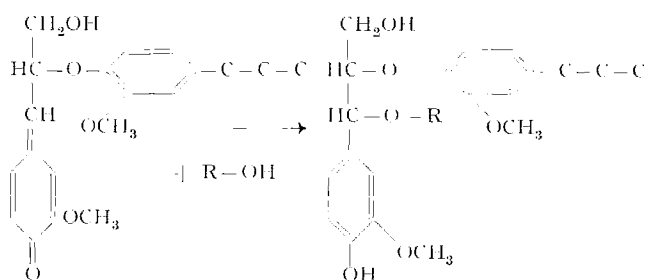


zur Diketonhauptstufe oxydiert. Gleichzeitig sei aber angefügt, daß mit dem β -Guajacyläther des Guajacylglycerins, für den eine neue Variante der Adlerschen Synthese ausgearbeitet wurde [52], zahlreiche hydrolytische und andere Versuche angestellt wurden und wie Formelbild (14) zeigt, sehr viele der bisher bekannten Ligninreaktionen mit dieser Gruppierung gedeutet werden können. Die bemerkenswerteste ist vielleicht der Übergang durch bloßes Kochen mit Wasser bei 175°C nach O. Goldschmidt [53] zum Coniferylaldehyd und den Hibbertschen Bausteinen. Auf der anderen Seite gab die Sulfittierung dieses Körpers unter Holmberg-schen Sulfittierungsbedingungen eine Sulfosäure, welche bei der alkalischen Spaltung unter Stickstoff in hohen Ausbeuten Vanillin und Acetaldehyd ergab [52]. In dem vorstehenden Formelschema (14) sind alle die vom Verfasser bisher untersuchten Reaktionen zusammengefaßt.

Die Sulfosäure XV wurde isoliert und analytisch definiert. Es dürfte sich um die α -Sulfosäure des Guajacylglycerin- β -guajacyläthers (Austausch der Benzylalkoholgruppe gegen die Sulfogruppe) handeln.

Bemerkenswert ist, daß dieser Gruppierung für die Spaltbarkeit zu Vanillin und Acetaldehyd eine überraschende Spezifität zukommt, da sowohl der unsulfitierte β -Äther als auch Guajacylglycerin bzw. dessen Sulfosäure, diese Spaltung nicht gibt [86].

Die β -Arylätherverknüpfung ist somit ein wichtiges Merkmal der Ligninkonstitution geworden. Daß auch in α -Stellung die Benzylalkoholgruppe, die für die Sulfittierung [48... 52] als wesentlich erkannt wurde, vorhanden ist, ist ein weiteres Verdienst der K. Freudenberg'schen Theorie bzw. seiner Arbeiten. In neuester Zeit gelang es K. Freudenberg [54], eine für die Ligninchemie besonders wichtige Reaktion zu deuten, nämlich die Anlagerung von hydroxylhaltigen Verbindungen an die Vorstufe der Zwischenstufe III, an die Chinonmethidverbindungen. Sowohl Wasser als auch Zucker bzw. Alkohol wurden hier angelagert, wobei im Falle des Alkohols der entsprechende Benzyläther und im Falle der Zucker ätherartig verknüpfte Zuckerverbindungen erhalten wurden.



Wenn R dimere Phenole sind, konnten so Tetramere isoliert werden [54].

Diese Chinonmethidreaktion wurde schon früher, insbesondere von E. Adler [1, 48... 50] untersucht, der deren fundamentale Bedeutung zuerst erkannte. K. Freudenberg [54] teilte mit, daß wenn R-OH Polysaccharidanteile des Holzes darstellen, und diese Einlagerung zu trifft, das Holz als Graftpolymeres zwischen den Kohlehydraten und Lignin aufgefaßt werden kann.

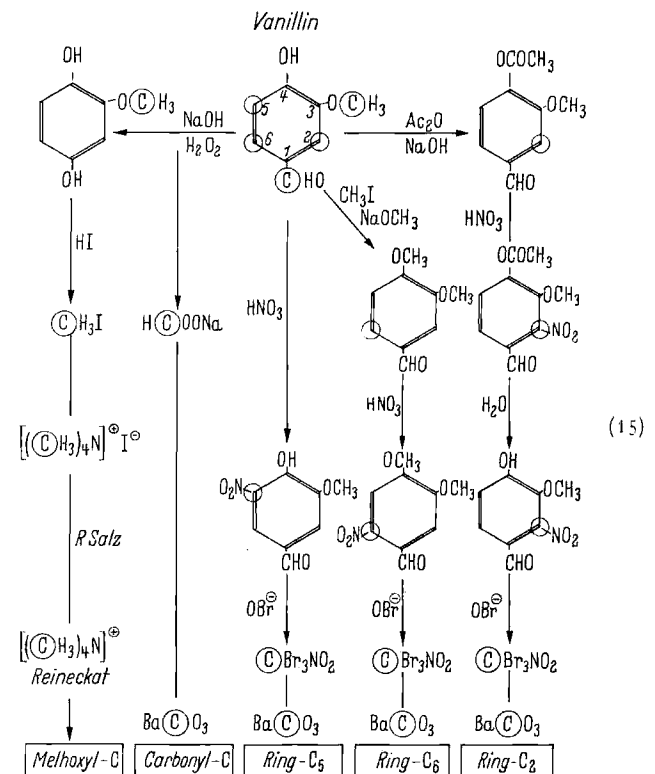
Da bei allen Versuchen, sowohl aus der Äthanolyse als auch aus der Sulfittierung die entsprechend markierten Ligninabbauprodukte, im ersten Fall das Diketon, im zweiten Fall Vanillin plus Acetaldehyd erhalten wurden, die C-Folge erhalten bleibt und keine Verschmierungen auftreten, erscheint der Übergang des der Pflanze zur Verfügung gestellten Coniferylalkohols in diese für das Lignin

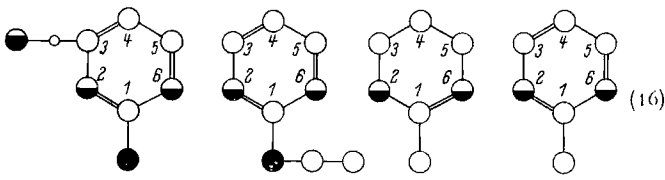
charakteristischste Seitenkettengruppierung gesichert. Aus den Verdünnungsgraden war auch ersichtlich, daß das Coniferin sehr rasch, also mit sehr niedriger Verdünnungsgrad, in einen Körper umgewandelt wird, der nach allen bisher untersuchten Ligninkriterien wohl als Lignin angesprochen werden kann, daß also die Theorie K. Freudenberg's vollauf zu Recht besteht. K. Freudenberg und die Heidelberger Schule haben namentlich durch Isolierung der Isohemipinsäure und durch den Übergang Phenylalanin-Coniferin-Lignin weitere sehr wichtige Beiträge zu der Stützung der Theorie gegeben [4... 7].

Die Bildung des aromatischen Ringes in der höheren Pflanze

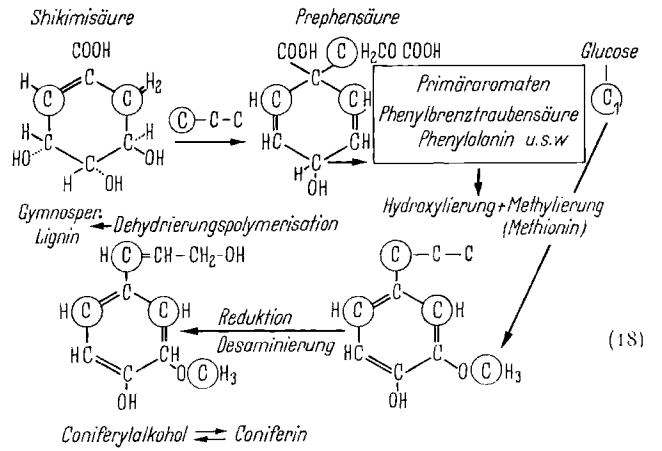
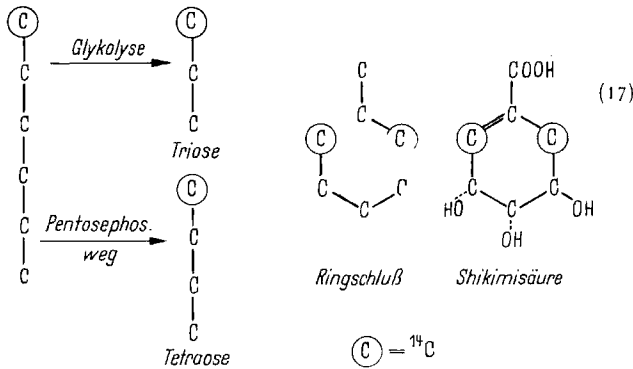
Nachdem so der Übergang des vorgegebenen Aromaten Coniferylalkohol zu Lignin bewiesen wurde, wurden weitere Arbeiten über den Aufbau des aromatischen Grundskelettes des Lignins in die Wege geleitet. Hier war schon wichtige Vorarbeit, namentlich von A. C. Neish [29... 33, 57, 58] und der Nordischen Schule [59, 60], geleistet worden. Es wurde bewiesen, daß Shikimisäure in Lignin eingebaut wird, daß z. B. spezifisch markierte Shikimisäure (2,6 markiert) ein 2,6 markiertes Lignin, das ein 2,6 markiertes Vanillin beim Abbau gibt, liefert [59, 60]. Die Bildung der Shikimisäure im bakteriellen Organismus verläuft über das sogenannte Davis-Sprinson-Schema, das heißt, daß vom Zucker ausgehend entsprechende Zwischenprodukte durchschritten werden, die diese spezifische Markierung erfordern. Weitere Arbeiten von J. A. Brown und A. C. Neish [29... 33] und K. Freudenberg [61, 62] zeigten, daß auch andere Verbindungen des Davisschen Schemas wie Phenylbrenztraubensäure, Phenylalanin und Tyrosin in Lignin umgewandelt werden. Trotz dieser Erkenntnis ist die Gültigkeit der Davis-Reaktionsfolge für die Biogenese der Ligninbausteine, besonders für den Aufbau der Phenylpropanseitenkette, noch nicht exakt bewiesen.

Zu diesem Zweck wurde D-Glukose 1-¹⁴C an Fichtenästchen infundiert [35... 36]. Durch Oxydation wurde ein Vanillin erhalten und in diesem die wichtigsten C-Atome bestimmt. Das Carbonyl-C wurde nach einem Dakinschen Abbau, Methoxyl-C nach einer Ätherspaltung und die Ring-C-Atome in den Positionen 2,5 und 6 wurden durch Hypobromitabbau von 2 bzw. 5-Nitrovanillin und 6-Veratrumaldehyd in Form von Tribromnitromethan erhalten. In (15)





D-Glucose-1-¹⁴C Einbau in Fichte



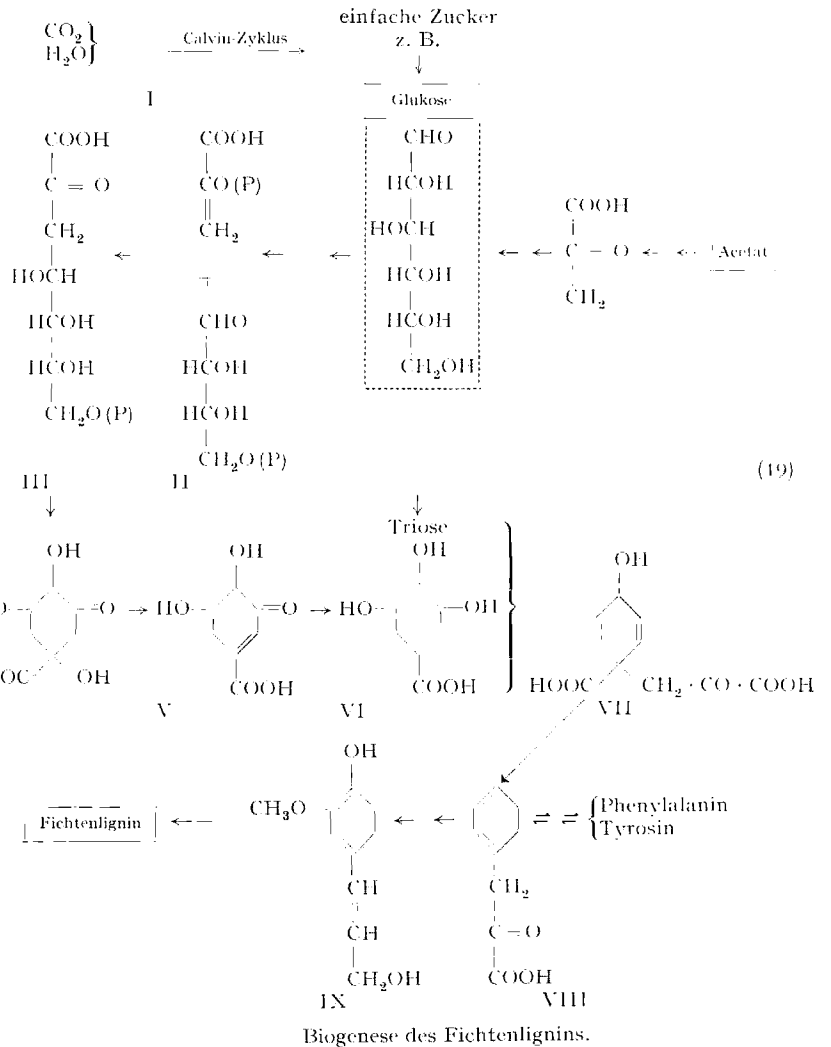
sagen über die Art der Biogenese sind jedoch daraus nicht abzuleiten. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß U. Byerrum [63] einen Bildungsweg vorschlägt, der von den Assimilationsprodukten ausgehend über Ribulose-5-Phosphat, Xylulose-5-Phosphat, Glykolsäure (bzw. Gly-

und (16) sind die Ergebnisse des Abbaues in Formeln zusammengefaßt.

Es ist so ersichtlich, daß im Vanillin dieselbe Aktivitätsverteilung wie im Phenylalanin in Tyrosin und, der Shikimisäure sowie der Protokatechusäure, die nach dem Davis-Schema durch unmittelbare Aromatisierung der 5-Dehydro-Shikimisäure entstehen, vorhanden ist. Die nachfolgenden kurz zusammengefaßten Schemata (17) und (18) sollen diesen Übergang des Zuckers in den Aromaten noch einmal kennzeichnen.

In Formeln ist der Übergang im folgenden darstellbar.

Bei der Aromatisierung über Prephensäure, also bei der normalen Phenylpropanverbindung, geht das Carboxyl-C der Shikimisäure, das in vorliegendem Fall inaktiv ist, verloren. An seine Stelle tritt ein über die Glykolysereaktion der Glukose entstammendes C-3 Bruchstück. Das neue C-Atom besitzt einen Aktivitätsbeitrag, der gleich groß ist wie die Summe der Aktivitäten der C-Atome 2 und 6 des Ringes. Vanillin zeigt diese charakteristische Aktivitätsverteilung. Die Propanseitenkette kann daher nicht durch eine C₆-C₁ + C₂ Kondensation, was im folgenden noch erörtert wird, biologisch aufgebaut werden. Mangels der 2 endständigen C-Atome ist die über Phenylbrenztraubensäure verlaufende Einführung der Seitenkette nicht exakt bewiesen, aber doch sehr wahrscheinlich gemacht. Das Methoxyl-C des Vanillins läßt sich in dieser vergleichenden Betrachtung nicht einbeziehen. Der hohe Aktivitätsanteil des Methoxyl-C läßt auf einen kurzen Bildungsweg schließen, genaue Aus-



- Biogenese des Fichtenlignins.
- I: Phosphoenolbrenztraubensäure,
 - II: n-Erythrose-4-phosphat,
 - III: 2-Keto-3-desoxy-7-phospho-D-Glucoheptonsäure,
 - IV: 5-Dehydrochinasäure,
 - V: 5-Dehydroshikimisäure,
 - VI: Shikimisäure,
 - VII: Prephensäure,
 - VIII: Phenylbrenztraubensäure,
 - IX: Coniferylalkohol.

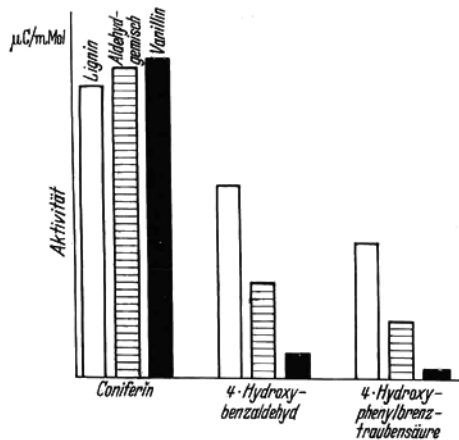


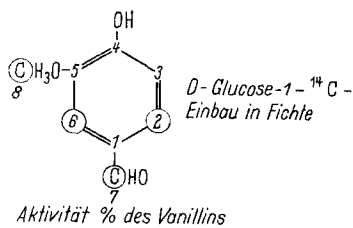
Bild 3. Vergleich der Aktivitäten von Lignin, Abbaualdehyden und Vanillin nach Infusion mit Coniferin, 4-Hydroxy-Benzaldehyd und 4-Hydroxy-Phenylbrenztraubensäure.

zerin oder Serin) zur Methoxygruppe führt. Gleichzeitig mit diesem Versuch hat die Schule F. F. Nord [64] denselben Versuch mit denselben Ergebnissen durchgeführt. Eine Gegenüberstellung dieser beiden Ergebnisse zeigt eine überraschend gute Übereinstimmung (20).

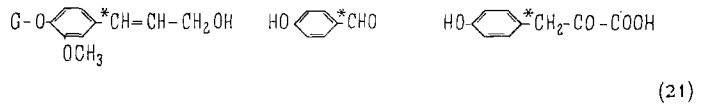
Die im Davis-Schema angeführte p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure scheint aber für die höhere Pflanze nicht unbedingt notwendig zu sein, obwohl F. F. Nord zeigen konnte, daß p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure von Zuckerrohr in einen ligninartigen Körper umgewandelt wird [65]. Der Verfasser u. M. konnten zeigen, daß bei Fichte p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure kein wirklicher Precursor sei [66...67].

Wie vorsichtig man bei der Auswertung von Isotopenversuchen sein muß, zeigen die folgenden Versuche mit p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. In gleicher Weise wurden Coniferin, p-Hydroxybenzaldehyd und p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure infundiert. Aus den nachfolgenden Formeln (21) und Bild 3 ist zu sehen, daß das Lignin stark aktiv war, die Summe der Abbaualdehyde noch immer beträchtliche Aktivität zeigte, daß es aber nach einer quantitativen papierchromatographischen bzw. dünnschichtchromatographischen Trennung, des Vanillins im Falle der p-Hydroxybausteine nur noch sehr wenig aktiv war. Da Vanillin das wichtigste Kriterium als Abbauprodukt des Fichtenlignins ist, ist dieses Infundierungsprodukt nicht als Lignin anzusprechen. Der Übergang findet wie auch A. C. Neish [25, 33, 34] gefunden hatte nur in Monocotyledonen statt.

Der bereits erwähnte Übergang eines C₆-C₁-Körpers in C₆-C₃-Körper, der auch von T. Higuchi [71, 72] besprochen wurde, spielt nur eine untergeordnete Rolle. T. Higuchi meint, daß die Arylpropanseitenkette durch Kondensation eines C₆-C₁-Körpers mit einem C₂-Körper etwa eines Oxyaldehydes und eines Acetaldehydes zur Acetoinbildung führt. Nun sind im Lignin Acetoinstruk-



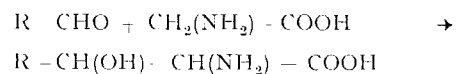
Vanillin		Vanillin	
○ C ₂	18,3	Vanillin	100
○ C ₅	4,0		18,2
○ C ₆	15,1		3,1
○ C ₇ (Carbonyl-C)	37,7		11,4
○ C ₈ (Methoxyl-C)	21,8		28,5
			31,1



Vanillin	„Aldehyde“	„Aldehyde“	
0,277	0,084	0,051	µC/m.M
↓ Papierchromatographische Reinigung ↓			
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{*}{\text{C}}\text{HO}$ OCH ₃	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{*}{\text{C}}\text{HO}$ OCH ₃	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{*}{\text{C}}\text{HO}$ OCH ₃	µC/m.M
0,283	0,022	0,008	
755	3800	24000	V.G.

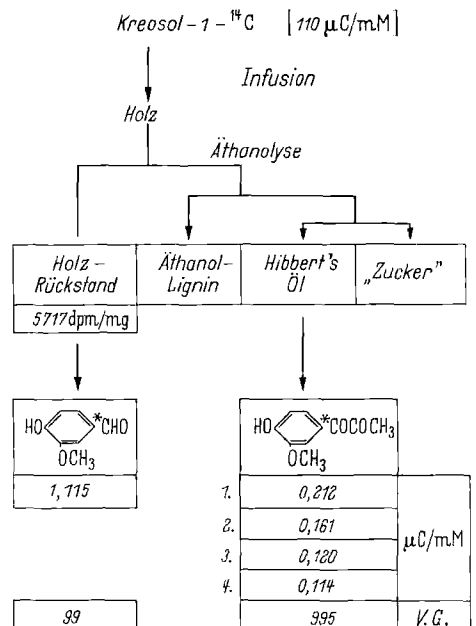
turen als solche nicht nachgewiesen worden (C-CH₃-Gruppierungen sind nur sehr wenige vorhanden), und außerdem ist diese Reaktion nicht allzu wahrscheinlich. Trotzdem deuten einige Versuche des Verf. u. M. darauf hin, daß eine C₆-C₁+C₂-Reaktion möglich ist. Es wurde der sicher sehr artfremde Precursor Kreosol, der an der Methylgruppe markiert war [73, 74], infundiert.

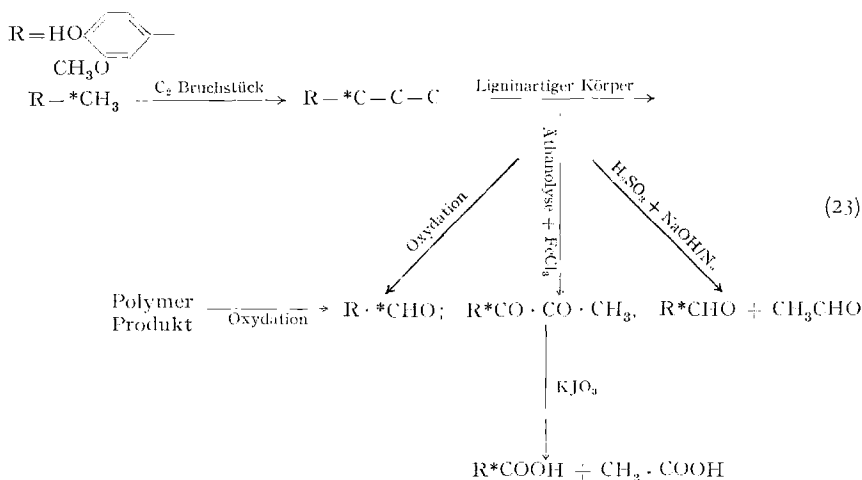
Die Fichtenästen zeigten im Kambium starke Verhaftung, und das daraus erhaltliche Lignin gab bei der Oxydation hohe Ausbeuten an aktivem Vanillin, was nicht sehr charakteristisch ist, da Kreosol allein Vanillin gibt. Es wurden aber auch in einem geringen Ausmaß Arylpropankörper, die durch die Äthanolyse als Diketon und durch die Sulfatierung und alkalische Spaltung als Vanillin plus Acetaldehyd identifiziert und zu isotopenkonstanten Produkten verarbeitet werden konnten, erhalten. Damit war bewiesen, daß die Pflanze in sehr untergeordnetem Maße die Fähigkeit besitzt, aus C₆-C₁-Körpern plus einem C₂-Körper, der ihrem Stoffwechsel entnommen wurde, die Arylpropanseitenkette aufzubauen. F. H. Bruns und L. Fiedler [75] entdeckten ein neues Enzym, eine Phenylserinaldolase, welche die Kondensation von Benzaldehyd mit Glycin katalysiert.



Dies könnte eine Möglichkeit des eben genannten Aufbaues der C₃-Kette sein.

Die Seitenkettenbildung aus C₆-C₁+C₂ scheint aber nicht der natürliche biologische Weg zu sein. Er geht, wenn





ein artfremder Precursor zur Verfügung gestellt wird und das nur in etwa 10%igem Ausmaß gegenüber einer Coniferin-Infusion. In den vorstehenden kurzen Formelbildern sind diese Vorgänge zusammengefaßt (22, 23).

Die Dünnschichtchromatographie zur Aufarbeitung von Ligninabbauprodukten

In den letzten zwei Jahren wurde von den Mitarbeitern G. Puschmann und H. Simon [76, 77] neben der Papierchromatographie vor allem die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Diese wurde von E. Stahl [78...81] zur Trennung organischer Substanzen erfunden und als sehr wichtig für analytische Zwecke beschrieben. In der Ligninchemie handelt es sich um Abbaualdehyde, die Hibbertschen Ketole und andere Produkte die sich aus dem Abbau ergeben. Man bereitet auf einer Glasplatte eine Suspension eines Adsorptionsmittels, vor allem Kieselgel - Calciumsulfat und läßt trocknen.⁴ Auf dieser 0,3 mm Schicht trägt man einen Startropfen von etwa 1...2 mg des Substanzgemisches auf, und durch Eintauchen der Glasplatte in ein Lösungsmittel wird das Dünnschichtchromatogramm entwickelt. In kurzer Zeit, etwa nach 1...2 Stunden, ist die Trennung vollendet. Die Vorteile gegenüber der Papierchromatographie, namentlich für Isotopenarbeiten sind: die größere auftragbare Menge, das anorganische Medium, dadurch die leichte Eluierbarkeit, die oft scharfen Trenneffekte und die Lokalisation der Substanz an einer kleinen Stelle, die besonders leicht mit dem Geigerzähler abzutasten ist. Auch können un-

⁴) Kieselgel G (Merck, Darmstadt, DBR.)

Zur Bildung des Angiospermenlignins

K. Freudenberg [4...7] konnte zeigen, daß Sinapinalkohol allein kein Dehydrierungspolymerisat bildet bzw. zu chinonartigen Verbindungen oxydiert wird. Mit K. Buchtela [82] wurde gefunden, daß ein Mischpolymerisat, bestehend aus Coniferylalkohol und Sinapinalkohol, wobei letzterer in C 3 markiert war, ein Angiospermen-DHP gibt, das nach Äthanolyse die radioaktiven Syringoylbausteine gab. Das bedeutet also, daß zumindest ein Teil des Syringabausteines so eingebaut ist, daß wieder die β -Arylätherbindung eine Rolle spielt.

In den folgenden Versuchen [83] wurde in Serie I Fichte (*Picea excelsa*) als Vertreter der Gymnospermen mit Syringin und Syringaaldehyd, also einem sehr unnatürlichen Precursor für Gymnospermen, und in Serie II Buchenholz (*Fagus sylvatica*) und Flieder (*Syringa vulgaris*) mit Coniferin versehen. Alle Substanzen waren in C 3 der Seitenkette markiert. Die Oxydation gab ein Gemisch der Oxyaldehyde, die Äthanolyse ein Gemisch der Diketone. Anhand der nachfolgenden Bilder, die aus Dünnschichtchromatogrammen stammen, konnte eindeutig gezeigt werden, daß in der Buche eine Methoxylierung in 5-Stellung eintritt, da sowohl Vanillin als auch Syringaaldehyd aktiv war und die Äthanolyse aktives Vanilloylacetyl und

Tabelle 1. Ungefähre R_f -Werte für verschiedene Abbau- und Äthanolyse-substanzen von Laub- und Nadelholzlignin bei Anwendung der Dünnschichtchromatographie.

Verbindung				Rf-Wert mit Lösungsmittel				Farbe mit diazotierter Sulfanilsäure
	X	Y	Z	A	B	C	D	
I Vanilloylacetyl	COCOCH ₃	OCH ₃	H	0,6	0,47			ocker
II Syringoylacetyl	COCOCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	0,39	0,32			orange
III p-Hydroxybenzoyl-acetyl	COCOCH ₃	H	H	0,67				gelb
IV Syringaaldehyd	CHO	OCH ₃	OCH ₃	0,35				rosa
V Vanillin	CHO	OCH ₃	H	0,58				rot
VI p-Hydroxybenzaldehyd	CHO	H	H	0,67				ocker
VII Syringasäure	COOH	OCH ₃	OCH ₃	0,24		0,23		dunkelrot
VIII Vanillinsäure	COOH	OCH ₃	H	0,28		0,38		orange
IX p-Hydroxybenzoesäure	COOH	H	H	0,31		0,48		gelb
X Ferulasäure	CH=CH	OCH ₃	H				0,41	rotbraun
XI Sinapinsäure		OCH ₃	OCH ₃				0,27	dunkelrot

Lösungsmittel: A = Isoamyläther (wassergesättigt) - n-Butylalkohol 3:1.

B = Methylenchlorid.

C = n-Butyläther (wassergesättigt) - Eisessig 10:1

D = n-Butyläther (wassergesättigt) - Ameisensäure 10:1

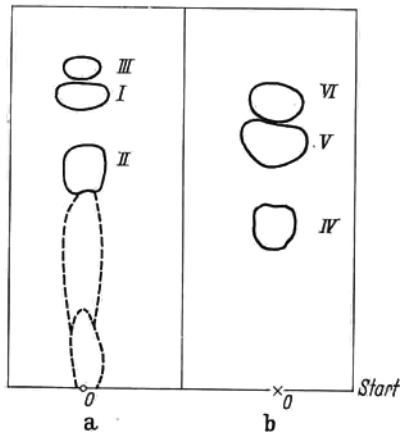


Bild 4. Trennungen verschiedener Abbausubstanzen von Laub- und Nadelholzlignin mit dem Lösungsmittelgemisch Isoamyl-äther (wassergesättigt) - n-Butanol 3:1. Je Streifen wurden 1 mg Substanzgemisch aufgetragen. Anfärbung mit: a NH_3 , b diazotierte Sulfanilsäure. I - VI s. Tab. 1.

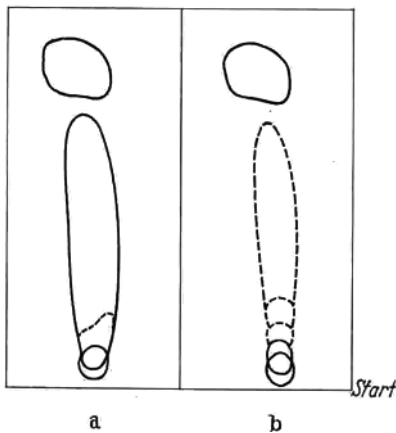


Bild 5. Dünnschichtchromatographische Trennung von Vanilloyl-acetyl und Syringoyl-acetyl nach Infusion von $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Coniferin in Buche; a Reproduktion, b Autoradiographie.

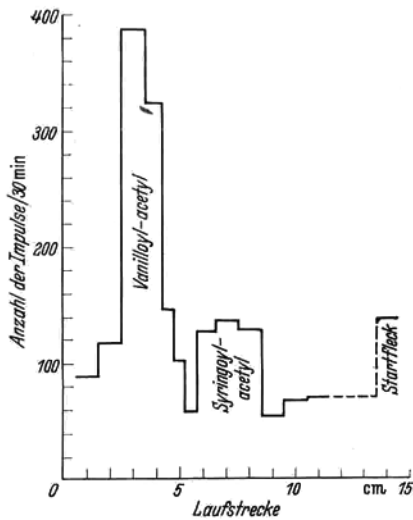


Bild 6. Dünnschichtchromatographische Trennungen von Äthanololysprodukten aus mit $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Coniferin infundierten 2jährigen Buchenästen.

Syringoyl-acetyl, lieferte. In den nachfolgenden Bildern 5 und 6 wird das Dünnschichtchromatogramm und die Auswertung durch Geigerzählermessung gezeigt.

Die Bilder 7 und 8 sollen Kontroll- und Blindversuche darstellen, bei denen bewiesen wird, daß radioaktives, synthetisch hergestelltes Vanilloyl-acetyl keinerlei Verschmierung im Dünnschichtchromatogramm aufweist, was auch einen großen Vorteil dieser Methode bedeutet.

Tabelle 2. Buche (Carbonyl- ^{14}C -syringaaldehyd-infusion).

	dpm/mg der Substanz	dpm/mMol der Substanz
Holz extrahiert	204	
Aldehydgemisch	427	74.730
Syringaaldehyd	664	120.850
Vanillin	91	13.840

Tabelle 3. Fichte (Carbonyl- ^{14}C -syringaaldehyd-infusion).

	dpm/mg der Substanz	dpm/mMol der Substanz
Holz extrahiert	2.445	
Aldehydgemisch	2.609	396.000
Vanillin	272	41.340

Tabelle 4. Fichte (Carbonyl- ^{14}C -syringaaldehyd-infusion) Aldehydgemisch.

	dpm/mg der Substanz	dpm/mMol der Substanz
nach 1. Spaltung	4.151	631.000
nach 2. Spaltung	2.605	396.100
nach 3. Spaltung	2.160	328.000
	2.149	326.500

Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, daß auch Syringabausteine von Gymnospermen aufgenommen werden. Die Autoradiographien zeigen, daß Syringin (Bild 9) und Syringaaldehyd (Bild 10) von Fichtenholz eindeutig im Kambium inkorporiert werden.

Auch hier wurden nicht nur die Abbaualdehyde, sondern auch die nach der Äthanololyse erhaltenen Diketone getrennt und bestimmt (Tabellen 2, 3, 4, 5).

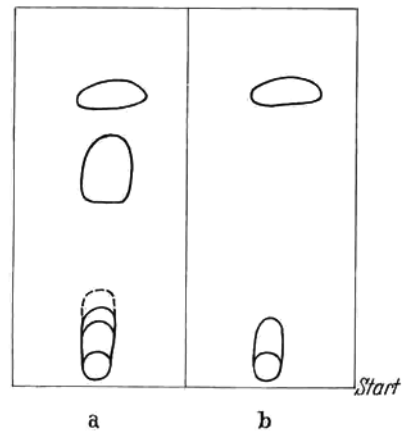


Bild 7. Dünnschichtchromatographische Trennung eines Gemisches aus aktivem Vanilloyl-acetyl und inaktivem Syringoyl-acetyl; a Reproduktion, b Autoradiographie.

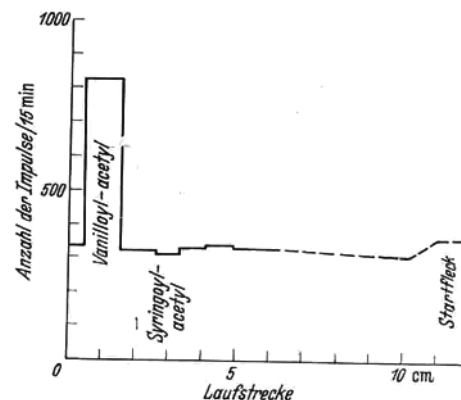


Bild 8. Dünnschichtchromatographische Trennung von synthetischem $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Vanilloyl-acetyl und nicht markiertem Syringoyl-acetyl.

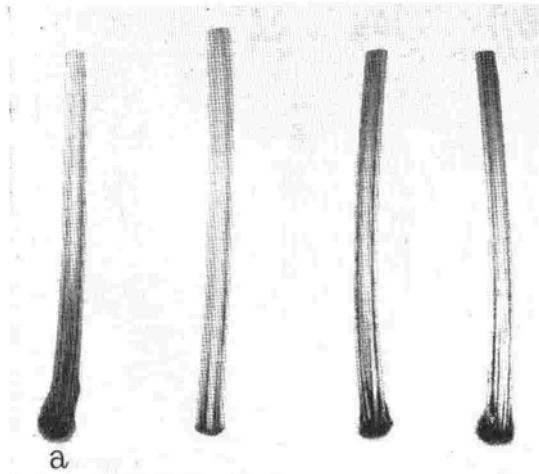


Bild 9. Autoradiographie eines Fichtenzweiges mit im Kambium eingelagertem Syringin (a in nicht extrahiertem Zustand).

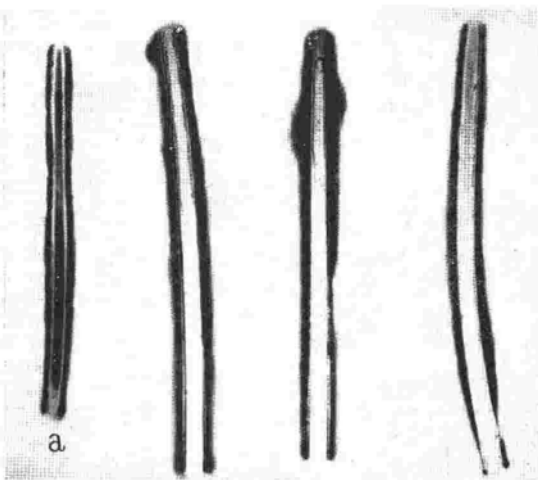


Bild 10. Autoradiographie eines Fichtenzweiges mit im Kambium eingelagertem Syringaaldehyd (a in nicht extrahiertem Zustand).

Es bildet sich somit in der Fichte ein Stoff, der qualitativ durchaus dem Angiospermenlignin ähnlich ist. Überraschenderweise wurde bei beiden eine Entmethoxylierung festgestellt, die in geringem Umfang vor sich geht. Aus den beigefügten Bildern ist die Aktivitätsverteilung in den Abbaualdehyden ersichtlich, wobei natürlich das Vanillin, nach Zugabe von Syringabausteinen, hier der interessanteste Stoff ist. Es wurde auch, wie aus den Tabellen 3 bis 5 ersichtlich ist, eine Isotopenkonstanz dieses kritischen Produktes erreicht. Dieser Vorgang wurde nach Wissen des Verfassers in solchen biologischen Systemen bisher noch nicht beobachtet. Grundsätzlich ist es also möglich, in Fichtenholz, durch Zugabe von Syringin einen Körper zu erzeugen, der nach den radioaktiven Abbauprüfungen als dem Angiospermenlignin ähnlich angesehen werden kann. Es sind zur Zeit Untersuchungen im Gange, dies auch in größerer Menge mit inaktivem Material für botanische Zwecke zu untersuchen.

Tabelle 5. Fichte (Carbonyl- ^{14}C -syringaaldehydinfusion) Vanillin nach Trennung m. d. Dünnschichtchromatographie.

	dpm/mg der Substanz	dpm/mMol der Substanz
nach 1. Spaltung	304	46.250
nach 2. Spaltung	275	41.800
nach 3. Spaltung	272	41.360
nach 3. Spaltung	272	41.360

Schlußbetrachtung

Obwohl die Pflanze viele phenolische Inhaltsstoffe darstellen kann, die sehr verschiedenartige Gruppierungen und Substitutionen im aromatischen Kern aufweisen, ist doch das Lignin hinsichtlich der aromatischen Substitution sehr einfach gebaut. Es hat nur den p-Hydroxybaustein, der von einer oder zwei Methoxylen flankiert ist. Alle anderen Gruppierungen scheiden aus. Es scheint somit ein recht spezifisches Enzymsystem vorhanden zu sein, das diese Methoxylierung im biologischen Geschehen vor sich gehen läßt. Nach all diesen Versuchen glauben der Verfasser u. M., daß dies ziemlich früh eintritt, vielleicht an der primäraromatischen Stufe, z. B. des Phenylalanins oder der Phenylbrenztraubensäure. Ist einmal die p-Hydroxygruppierung mit der Zimtalkoholseitenkette entstanden, dann treten diese mit den unspezifischen Enzymen des Lakkasetypus in Reaktion, die den gebildeten p-Hydroxycumaralkohol, Coniferyl- oder Sinapinalkohol in der von K. Freudenberg angegebenen Art zu Lignin dehydrieren. Die p-Hydroxycumaralkoholstufe ist somit eine essentiell notwendige Zwischenstufe, denn aus ihr können die wichtigsten Ligninkriterien und Erscheinungen durch biologische Dehydrierung erklärt werden.

In einem Kolloquium der Universität Tokio lernte der Verfasser die Arbeit von Y. Kyogoku, S. Fujii und Y. Hachima [84] kennen, bei welcher der p-Hydroxybaustein, einkondensiert in das Buchenlignin, durch Abbau zu den entsprechend substituierten Säuren (z. B. Methoxytrimesinsäure) bewiesen wurde. Die neueste Arbeit von K. Freudenberg und Chen-Loung-Chen [85] liefert einen ähnlichen Beweis für das Fichtenlignin. Man kann demnach schätzen, daß etwa 10% p-Hydroxybausteine im Lignin vorhanden sind.

Ob die entsprechenden Glukoside wirklich essentielle Zwischenstufen sind, sei dahingestellt. Verfasser u. M. neigen eher zu der Ansicht, daß sie eine Art Depotsubstanz bei Überangebot der äußerst reaktionsfähigen p-Hydroxycumaralkohole darstellen, dann in den Zellsaft abschwimmen und im Falle der Lignifizierung durch die Glukosidase gespalten und die Alkohole weiter für den Ligninaufbau verwendet werden. Die essentielle Zwischenstufe ist aber p-Hydroxycumaralkohol bzw. dessen methoxy-substituierte Derivate wie Coniferylalkohol oder Sinapinalkohol.

Zusammenfassung

Es werden die Isotopenarbeiten der Wiener Gruppe zur Biogenese des Lignins beschrieben.

Die Synthese von aromatischen Vorstufen und Abbauprodukten sowie mikroanalytische Methoden, die aus den aktiven Ligninen definierte Abbauprodukte erhalten ließen, wurden aufgezeigt. Hierzu wurden insbesondere die Oxidation, die Äthanolyse und die alkalische Spaltung der Ligninsulfosäure herangezogen (Papier- und Dünnschichtchromatographie).

Es wurden erstmalig definierte Phenylpropane isoliert und gezeigt, daß die K. Freudenbergsche Theorie zu Recht besteht, was aus den Versuchen *in vitro* der Heidelberger Schule und deren Isotopenexperimenten zu erwarten war. Eine quantitative Isotopenbilanz konnte aufgestellt und durch Verfolgung der einzelnen C-Atome festgestellt werden, daß keine Verschmierung auftritt.

Ein Aufbau der Seitenkette konnte als Nebenreaktion durch den Weg $\text{C}_6-\text{C}_1 + \text{C}_2$ gekennzeichnet werden.

Zur Frage der Entstehung der Aromaten in höheren Pflanzen, wurde Glucose-1- ^{14}C infundiert. Glucose-1- ^{14}C gab in Fichte ein zu Vanillin abbaufähiges Lignin, dessen wichtigste C-Atome quantitativ bestimmt wurden (Akti-

vitätsbilanz). Es konnte so das Davissche Schema für die höhere Pflanze bewiesen werden. Gleichzeitig wurde von der Gruppe F. F. Nord dieser Versuch durchgeführt, wobei der Vergleich überraschende Übereinstimmung zeigte. Der Aufbau der Seitenkette, über die Prephenensäure, und Methoxylierungsprobleme werden erörtert. Infusionsversuche mit artfremden aromatischen Vorstufen (z. B. Syringin in Fichte) zeigten die Fähigkeit der Pflanze zu methoxylieren, aber auch zu entmethoxylieren, bzw. einen ligninartigen Körper daraus zu synthetisieren. Über die Spezifität der an der Verholzung beteiligten Fermente wird an Hand dieser Versuche diskutiert.

Summary

Studies of the Vienna Group on the biogenesis of lignin by means of isotopes are described. The synthesis of aromatic precursors and degradation products as well as micro-analytical methods allowing identification of defined degradation products from active lignins are described.

For this purpose especially oxidation, ethanolysis and alkaline cleavage of lignin sulphonic acids were used; separation was achieved by paper and thin-layer chromatography.

For the first time defined phenylpropane derivatives were isolated justifying K. Freudenberg's theory, a justification which was to be anticipated after the in vitro and isotopic experiments of the Heidelberg School. A quantitative balance of the activity was established. Activity measurements of the single C-atoms in the degradation products showed that no blurring occurs.

It was shown that the formation of the side chain is possible in a side reaction via $C_6 - C_1 + C_2$.

To answer the question of how aromatic compounds are formed in higher plants, infusion experiments with spruce were undertaken. Infusion of glucose-1- ^{14}C yielded lignin degradable to vanillin. The activity of the essential C-atoms of this degradation product was determined. Thus the Davis scheme could be proved for higher plants.

At the same time the same experiments were carried out by the group F. F. Nord. A comparison of the results shows surprising correlation. The formation of the side chain via prephenic acid and the subsequent transformation of aromatic and phenolic compounds into methoxylated substances is discussed.

Infusion experiments of substances not naturally occurring in these species (e. g. infusion of syringin into spruce) showed the ability of plants to attack and remove $-OCH_3$ groups and therefore to synthesize substances similar to lignin. The specificity of enzymes involved in the lignification is discussed on the basis of these experiments.

Schrifttum

1. Kratzl, K., u. G. Billek.: *Biochemistry of Wood*. London 1959: Pergamon Press. — 2. Erdtman, H.: Dehydrierungen in der Coniferylreihe (I). *Dehydrodiogenol und Dhydrodiisoeugenol*. *Biochem. Z.* Bd. **258** (1933) S. 172/180. — 3. Erdtman, H.: Dehydrierungen in der Coniferylreihe (II). *Dehydrodiisoeugenol*. *Liebigs Annalen* Bd. **503** (1933) S. 283/294. — 4. Freudenberg, K.: Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe. *Angew. Chem.* Bd. **68** (1956) S. 84/92. — 5. Freudenberg, K.: Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete des Lignins und der Verholzung. *Fortschr. d. Chemie organ. Naturstoffe* Bd. B **11** (1954) S. 43/82. — 6. Freudenberg, K., H. Reznik, W. Fuchs u. M. Reichert: Untersuchung über die Entstehung des Lignins und des Holzes. *Naturwissenschaften* Bd. **42** (1955) S. 29/35. — 7. Freudenberg, K.: Vergleichende Untersuchungen des natürlichen und biosynthetischen Lignins. *Journ. prakt. Chem.* Bd. **10** (1960) S. 220/238. — 8. Freudenberg, K., u. H. Bittner: Versuche mit Coniferylalkohol, der radioaktiven Kohlenstoff enthält. *Chem. Ber.* Bd. **86** (1953) S. 155/159. — 9. Kratzl, K., u. G. Billek: Die Synthese des mit ^{14}C markierten Coniferins. *Mh. Chemie* Bd. **84** (1953) S. 406/414. — 10. Kratzl, K., u. G. Billek: Über die Synthese von mit ^{14}C markierten Lignin-

bausteinen. *Holzforschung* Bd. **7** (1953) S. 66/70. — 11. Kratzl, K.: Über Assimilationsversuche mit $^{14}CO_2$ und die Synthese des mit ^{14}C markierten Coniferins. *Abstracts of Papers, XIIIth Int. Congress of Pure and Applied Chem.* S. 253/254 Stockholm 1953. — 12. Kratzl, K.: Biochemische Versuche zum Studium der Verholzung mit radioaktivem Kohlenstoff. (Kurzfederat). *Holzforschung* Bd. **7** (1953) S. 123. — 13. Kratzl, K., u. G. Billek: Die Synthese des mit ^{14}C am C_3 der Seitenkette markierten p-Cumaralkoholglucosides und des Syringins. *Mh. Chemie* Bd. **85** (1954) S. 845/855. — 14. Kratzl, K., u. G. Billek: Zur Biogenese des Lignins. *Holzforschung* Bd. **10** (1956). S. 161/178. — 15. Kratzl, K., u. G. Billek: Synthesis and Testing of Lignin Precursors. *Tappi* Bd. **40** (1957) S. 269/285. — 16. Billek, G., u. E. F. Herrmann: Zur Synthese carbonylmarkierter fettaromatischer Ketone. *Mh. Chemie* Bd. **88** (1957) S. 735/738. — 17. Silbernagel, H.: Über die Spaltbarkeit von m-Nitrobenzhydrazonen und Vanillinsäurehydrazonen bzw. p-Oxybenzoesäurehydrazonen. *Mh. Chemie* Bd. **86** (1955) S. 256/258. — 18. Kratzl, K.: Über die Konstitution der Ligninsulfosäure. *Mh. Chemie* Bd. **78** (1948) S. 173/174. — 19. Kratzl, K.: Neue Synthesen und Reaktionen fettaromatischer Sulfosäuren. *Österr. Chem. Ztg.* Bd. **49** (1948) S. 143/149. — 20. Kratzl, K., u. F. Rettenbacher: Über das Bauprinzip der Seitenketten der Ligninsulfosäuren. 4. Mittlg. *Mh. Chemie* Bd. **80** (1949) S. 622/633. — 21. Wacek, A. v., K. Kratzl, u. A. v. Bezdard: Über die Synthese von Modellsubstanzen für die Ligninsulfosäuren. Synthese von α -Phenylaceton- α -sulfosäure und Propioveratron- α -sulfosäure. *Chem. Ber.* Bd. **75** (1942) S. 1348/1357. — 22. Wacek, A. v., u. K. Kratzl: Constitution of the Side Chains of Lignin. *Journ. Polym. Sc.* Bd. **3** (1948) S. 539/548. — 23. Kratzl, K.: Über die Synthesen von Modellsubstanzen für die Ligninsulfosäuren, 2. Mittlg.: Über einige in der Seitenkette sulfurierte Propiophenonderivate. *Chem. Ber.* Bd. **76** (1943) S. 895/900. Ders.: Über die Synthesen von Modellsubstanzen für die Ligninsulfosäuren, 3. Mittlg.: Über eine Sulfosäure, die sich von einer durch Verätherung von zwei Phenylpropanbausteinen verknüpften Grundverbindung ableitet. *Chem. Ber.* Bd. **77** (1944) S. 717/722. — 24. Kratzl, K., u. H. Däubner: Über die Sulfittkochen von Phenylpropanderivaten und Chalkonen. *Chem. Ber.* Bd. **77** (1944) S. 519/527. — 25. Kratzl, K.: Die Ligninsulfosäure und ihre technische Verwertung. *Experientia* Bd. **11** (1946) S. 469/476. — 26. Kratzl, K., u. I. Khautz: Über das Bauprinzip der Seitenketten der Ligninsulfosäuren, 1. Mittlg.: *Mh. Chemie* Bd. **78** (1948) S. 376/391. 2. Mittlg.: S. 392/405. 3. Mittlg.: S. 406/410. — 27. Kratzl, K.: Formaldehyd als Produkt der alkalischen Spaltung von Ligninsulfosäure. *Mh. Chemie* Bd. **80** (1949) S. 314/315. — 28. Kratzl, K., u. I. Keller: Über das Bauprinzip der Seitenkette von Ligninsulfosäure, 5. Mittlg. *Mh. Chemie* Bd. **83** (1952) S. 197/204. Ders.: Über die Sulfittierung von Ligninpräparaten und Spaltung der gebildeten Ligninsulfosäuren zu Vanillin und Acetaldehyd. *Mh. Chemie* Bd. **83** (1952) S. 205/209. — 29. Brown, S. A., u. A. C. Neish: The Biosynthesis of Cell-Wall Carbohydrates. Glucose- C^{14} as a Cellulose Precursor in Wheat Plants. *Can. J. Biochem. Phys.* Bd. **32** (1954) S. 170/177. — 30. Brown, S. A., A. C. Neish, F. M. Claire, u. M. D. Chisholm: Studies of Lignin Biosynthesis with Isotopic Carbon (IV). Formation from Some Aromatic Monomers. *Can. J. Biochem. Phys.* Bd. **33** (1955) S. 948/962. — 31. Brown, S. A., u. A. C. Neish: Studies of Lignin Biosynthesis Using Isotopic Carbon. (V). Comparative Studies on Different Plant Species. *Can. J. Biochem. Phys.* Bd. **34** (1956) S. 769/778. — 32. Wright, D., S. A. Brown, u. A. C. Neish: Studies of Lignin Biosynthesis with Isotopic Carbon. (VI). Formation of the Side Chain of the Phenylpropane Monomer. *Can. J. Biochem. Phys.* Bd. **36** (1958) S. 1037/1045. — 33. Brown, S. A., u. A. C. Neish: Shikimic Acid as a Precursor in Lignin Biosynthesis. *Nature* Bd. **175** (1955) S. 688/689. — 34. Kratzl, K., u. H. Faigle: Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze. *Mh. Chemie* Bd. **89** (1958) S. 708/715. — 35. Kratzl, K., u. H. Faigle: Der Einbau von D-Glukose- ^{14}C in das Phenylpropangerüst des Fichtenlignins. *Mh. Chemie* Bd. **90** (1959) S. 768/770. — 36. Kratzl, K., u. H. Faigle: Die Biogenese der Phenylpropan-Einheit des Fichtenlignins. *Z. f. Naturforschung* Bd. **156** (1960) S. 4/11. — 37. Buchtele, K.: Versuche mit radioaktiv markierten Verbindungen zur Biogenese des Gymnospermen- und Angiospermenlignins. *Diss. Universität Wien* 1957. — 38. Kratzl, K., u. W. Schweers: Über die papierchromatographische Trennung der monomeren Äthanolyseprodukte des Lignins, 1. Mittlg. *Mh. Chemie* Bd. **85** (1954) S. 1046/1054; 2. Mittlg. *Mh. Chemie* Bd. **85** (1954) S. 1166/1169. — 39. Kratzl, K., u. G. Billek, W. Schweers: Über die Umwandlung von $^{14}C_3$ -Coniferin in der verholzenden Pflanze. *Referatenband des XIV^{ten} Internat. Kongresses für*

reine und angewandte Chemie, S. 377. Zürich 1955. — 40. Kratzl, K., u. W. Schweers: Über die papierchromatographische Trennung der monomeren Äthanolyseprodukte des Lignins, 3. Mittlg. Chem. Ber. Bd. **89** (1956) S. 186/192. — 41. Kratzl, K.: Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins. Mikrochemica Acta Jg. **1956**, S. 159/170. — 42. Kratzl, K., G. Billek, E. Klein, u. K. Buchtela: Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze, 1. Mittlg. Mh. Chemie Bd. **88** (1957) S. 721/734. — 43. Kratzl, K., u. E. Klein: Über die Isolierung definierter Guajacylpropanketone aus Fichtensulfitaubleuge. Chemie Bd. **86** (1955) S. 847/852. — 44. Kratzl, K., G. Billek, A. Graf, G. Hofbauer, K. Buchtela, u. E. Klein: Über den Nachweis von ¹⁴C-markierten Guajacylketonen in Ligninen. (Vortragsberichte). Angew. Chemie Bd. **68** (1956) S. 384. Österr. Chem. Ztg. Bd. **57** (1956) S. 137. — 45. Kratzl, K., u. P. Claus: (unveröffentlicht). — 46. Higuchi, T.: The Chemical Properties of the Lignin of Bamboo Stalk. Journ. of Biochemistry Bd. **45** (1958) S. 675/685. — 47. Kratzl, K., u. G. Hofbauer: Über den alkalischen Abbau von Ligninsulfonsäuren aus Freudenberg's DHP und Brauns Nativlignin. Mh. Chemie Bd. **87** (1956) S. 617/624. Ders.: Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze, 2. Mittlg. Mh. Chemie Bd. **89** (1958) S. 96/101. — 48. Adler, E., u. S. Yllner: Synthesis and Reactions of α -(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-glycerol („Guajacylglycerol“) II. Synthesis. Acta Chem. Scand. Bd. **7** (1953) S. 570/581. — Ders.: Synthesis and Reactions of α -(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-glycerol (Guajacylglycerol) III. Sulfonation and Ethanolysis. Sv. Papperstidn. Bd. **57** (1954) S. 78/82. — 49. Adler, E., u. K. J. Björquist: Synthese von 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-glycerol. Acta Chem. Scand. Bd. **5** (1951) S. 241/252. — 50. Adler, E., B. O. Lindgren, u. V. Saeden: Der β -guajacyl-ether of α -veratrylglycerol as a Lignin Model. Sv. Papperstidn. Bd. **55** (1952) S. 245/254. Siehe auch [1] Zusammenfassung E. Adler, S. 137. — 51. Mitchell, L., u. H. Hibbert: Studies on Lignin and Related Compounds. LXXX. The Ethanolysis of 1-Acetoxy-1-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone and its Relation to Lignin Structure. J. Amer. Chem. Soc. Bd. **66** (1944) S. 602/604. — 52. Kratzl, K., W. Kissler, J. Gratzl, u. H. Silbernagel: Der β -Guajacyläther des Guajacylglycerins, seine Umwandlung in Coniferylaldehyd und verschiedene andere Arylpropanerivate. Mh. Chemie Bd. **90** (1959) S. 771/782. — 53. Goldschmid, O.: Aqueous Hydrolysis of lignin. I. Paperchromatographic Separation of Monomeric Lignin-Degradation Products. Tappi Bd. **38** (1955) S. 728/732. — 54. Freudenberg, K.: The Formation of Wood and Lignin. 5th World Congress of Forestry, Abstracts of Papers GP/105/VI/C, S. 1/2. Seattle 1960. — 55. Freudenberg, K., u. B. Lehmann: Aldehydische Zwischenprodukte der Ligninbildung. Chem. Ber. Bd. **93** (1960) S. 1354/1366. — 56. Freudenberg, K., u. A. Sakakibara: Weitere Zwischenprodukte der Bildung des Lignins. Liebigs Annalen Bd. **623** (1959) S. 129/137. — 57. Neish, A. C.: Biosynthetic Pathways of Aromatic Compounds. An. Review of Plant Physiol. Bd. **11** (1960) S. 55/80. — 58. MacCalla, D. R., u. A. C. Neish: Metabolism of Phenylpropanoid Compounds in Salvia. II. Biosynthesis of Phenolic Cinnamic Acids. Can. J. Biochem. and Phys. Bd. **37** (1959) S. 537/547. — 59. Nord, F. E., u. W. J. Schubert: The Biochemical Disintegration of Wood and the Mechanism of Lignification. 5th World Congress of Forestry, Abstr. of Papers GP/56/VI/C, S. 1/8. Seattle 1960. — 60. Eberhard G., u. W. J. Schubert: Investigations on

Lignin and Lignification. XVII. Evidence for the Mediation of Shikimic Acid in the Biosynthesis of Lignin Building Stones. J. Amer. Chem. Soc. Bd. **78** (1956) S. 2835/2837. — 61. Freudenberg, K.: Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe. Angew. Chem. Bd. **68** (1956) S. 84/92. — 62. Freudenberg, K., u. F. Niedercorn: Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins, VIII. Mittlg.: Umwandlung des Phenylalanins in Coniferin u. Fichtenlignin. Chem. Ber. **91** (1958) 591/597. — 63. Hamill, R. L., R. U. Byerrum, u. C. D. Ball: A Study of the Biosynthesis of the Methoxyl Groups of Lignin in Tobacco Plants. J. biol. Chemistry Bd. **224** (1957) S. 713/716. — 64. Schubert, W. J., u. S. N. Acerbo: Conversion of D-Glucose into Lignin in Norwegian Spruce. A Preliminary Report. Arch. of Biochem. and Biophys. Bd. **83** (1959) S. 178/182. — 65. Acerbo, S. N., W. J. Schubert, u. F. E. Nord: Investigations on Lignin and Lignification. XIX. The Mode of Incorporation of p-Hydroxyphenyl-pyruvic Acid into Lignin. J. Amer. Chem. Soc. Bd. **80** (1959) S. 1990/1992. — 66. Billek, G.: in [1], S. 207. — 67. Kratzl, K., u. G. Billek: Über das Verhalten der 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure im verholzenden Gewebe der Fichte. Mh. Chemie Bd. **90** (1959) S. 536/543. — 68. Billek, G., u. E. F. Herrmann: Die Synthese der 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure(-³⁻¹⁴C). Mh. Chemie Bd. **90** (1959) S. 89/95. — 69. Neish, A. C. in [1], S. 213. — 70. Brown, S. A., D. Wright, u. A. C. Neish: Studies of Lignin Biosynthesis Using Isotopic Carbon. VII. The Role of p-Hydroxyphenyl-pyruvic Acid. Can. J. Biochem. and Phys. Bd. **37** (1959) S. 25/34. — 71. Higuchi, T. in [1], S. 161. — 72. Higuchi, T.: Biochemical Studies on Lignin Formation. II. Phys. Plant Bd. **10** (1957) S. 621/632. — 73. Kratzl, K., W. Kissler, A. Graf, u. G. Hofbauer: Studien zum biologischen Aufbau der Seitenketten von Phenylpropanen. Mh. Chemie Bd. **90** (1959) S. 526/535. — 74. Kratzl, K., G. Billek, A. Graf, u. W. Schweers: Über die Synthese von mit ¹⁴C markierten Vorstufen und Abbauprodukten des Lignins. Mh. Chemie Bd. **87** (1956) S. 60/70. — 75. Bruns, F. H., u. L. Fiedler: Enzymic Cleavage and Synthesis of L-threo- β -phenylserine and L-erythro- β -phenylserine. Nature Bd. **181** (1958) S. 1533/1534. — 76. Kratzl, K., u. G. Puschmann: Präparative Trennungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Holzforschung Bd. **14** (1960) S. 1/4. — 77. Simon, H.: Zur Biogenese des Angiospermenlignins. Diss. Universität Wien 1960. — 78. Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. (Methode, Einflüßfaktoren und einige Anwendungsbeispiele). Pharmazie Bd. **11** (1956) S. 633/637. — 79. Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. II. Standardisierung, Sichtbarmachung, Dokumentation und Anwendung. Chemikerztg. Bd. **82** (1958) S. 323/329. — 80. Grisebach, H., u. N. Doerr: Zur Biogenese des 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavons. Naturwissenschaften Bd. **46** (1959) S. 514. — 81. Marchata, G.: Dünnschichtchromatographie als klinische Untersuchungsmethode. Wiener Klin. Wochenschr. Bd. **71** (1959) S. 301/302; Ders.: Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie. Mikrochimica Acta Jg. **1960**, S. 79/86. — 82. Kratzl, K., u. K. Buchtela: Zur Biogenese des Angiospermenlignins. Mh. Chemie Bd. **90** (1959) S. 1/6. — 83. Kratzl, K.: On the Biosynthesis of Gymnospermae and Angiospermae Lignins. Tappi Bd. **43** (1960) S. 650/653. — 84. Kyogoku, F. S., u. Y. Hachihama: Privatmitteilung. — 85. Freudenberg, K., u. Chen-Loung-Chen: Methylierte Phenolcarbonsäuren aus Lignin. Chem. Ber. Bd. **93** (1960) S. 2533/2539. — 86. Kratzl, K., E. Wittmann, u. E. Risnyovszky (unveröffentlicht).

Die wichtigsten mechanischen und technologischen Eigenschaften von Flachschäbenplatten

Mechanical and Technological Properties of Flax Board

Von M. Lawniczak, K. Nowak und St. Zieliński

Mitteilung des Institutes für Mechanische Holztechnologie der Landwirtschaftlichen Hochschule, Poznań

Einleitung — Versuchsmaterial — Prüfverfahren — Versuchsergebnisse — Vergleich der Eigenschaften verschiedener Flachschäben- und Holzspanplatten — Anwendungsmöglichkeiten — Zusammenfassung — Schrifttum.

Einleitung

Die zweckmäßige Verwertung von Abfällen ist für jeden über Abfälle verfügenden Industriezweig von außerordent-

licher Bedeutung. Dieser Aufgabe muß um so größere Wichtigkeit beigemessen werden, je größer der Anteil der Abfälle im Verhältnis zum verarbeiteten Rohstoff ist. Die Flachs- und Hanfstroh verarbeitende Industrie stellt das Beispiel eines sehr ungünstigen Verhältnisses von Abfällen zum Ausgangsrohstoff dar. Folgende Zahlen veranschaulichen die diesbezügliche Lage Polens [1] in den vergangenen und kommenden Jahren.