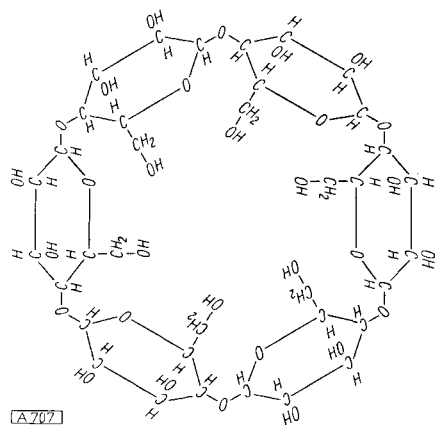


$\alpha$ -glucosidisch miteinander verknüpft sind. Diese Ringe sind nicht Bestandteile der Stärke-Molekeln, sondern entstehen auf Grund der schraubenförmigen Anordnung der großen Molekel beim fermentativen Abbau durch Umglicosidierung.



$\alpha$ -Schardinger-Dextrin = Cyclo-hexaglucon

Besondere Schwierigkeiten hatte die Eigenschaft der Schardinger-Dextrine gemacht, in manchen Fällen kleine Molekeln, z. B. Lösungsmittelmolekeln, fest zu halten. Freudenberg erklärte dies so, daß bei geeigneter Ringweite diese Molekeln in den Ring aufgenommen und dort festgehalten werden. So waren die ersten Einschlußverbindungen entdeckt worden. Freudenberg fand, daß auch das Anfärben der Stärke mit Jod auf solchen Einschlußverbindungen beruht.

Überblickt man die Erfolge der Arbeiten von Freudenberg auf dem Gebiet der Kohlenhydrate und auf den anderen von ihm bearbeiteten Gebieten, so empfindet man Freude und Dankbarkeit für diese großen Leistungen. Sorgfältige experimentelle Arbeit und die ideenreiche Auswertung der Ergebnisse haben zu diesen Erfolgen geführt. Sie haben nicht nur schwebende Fragen gelöst oder zu ihrer Lösung beigetragen, sondern auch neue Fragen aufgeworfen, deren Lösung schon heute im Bereich des Möglichen liegt.

Die ungewöhnlichen Erfolge von Freudenberg haben ihm eine große Anzahl von Ehrungen eingetragen. Die Aufzählung aller wissenschaftlichen Gesellschaften, denen Freudenberg als Mitglied oder als korrespondierendes Mitglied im Inland und im Ausland angehört, würde zu weit führen. Im Jahre 1936 wurde ihm die Mitscherlich-Medaille verliehen, 1952 die Emil-Fischer-Medaille. Am 6. November 1954 ernannte ihn die Technische Hochschule Graz zum Dr. techn. h. c. Ein Jahr später, am 25. November 1955, verlieh ihm die philosophisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Basel den Dr. phil. h. c.

Die Wertschätzung Freudenbergs und seines sicheren wissenschaftlichen Urteils kommen in seiner Wahl als Fachvertreter für organische Chemie und Vorsitzendem der Fachgruppe Chemie der Deutschen Forschungsgemeinschaft in den Jahren 1951–1955 zum Ausdruck. Mit Klarheit und unbestechlichem Urteil hat er sich dieser zeitraubenden Arbeit in voller Würdigung ihres Ernstes und ihrer Bedeutung gewidmet.

Die Anerkennung der Arbeiten Freudenbergs im Ausland findet auch darin ihren Ausdruck, daß er oft zu kürzeren oder längeren Gastvorträgen ins Ausland eingeladen wurde. Er hat dadurch, daß er sich dieser erfreulichen, aber manchmal auch mühevollen Aufgabe unterzog, wesentlich zur Weltgeltung der deutschen wissenschaftlichen Chemie im Ausland beigetragen und vor allem die Bande, die zwischen den deutschen Chemikern und den Chemikern der ganzen Welt nach dem zweiten Weltkrieg abgerissen waren, wieder knüpfen helfen.

Zu den großen Verdiensten Freudenbergs rechnet nicht zuletzt seine Tätigkeit als akademischer Lehrer, die mit diesen Arbeiten untrennbar verbunden ist. Eine große Anzahl von Schülern hat er in das wissenschaftlich-chemische Arbeiten und Denken eingeführt. Viele von ihnen bekleiden erfolgreich wichtige Stellungen an Hochschulen und in der Industrie. Sie alle vereinigen sich zusammen mit seinen Freunden an diesem Festtag seines 70. Geburtstags mit herzlichen Glückwünschen.

B. Helferich

## Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe

Von K. FREUDENBERG

Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Institut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide Heidelberg

Nach einem Plenarvortrag auf der GDCh-Hauptversammlung in München am 14. September 1955

Die polymeren Naturstoffe, die der Vortragende bearbeitet hat, sind Cellulose, Stärke, Gerbstoffe und Lignin. In dieser Reihenfolge ist ein Anstieg vom einfachen zum komplizierten Bau wahrzunehmen.

### Cellulose<sup>1,2)</sup>

Eine merkwürdige Unsicherheit, ja Nervosität hatte die Chemie der Cellulose nach Emil Fischers Tode (1919) ergriffen. Dies ging so weit, daß verschiedene Autoren sich über festbegründete Tatsachen hinwegsetzten, wie das Vorkommen der Cellobiose-Bindungen in der Molekel. Die Strukturchemie der Cellulose war über die Cellobiose nicht hinausgekommen. Um die Anzahl der Cellobiose-Bindungen in der Cellulose zu bestimmen, beschäftigte ich mich mit der Ausbeute an Octacetyl-cellobiose bei der Acetolyse der Cellulose<sup>3)</sup>. Ich erhielt, wie andere auch, un-

mittelbar nicht mehr als 36% Disaccharid. Da aber während der Reaktion ein erheblicher Teil der Cellobiose der Acetolyse verfällt, wurde in besonderen Versuchen dieser Betrag bestimmt. Es ergab sich, daß den unmittelbar isolierten 36% etwa weitere 25% zuzuzählen sind. Mehr als 60% der Glucose-Einheiten der Cellulose, aber nicht viel mehr, durchlaufen daher beim Abbau das Stadium der Cellobiose. Ein zweites Disaccharid wurde nicht gefunden.

Die Erklärung ergab sich aus folgender Überlegung<sup>3)</sup>: Die Oligosaccharide der Cellulose sind Abbauprodukte längerer Fragmente. Bei der weiteren Zerlegung entstehen geradzählige und ungeradzählige Oligosaccharide wie Cellotriose und Pentaose, aus denen einzelne Glucose-Einheiten abgespalten werden, die nicht durch das Stadium

<sup>1)</sup> K. Freudenberg: Tannin, Cellulose, Lignin; Springer-Verlag, Berlin 1933.

<sup>2)</sup> K. Freudenberg in R. Pummerer: Chem. Textilfasern, Filme und Folien, S. 7; F. Enke 1951.

<sup>3)</sup> K. Freudenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 54, 767 [1921].

der Biose gegangen sind. Wenn also eine einheitliche Bindung in der ganzen Kette vorhanden ist, so muß der Höchstbetrag an gebildeter Biose erheblich geringer sein als 100%. Zusammen mit *Walter Kossel*, der um jene Zeit wie ich in München war, wurden folgende Fragen überlegt.

1.) Wieviele Einheiten durchlaufen das Stadium der Cellobiose, wenn 100 Einheiten mit 99 gleichen Bindungen die Kettenmolekel bilden und wenn alle diese Bindungen mit derselben Geschwindigkeit gespalten werden; oder — was dasselbe ist — wieviel Cellobiose würde erhalten, wenn sie sich in vollkommen unlöslicher Form ausschiede und dem weiteren Abbau entzöge? Die Überlegung ergab 67% und stand im Einklang mit dem experimentellen Befund.

2.) Wieviel Biose ist in dem Zeitpunkt vorhanden, in dem Bildung und Abbau der Biose im Gleichgewicht sind, vorausgesetzt daß ein homogenes System vorliegt? Die Überlegung ergab 32% für eine Kette, die mehr als 10 Glucose-Einheiten enthält. Da ein Teil der Biose auskristallisiert, muß diese Zahl überschritten werden, was zutrifft.

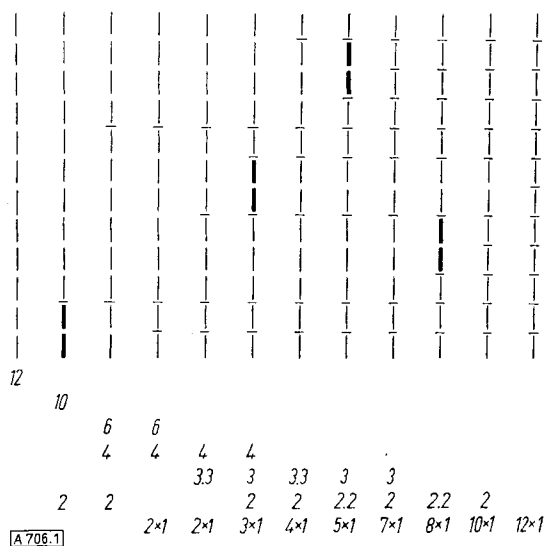


Bild 1  
Abbau einer gleichmäßigen Kette. Bildung und Zerlegung der Zweierstücke

Bild 1 soll an einer links im Bilde eingezeichneten einheitlichen Kette von 12 Glucose-Einheiten diese Verhältnisse erläutern. Während des Abbaues bilden sich und verschwinden wieder 4 Cellobiose-Einheiten (dicke Striche), die 8 der 12 Glucose-Einheiten der ursprünglichen Kette enthalten, d. h. zwei Drittel. Gleichzeitig anwesend, und zwar im späteren Stadium des Abbaues, sind nur 2 Cellobiose-Molekeln, die 4 Glucosen, also ein Drittel der ursprünglichen Kette enthalten. Damit war nicht nur die damals und später noch umstrittene Kettenformel der Cellulose gestützt, sondern es war darüber hinaus die Einheitlichkeit der Bindungen gefordert.

Während sich die übrige Cellulose-Forschung in den folgenden Jahren ausgiebig mit dem grundsätzlich schon unterschiedenen Zwiß über die Vorstellungen von kleinen Aggregaten oder von langen Ketten abgab<sup>4)</sup>, suchte ich meine Beweise zu stärken. Es konnte bewiesen werden, daß die Bindungen in der kristallisierten, methylierten Cellotriose und Cellotetraose — erstere wurde synthetisiert — sämtlich von der Art der Cellobiose sind. Die Kinetik des Abbaues der Cellulose, gemessen an der Zunahme der Aldehyd-Gruppen, wurde zusammen mit *Werner Kuhn* unter dem

<sup>4)</sup> Vgl. *K. Freudenberg*, ebenda 69, 1627 [1936].

Gesichtspunkt der einheitlichen Bindungen gedeutet. Das Ergebnis war schließlich<sup>5)</sup>: Jedes Spaltstück mit  $N$  Bindungen und  $N+1$  Kettengliedern wird zu Beginn seines Abbaues sehr angenähert mit folgender Geschwindigkeit gespalten

$$\frac{A + E + M(N-2)}{N}$$

$A$  = Spaltungsgeschwindigkeit der ersten Bindung,  $E$  = Spaltungsgeschwindigkeit der letzten Bindung,  $M$  = Spaltungsgeschwindigkeit der Mittelbindungen.

Für Cellulose wird dieser Ausdruck =  $M$ . Mit Hilfe von  $A + E$ ,  $M$  und  $K_2$ , der Abbaukonstante der Cellobiose, kann die Kinetik des Cellulose-Abbaues sehr genau erfaßt werden. Diese Befunde sind nur denkbar, wenn in der Kette der Cellulose einheitliche Bindungen, und zwar nach Art der Cellobiose vorliegen.

Auch die optische Drehung konnte herangezogen werden. Der Entfernungssatz der optischen Superposition war im Verlauf anderer Arbeiten gefunden worden, ebenfalls in Gemeinschaft mit *Werner Kuhn*<sup>6)</sup>. Wegen der großen Entfernung der betrachteten Drehungszentren gilt bei der Cellulose die Additivität der optischen Drehung. Sie konnte auf die Oligosaccharide bis zu den Polysacchariden angewandt werden<sup>7)</sup>. Wenn  $a$  die molekulare Drehung des Anfangsgliedes ist,  $m$  die Drehung eines Mittelgliedes, und  $e$  die des Endgliedes, und wenn  $n$  die Zahl der Kettenglieder ist, so beträgt die durchschnittliche molekulare Drehung eines Kettengliedes in einem  $n$ -Stück

$$\frac{a + e + m \cdot (n-2)}{n}$$

Durch Umformung dieser Gleichung ergibt sich, daß die molekulare Drehung  $\left[\frac{Mn}{n}\right]$  pro Einheit bei beliebigen  $n$ -Stücken, gegen  $\frac{n-1}{n}$  aufgetragen, auf einer Geraden liegen sollen. Für die Drehung der Cellulose wird dieser Ausdruck =  $m$ . Bild 2 zeigt, daß die molekularen Drehungen pro Glucose-Einheit für Di-, Tri-, Tetrasaccharid und Polysaccharid streng auf einer Geraden liegen. Auch dies ist

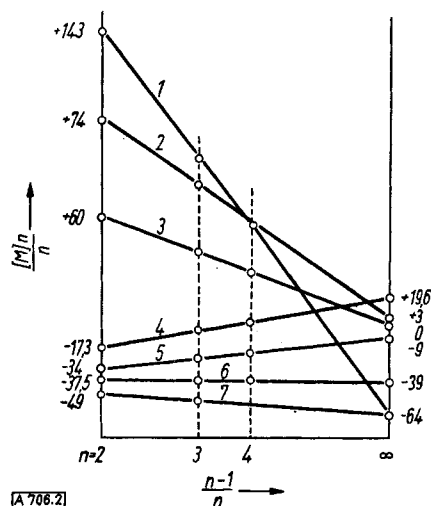


Bild 2  
Molekulare Drehung pro Einheit der Cellulose und ihrer Oligosaccharide, aufgetragen gegen  $\frac{n-1}{n}$

1.)  $\alpha$ -Octacetyl-cellulose (+143) bis Triacetyl-cellulose (-64, Chloroform); 2.) Cellobiose (Gleichgewicht) bis Cellulose in 50proz.  $H_2SO_4$ ; 3.) dasselbe in Wasser; 4.) Heptamethyl- $\beta$ -methyl-cellobiosid bis Trimethyl-cellulose in 50proz.  $H_2SO_4$ ; 5.) dasselbe in Chloroform; 6.) dasselbe in Wasser; 7.)  $\beta$ -Octacetyl-cellulose bis Triacetyl-cellulose in Chloroform

<sup>5)</sup> *K. Freudenberg* u. *G. Blomqvist*, ebenda 68, 2070 [1935].

<sup>6)</sup> *K. Freudenberg* u. *W. Kuhn*, Ber. dtsh. chem. Ges. 64, 703 [1931].

<sup>7)</sup> *K. Freudenberg*, *K. Friedrich* u. *J. Bumann*, Liebigs Ann. Chem. 494, 41 [1932].

nur denkbar, wenn die Kettenglieder gleich, und zwar nach Art der Cellobiose gebunden sind. Wir treffen demnach hier eine Entfernungsregel der Spaltungsgeschwindigkeit und eine des optischen Drehungsvermögens an; beide Regeln sind von der gleichen Art.

### Stärke

Gegenüber der mit erstaunlicher Exaktheit gebauten Cellulose gibt die Stärke viel weniger genaue Ergebnisse. Die Oligosaccharide kristallisieren sehr schwer. Die Spaltungsgeschwindigkeiten des Disaccharids und des Polysaccharids (Stärke) liegen bedeutend näher beieinander als bei der Cellulose und erlauben keine scharfe Behandlung. Es kann nur gesagt werden, daß bei weitem der größte Teil der Bindungen von der Art der Maltose ist. Später, als die Verzweigung des Hauptanteils der Stärke, des Amylopektins, erkannt war<sup>8)</sup>, konnten wir auf präparativem Wege feststellen<sup>9)</sup>, daß die 6-Stellung der Ort der Verzweigung ist. Weiter interessierte damals das Verhältnis der Stärke zu den von *Schardinger* entdeckten kristallinen Abbauprodukten, den sog. *Schardinger-Dextrinen*  $\alpha$  und  $\beta$ , die unter der Einwirkung des *Bacillus macerans* entstehen. Wir konnten ein drittes, das  $\gamma$ -Dextrin, auffinden. Sie wurden sämtlich als cyclische Oligosaccharide mit einheitlichen Bindungen nach Maltose-Art erkannt<sup>10)</sup>. Ihre Entstehung verdanken sie der *Macerans-Amylase*, die imstande ist, durch Umglycosidierung aus Stücken der Stärkekette die Ringe zu bilden. Durch eigene und fremde Arbeiten wurde das Molekulargewicht festgestellt: Das  $\alpha$ -Dextrin ist ein Cyclohexaglukan; das  $\beta$ -Dextrin enthält 7 und das  $\gamma$ -Dextrin 8 Glucose-Einheiten. Diese Molekeln haben die Form von *Raschig-Ringen*. Das Lumen dieser ziemlich starren Hohlzylinder mißt im Lichten 6,0 Å ( $\alpha$ ), 8 Å ( $\beta$ ) und 10 Å ( $\gamma$ ). Die *Schardinger-Dextrine* bilden mit fremden Molekeln charakteristische Ad-

dukte, die als Einschlußverbindungen gedeutet wurden. An der schwarzblauen Einschlußverbindung des Jods im  $\alpha$ -Dextrin sieht man, wie mühelos das Jod in den Hohlraum paßt (Bild 3). Diese Jod-Verbindung ist ein Modell der Jodstärke, für die an den Kettenenden und vielleicht einzelnen inneren Kettenteilen schraubenförmige Windung mit röhrenartigen Hohlräumen gefordert wurde. Die Konstruktion eines solchen Modells (Bild 4) zeigt, daß zwischen zwei Schraubenwindungen eine obenstehende Glucose mit einer darunter stehenden durch Wasserstoff-Brücken verbunden sein kann<sup>9)</sup>. Während in der Cellulose die nebeneinander liegenden Ketten intermolekular durch Wasserstoff-Brücken gebunden sind, gibt in der Stärke eine intra-

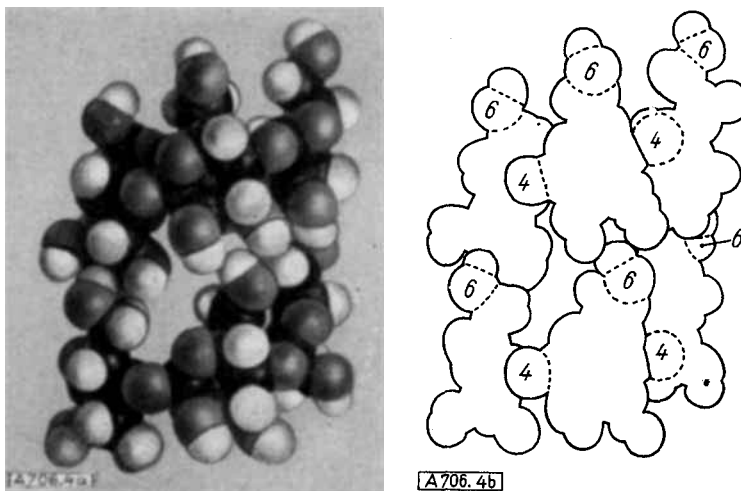


Bild 4a und b

Ausschnitt aus der Stärkekette, aus 8 Einheiten bestehend, von denen die 4. und 5., weil hinten liegend, unsichtbar sind. Die Sauerstoffatome 4 und 6 jeder Einheit sind in Bild 4b beziffert. In der Mitte der Bilder ist die Verzahnung der Hydroxyle 6 der unteren Windung mit den Hydroxilen 2 und 3 der oberen sichtbar

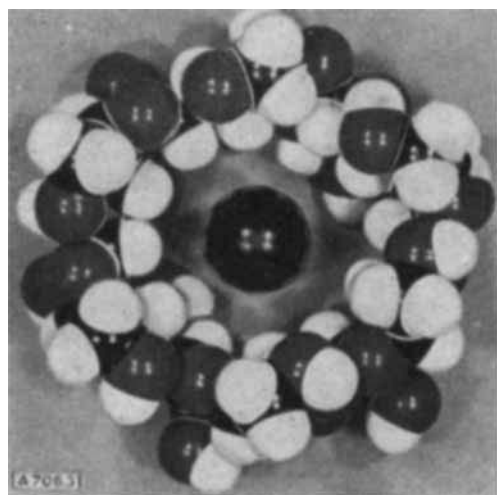


Bild 3

Cyclo-hexaglukan mit eingelegtem Jod-Atom. Die Ebene der 6 Gluco-pyranosen steht senkrecht auf der Papierebene

<sup>8)</sup> H. Elsner in Tollens-Elsner: Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate, 4. Aufl., Leipzig 1935, S. 568; H. Staudinger u. H. Eilers, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 819 [1936].

<sup>9)</sup> K. Freudenberg u. H. Boppel, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 609 [1940].

<sup>10)</sup> K. Freudenberg, G. Blomqvist, L. Ewald u. K. Soff, ebenda 69, 1258 [1936]; K. Freudenberg u. W. Rapp, ebenda 69, 2041 [1936].

molekulare Bindung den Zusammenhalt der Schrauben. Die Gegenwart von schraubenförmigen Aggregaten erleichtert die Umglycosidierung durch die *Macerans-Amylase* und ist inzwischen röntgenographisch bestätigt worden.

Es ist eine entscheidende Eigenart der Glucose, daß in der  $\beta$ -1,4-Bindung (Cellulose, Sesselform) die Hydroxyle äquatorial angeordnet sind<sup>11)</sup>. Die intermolekulare Ordnung der Ketten wird hierdurch begünstigt. In den Cycloglucanen und Teilen der Stärke liegt die  $\alpha$ -1,4-Bindung (Bootform) vor<sup>12)</sup> mit einer Ausrichtung der 3 Hydroxyle, die der Bildung von Röhren bei den Cycloglucanen und von Schrauben bei Teilen der Stärke günstig ist.

### Catechin-Gerbstoffe

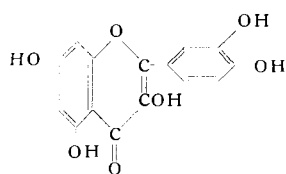
Die Betrachtung ist von der linearen Cellulose zu dem geknäuelten Amylopektin vorgeschritten, dessen Enden ebenso wie die Amylose teilweise Schraubenform besitzen. Beide polymeren Naturstoffe können durch Hydrolyse in Zwischenprodukte und den ursprünglichen Baustein, die Glucose, zerlegt werden. Bei den Gerbstoffen unterscheidet man zwei Gruppen. Die eine, die Gallotannine, ist nicht durch Polymerisation entstanden. Hier bildet die Glucose das Rückgrat, deren 5 Hydroxyle teils mit Gallussäure verestert sind, teils mit Säuren, die in genet-

<sup>11)</sup> K. Freudenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 76 A, 96 [1943].

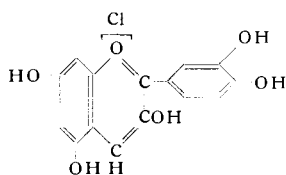
<sup>12)</sup> K. Freudenberg u. F. Cramer, Chem. Ber. 83, 296 [1950].

scher Beziehung zu der Gallussäure stehen. Diese Gruppe bleibt hier außer Betracht. Die Catechin-Gerbstoffe gehen gleichfalls auf einen kristallisierten Baustein, eines der Catechine, zurück, aus dem sie jedoch durch irreversible Kondensation entstehen. Die Catechine und ihre Stereomeren, die Epicatechine, sind Oxyflavane, die mit den in der Natur verbreiteten Flavonolen und Anthocyanidinen in enger Beziehung stehen, z. B. das Catechin III mit dem Quercetin I und dem Cyanidin II<sup>13</sup>), aus dem das Epicatechin durch Hydrierung hervorgeht<sup>14</sup>). Im Gegensatz zu den genannten und weiteren Vertretern der natürlichen C<sub>15</sub>-Gruppe werden die Catechine durch Dehydrierung oder durch Säureeinwirkung in wasserlösliche Catechin-Gerbstoffe und weiterhin in unlösliche Gerbstoffrote oder Phlobaphene verwandelt. Nach vielen Synthesen erwies sich als der einfachste Vertreter dieser Körperklasse, der die genannten Eigenschaften zeigt, das 7,4'-Dioxyflavan IV<sup>15</sup>). Seine Verwandlung durch Säuren kommt einer Polymerisation gleich. Zwischen den verschiedenen Deutungsversuchen konnte noch nicht mit Sicherheit entschieden werden, denn die analytische Behandlung der Polymerisate ist dadurch erschwert, daß die Polymerisation infolge Kondensation irreversibel ist. Diskutiert wird die Kondensation der Benzyläther-Gruppe der einen Molekel mit dem Phloroglucin- oder Resorcin-Kern der anderen, oder die lineare Polymerisation eines nach Ringöffnung ungesättigten Systems<sup>16</sup>).

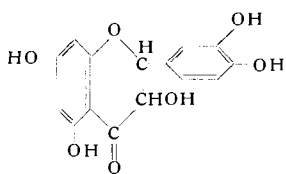
Catechin und seine nächsten Verwandten enthalten eine Hydroxy-Gruppe am mittelständigen Kohlenstoffatom des Pyran-Ringes. Neuerdings gewinnt eine Verbindungs-



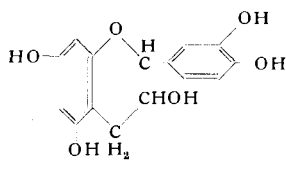
I Quercetin



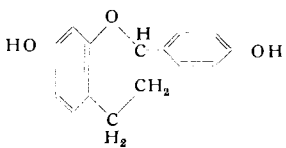
II Cyanidin



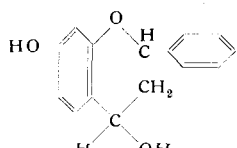
Ia Dihydroquercetin (Taxifolin)



III Catechin und Epicatechin



IV 7,4'-Dioxyflavan



V 4,7-Dioxyflavan

klasse Interesse, die sog. Leuko-anthocyanidine, die im Pyran-Ring zwei Hydroxyle besitzen. Sie bilden gleichfalls mit Säuren Gerbstoffe, aber daneben, wenn auch

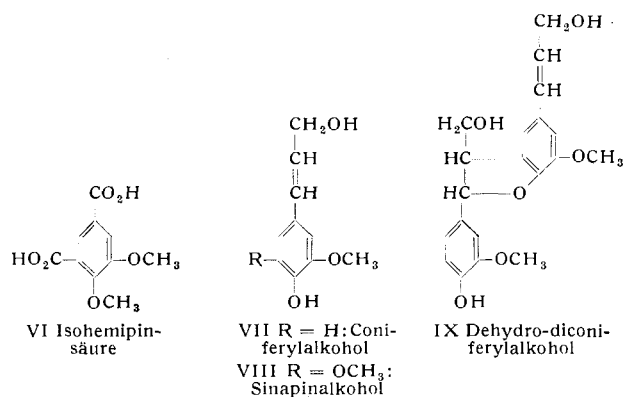
in minimaler Menge, Anthocyanidine. Das 4,7-Dioxyflavan V läßt sich durch Mineralsäure quantitativ in Pyrylium-Salz überführen<sup>17</sup>).

### Lignin<sup>18,19)</sup>

Das bedeutendste Rohprodukt der organischen Natur, das Holz, enthält wenig mehr als 40% Cellulose, 24–30% andere Polysaccharide, 6% Harz, Asche usw. und als Rest 22–28% Lignin, das die Cellulose-Fibrillen verfestigt. Es ist nach der Cellulose mengenmäßig der bedeutendste organische Rohstoff. Als ich mich vor mehr als 30 Jahren mit den an der Cellulose gewonnenen Vorstellungen dem Lignin zuwandte, waren zwei Erkenntnisse maßgebend. Als Gegenstand der Konstitutionsermittlung tritt an Stelle der Molekel der Ausschnitt aus der Molekel, der Baustein. Der zweite Gedanke ist der einer Ordnung. Der Bauplan, dessen Klarheit an der Cellulose unsere Bewunderung erregt, mag bei anderen natürlichen Hochmolekularen weniger übersichtlich sein, aber irgendeine Ordnung durfte nach den damals sich entwickelnden Erfahrungen mit der Cellulose und den Catechin-Gerbstoffen auch bei dem amorphen Lignin angenommen werden, wenn es auch zunächst mehr einem Schutthaufen als einem geordneten, der chemischen Behandlung zugänglichen Material zu gleichen schien.

### Abbau und Genese

Die bestrittene aromatische Natur wurde bewiesen, die Ausbeute an Vanillin aus Coniferenlignin auf 25% gesteigert, Isohemipinsäure VI und Formaldehyd wurden als Abbauprodukte gefunden; in den Laubholz-Ligninen wurde die Syringa-Komponente festgestellt<sup>20</sup>); ein Konstitutionsbild konnte jedoch durch diese und viele andere Beobachtungen nicht aufgerichtet werden. Aber sie ebneten den Vorstellungen von der Genese des Lignins den Weg. F. Tiemann und B. Mendelsohn haben schon 1875 ausgesprochen<sup>21</sup>), daß Lignin in Beziehung zum Coniferylalkohol VII steht, der als Glucosid Coniferin im Cambium der



Coniferen vorkommt nahe dem Gewebe, in dem das Holz gebildet wird. P. Klason<sup>22</sup>) entwickelte diesen Gedanken weiter und sprach aus, daß der Coniferylalkohol beim Übergang in Lignin oxydiert wird. Auch O. Herzog führte das Lignin auf Coniferylalkohol zurück. H. Erdtman

<sup>13</sup>) K. Freudenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 53, 1416 [1920].

<sup>14</sup>) K. Freudenberg, H. Fikentscher u. O. Schmidt, Liebigs Ann. Chem. 444, 135 [1925].

<sup>15</sup>) K. Freudenberg u. K. Weinges, Liebigs Ann. Chem. 590, 140 [1954].

<sup>16</sup>) K. Freudenberg, J. Polymer Sci. 16, 155 [1955].

<sup>17</sup>) K. Freudenberg, Proc. Royal Irish Acad. 1956, im Druck.

<sup>18</sup>) Zusammenfassung von K. Freudenberg in Zechmeisters: Fortsch. d. Chem. org. Naturstoffe 11, 43 [1954].

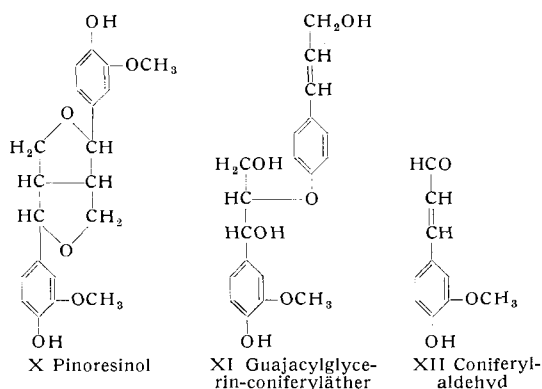
<sup>19</sup>) K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs, u. M. Reichert, Naturwissenschaften 42, 29 [1955].

<sup>20</sup>) K. Freudenberg u. H. F. Müller, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 1821 [1938].

<sup>21</sup>) Ebenda 8, 1136, Anm. S. 1139 [1875].

<sup>22</sup>) Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 300 [1923]; 62, 635, 2523 [1929]; vgl. B. Holmberg: Jahrbuch Kgl. Schwed. Akad. d. Wiss. 1953, 338.

sprach 1933 aus<sup>23)</sup>, daß das Lignin durch Wasserstoff-Entzug aus Propylguajacol-Einheiten entsteht, die in der Seitenkette oxydiert sind. Er stützte sich auf die enzymatische Dehydrierung des Isoeugenols, die *Cousin* und *Hérissey*



1908 gefunden hatten. Im Dehydrierungsprodukt des Isoeugenols kommt ein Phenylcumaran-System vor, das wir auch im Lignin angetroffen haben.

### Biosynthese

Um die Herkunft des Lignins zu untersuchen, unterwarfen wir den Coniferylalkohol der enzymatischen Dehydrierung.

Wenn Coniferylalkohol in äußerst verdünnter wäßriger Lösung bei 20 °C,  $p_H$  5,5 bis 6 und guter Belüftung mit Phenol-redoxasen behandelt wird, so geht er in ein amorphes helles Pulver über, das alle Eigenschaften des Lignins zeigt und sich von diesem nur durch einen Mehrgehalt an Doppelbindungen unterscheidet, der sich vor allem im Ultraviolettpektrum bemerkbar macht. Als Ferment dient ein gereinigter Preßsaft des Speisechampignons. Man kann die Lösungen auf einmal zusammengeben (Mischverfahren) oder die Lösung des Coniferylalkohols in dem Maße zur Fermentlösung zutropfen lassen wie er verbraucht wird (Zutropfverfahren). In beiden Fällen scheidet sich je nach Konzentration nach Stunden oder Tagen das unlösliche künstliche Lignin ab.

Es gibt eine Zeitspanne, in der bereits aller Coniferylalkohol umgesetzt, aber nur wenig Lignin ( $1/5$ – $1/3$  des Coniferylalkohols) ausgeschieden ist. Hier hat die neuere Entwicklung eingesetzt. In diesem Zwischenzustand befinden sich beim Mischverfahren in der Lösung vier definierte Bestandteile, zu denen beim Zutropfverfahren noch kleine Mengen anderer Umwandlungsprodukte hinzukommen. In der folgenden Tabelle 1 sind die 4 Bestandteile IX–XII angeführt. Setzt man nach Entfernung des unlöslich Abgeschiedenen die in Lösung gebliebene Menge = 100, so geben die Zahlen das ungefähre prozentuale Mengenverhältnis in der Lösung an.

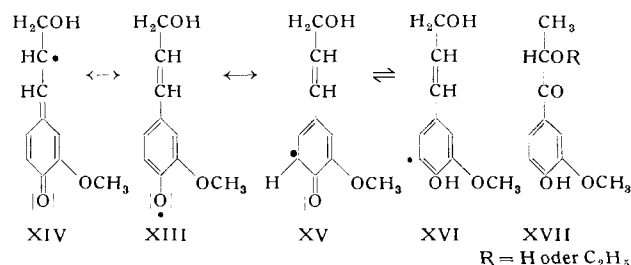
	Mischverfahren	Zutropfverfahren
Dehydro-diconiferylalkohol IX .....	60	20
DL-Pinoresinol X .....	25	10
Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI ..	15	70
Coniferylaldehyd XII .....	< 1	< 1

Tabelle 1. Sekundäre Lignin-Bausteine

Die Zahlen sind geschätzt. Die der rechten Spalte werden sich um einen geringen Betrag senken, wenn die bisher unerkannten Begleitsubstanzen festgestellt sind. Diese 4

Umwandlungsprodukte des Coniferylalkohols sind die wesentlichen Bausteine des Lignins. Wir nennen sie sekundäre Bausteine, während der ursprüngliche Coniferylalkohol der primäre Baustein ist. Alle sekundären Bausteine gehen, für sich allein dem Ferment ausgesetzt, ihrerseits in unlösliche Lignin-artige Substanzen über. Der Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI hat außerdem die Fähigkeit, beim Stehen in Lösung auch ohne Ferment in unlösliches Material überzugehen, offenbar durch Polymerisation. Lignin ist also ein Polymeres des dehydrierten Coniferylalkohols. Da er an verschiedenen Stellen seiner Molekel dehydriert wird, entstehen die genannten verschiedenen Produkte, die nun ihrerseits unter Dehydrierung und Mischpolymerisation das größere Gefüge des Lignins bilden. Die Konstitution des Dehydro-diconiferylalkohols IX ist durch Überführung in ein Derivat des Dehydro-diisoeugenols festgestellt. Die anderen sind durch Abbau und Synthese aufgeklärt. Der Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI kristallisiert nur in Form von Derivaten; die übrigen sind kristallinisch gewonnen worden. Alle sind trotz der Gegenwart verschiedener asymmetrischer Kohlenstoffatome optisch inaktiv (s. u.).

Die Bildung der genannten Substanzen ist einfach zu deuten. Durch Wegnahme des Wasserstoffs von der Phenol-Gruppe entsteht aus dem Coniferylalkohol das Radikal XIII. Zwei seiner mesomeren Formen sind XIV und XV. XV steht im Gleichgewicht mit XVI. Davon ist das Chinon-methid XIV das wichtigste. Aus XIV und XVI entsteht der Dehydro-diconiferylalkohol IX. Aus zwei Molekeln des Chinon-methids XIV das DL-Pinoresinol X.



Aus dem Chinon-methid XIV und dem Radikal XIII mit gleichzeitiger Anlagerung von Wasser der Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI. Coniferylalkohol wird unter dem Einfluß des Fermentes zu diesen optisch inaktiven Radikalen dehydriert, die sich nunmehr ohne Mitwirkung des Fermentes zu den sekundären Bausteinen umbilden. Dies ist die Erklärung für die optische Inaktivität aller dieser Zwischenstufen, des künstlichen Lignins und auch des natürlichen.

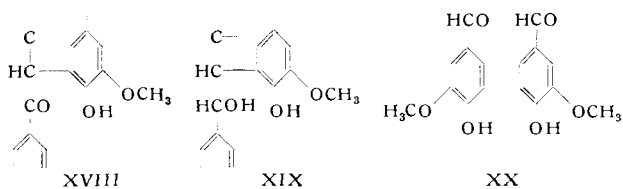
### Künstliches und natürliches Lignin

Die genannten 4 sekundären Bausteine enthalten mit einer unten zu besprechenden Ausnahme bereits alle Gruppierungen, die aus der Untersuchung des künstlichen und des natürlichen Lignins gefordert werden müssen. Das bedeutet, daß bei der weiteren Dehydrierungs-Kondensation dieser sekundären Bausteine untereinander ihre Struktur ganz oder zum größten Teil erhalten bleibt. Die wichtigste Reaktion des Lignins ist die Umsetzung mit Hydrogensulfit. Sorgfältige Untersuchungen der schwedischen Schule, insbesondere Modellversuche von *B. Holmberg*, haben ergeben, daß die schweflige Säure zur Hauptsache das Hydroxyl von sekundärem Phenylcarbinol durch die Gruppierung  $SO_3H$  ersetzt. Diese Gruppierung ist, besonders bei dem Zutropf-Lignin, im Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI gegeben. Des weiteren werden vom Bisulfit alipha-

<sup>23)</sup> H. Erdtman, Biochem. Z. 258, 172 [1933]; Lieb. Ann. Chem. 503, 283 [1933].

tische Äther-Gruppen desselben Carbinols umgesetzt; sie sind im Pinoresinol X enthalten. Die technische Kochung wird stets so weit geführt, daß das Lignin als Ligninsulfonsäure wasserlöslich wird. Ob und in welchem Umfange im Dehydro-diconiferylalkohol IX die cyclische Phenoläther-Bindung des Carbinols aufgespalten wird, ist unbekannt. *Hibbert* hat gefunden, daß bei der Verkochung des Lignins mit alkoholischem Chlorwasserstoff ein kleiner Teil des ursprünglichen Coniferylalkohols in Gestalt monomerer Guajacylketole XVII oder ihrer Alkyläther auftritt. Diese Abbauprodukte des Lignins bilden sich auch aus dem Guajacyl-glycerin-coniferyläther sowie den Kunst-Ligninen, insbesondere dem Zutropf-Lignin. Lignin sowie die beiden Kunst-Lignine spalten geringe Mengen Formaldehyd ab, wenn sie mit starker Mineralsäure zersetzt werden. Er entsteht aus dem in den Formelbildern links geschriebenen primären Carbinol des Guajacyl-glycerin-coniferyläthers XI sowie des Dehydro-diconiferylalkohols IX. Dies wurde bei den synthetischen Produkten bewiesen durch Verwendung von Coniferylalkohol, der endständig mit radioaktivem Kohlenstoff markiert war. Coniferylalkohol selbst liefert keinen Formaldehyd. Für die Rotfärbung des Lignins mit Phloroglucin-Salzsäure sind nach *E. Adler* in geringer Menge eingebaute Zimtaldehyd-Gruppen verantwortlich. Diese Reaktion wird erklärt durch den eingebauten Coniferylaldehyd sowie möglicherweise durch Zimtaldehyd-Gruppierungen aus Dehydro-diconiferylalkohol und Guajacyl-glycerin-coniferyläther. Wird Lignin oder künstliches Lignin mit starkem Alkali behandelt, methyliert und oxydiert, so entstehen einige Prozente Isohemipinsäure VI. Künstliches Lignin, das an dem mittelständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette markiert ist, liefert Isohemipinsäure, deren Radioaktivität dem Ausgangsmaterial entspricht. Ausgangssubstanz für die Isohemipinsäure ist der Dehydro-diconiferylalkohol IX, aber nicht er allein.

Wenn man Lignin oder künstliches Lignin mit Diazomethan methyliert, dann oxydiert, entsteht gleichfalls Isohemipinsäure, wenn auch in geringerer Menge. Der Versuch mit radioaktivem Coniferylalkohol hat ergeben, daß auch hier das mittelständige Kohlenstoffatom der Seitenkette an der Bildung der Isohemipinsäure teilnimmt. Demnach muß im Lignin eine Anordnung der Formel XVIII oder XIX vorliegen. Es ist möglich, daß eine solche Gruppierung in geringem Umfang unter den sekundären Bausteinen vorkommt, die sich bei dem Zutropfverfahren bilden, oder daß sie bei der Kondensation der sekundären



Bausteine zu höheren Aggregaten entsteht. Dies weist auf die Bindung zweiter Art hin, wenn wir die unter weiterer Dehydrierung entstehende Bindung der sekundären Bausteine untereinander so bezeichnen. Es gibt noch einen anderen Hinweis auf die Bindung zweiter Art. *J. C. Pew* konnte aus Lignin Dehydro-divanillin XX isolieren unter Bedingungen, unter denen zahlreiche Modellschubstanzen, die keine Diphenyl-Bindung enthielten, diese Substanz nicht liefern<sup>24</sup>). Die Ausbeute beträgt einige Prozente, so daß auf das Mehrfache dieser Bindungsart im Lignin zu schließen ist.

Für diese Bindung zweiter Art ist die Bestimmung der Phenol-Gruppen im Lignin und seinen künstlichen

Nachbildungen von besonderer Bedeutung<sup>25</sup>). Durch Titration mit Colaminnatrium in Äthylendiamin nach *H. Brockmann* und *G. Meyer*<sup>26</sup>) finden wir im Lignin (*Björkman*-Lignin aus Fichte) auf die C<sub>9</sub>-Einheit des Coniferylalkohols berechnet 0,33 Phenolhydroxyl, d. h. ein Phenolhydroxyl auf 3 Einheiten. Im ligninsulfonsauren Ammonium und der Ligninsulfonsäure selbst finden wir 0,32 bis 0,43 Phenolhydroxyl. In der Lignin-thioglykolsäure nach *Holmberg* wurden 0,44 Phenolhydroxyl gefunden, im Dioxanlignin 0,41 und im künstlichen Lignin (Dehydrierungspolymerisat) nach dem Mischverfahren 0,46. Das künstliche Lignin nach dem Zutropfverfahren ergab 0,34, während das lösliche Fichten-Lignin (*Brauns*-Lignin) wesentlich mehr, im Durchschnitt 0,6 Phenolhydroxyl enthielt. Wie wir sehen werden, ist dieses in sehr geringer Menge im Holz vorkommende Material kein echter Repräsentant des Lignins. Für das natürliche und künstliche Lignin ergibt sich demnach im Durchschnitt ein Phenolhydroxyl-Gehalt von rund 0,35 je Einheit.

Wenn wir die noch zu begründende Aussage machen, daß das Lignin nach dem Zutropfverfahren dem natürlichen näherkommt, so können wir folgende Rechnung aufstellen. Die sekundären Bausteine dieses künstlichen Lignins bringen 0,45 freies Phenolhydroxyl oder 45 Phenolhydroxyle auf 100 C<sub>9</sub>-Einheiten in die Lignin-Bildung ein. Demnach werden bei der Bindung zweiter Art von 100 ursprünglichen Coniferyl-Einheiten 10 derart verbunden, daß dabei Phenolhydroxyl verschwindet. Die Bindungsart kann dieselbe sein wie im Dehydro-diconiferylalkohol IX oder im Guajacyl-glycerin-coniferyläther XI. Dazu kommen noch 12 oder mehr weitere Bindungen zweiter Art, die sich durch den Vergleich der Titration mit der optischen Messung zu erkennen geben. Phenole verschieben ihr Spektrum nach dem langwelligen Gebiet, wenn sie im ionisierten Zustand, also im alkalischen Medium, gemessen werden. Wenn man die Größe der Verschiebung geeigneter Modelle mit der des Lignin-Spektrums vergleicht, so kann man auf die Anzahl der Phenolhydroxyle im Lignin schließen. Solche Messungen hat sehr gründlich *G. Aulin-Erdtman*<sup>18</sup>) ausgeführt. Auch von *O. Goldschmidt*<sup>19</sup>) liegen Messungen vor. Beide finden rund ein Drittel Phenolhydroxyl weniger als wir bei der Titration. Wir erklären uns dies so, daß im weiteren Verlauf der Bildung von Bindungen zweiter Art Phenolhydroxyle auftreten, die zwar titrimetrisch erfaßt werden können, aber im optischen Verfahren nicht in Erscheinung treten. Solche Gruppierungen sind bekannt, z. B. die Diphenyl-Gruppierungen wie sie *Pew* im Lignin festgestellt hat. Sie geben bei der Titration zwei Phenolhydroxyle zu erkennen, bei dem optischen Verfahren nur eines, weil durch elektrostatische Beeinflussung oder Wasserstoff-Brücken das eine von beiden zu schwach sauer ist. Andere Phenol-Gruppen dieser Art könnten sterisch stark behinderten Kombinationen der Art von XVIII angehören, insbes. wenn das Carbinol durch Oxydation in eine Carbonyl-Gruppe übergegangen ist (XIX). Auch ein geringer Gehalt an Brenzcatechin-Gruppen kann beteiligt sein. Daraus läßt sich folgendes Bild für die Bindungsarten des ursprünglichen Coniferylalkohols im Lignin entwerfen. 101 Molekeln dehydrierten Coniferylalkohols können durch 100 Bindungen miteinander verknüpft sein. Von diesen sind 50 durch die sekundären Bausteine erklärt (Bindungen erster Art). Bei ihrer Bildung sind 55 Phenolhydroxyle freigeblieben. 20 Bindungen von sekundären Bausteinen untereinander (Bindungen zweiter Art) sind vom Typus des Dehydro-diconiferylalkohols oder wahrscheinlicher des

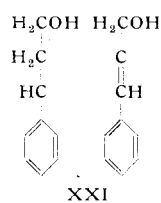
<sup>24</sup>) *J. C. Pew*, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 2831 [1955].

<sup>25</sup>) *K. Freudenberg* u. *K. Dall*, *Naturwissenschaften* 42, 606 [1955].

<sup>26</sup>) *Chem. Ber.* 86, 1514 [1953].

Guajacylglycerin-coniferyläthers. Sie setzen die freien Phenolhydroxyle auf 35 herab. 12 oder mehr weitere Bindungen zweiter Art erzeugen Phenol-Gruppen, die optisch nicht erfaßt werden können, wohl aber titrimetrisch, und den geschilderten Typen angehören dürften. Die restlichen 18 oder weniger Bindungen sind entweder nicht vorhanden oder noch nicht charakterisiert. Im ersten Fall hätte die Lignin-Molekel im Durchschnitt 4 Bindungen zwischen 5 Einheiten. Das „Molekulargewicht“ wäre alsdann ungefähr 1000, wobei allerdings die Polymerisation der Guajacylglycerin-coniferyläther-Bausteine unberücksichtigt bleibt. Verzweigungen sind möglich. S. *Hernestam* und E. *Adler*<sup>27)</sup> haben ein Verfahren ausgearbeitet, das mit Hilfe von Perjodsäure erlaubt, aromatisch gebundenes Methoxyl, das neben einem Phenolhydroxyl steht, zu bestimmen. Ihr Ergebnis steht im Einklang mit unserem.

Der Coniferylalkohol und alle p-Oxyzimtalkohole sind wie die Catechine nicht nur gegen Redoxasen, sondern auch gegen Säuren überaus empfindlich. Durch Säure entstehen unlösliche Produkte, die zunächst die ursprüngliche Zusammensetzung haben, also echte Polymerisate sind.



XXI

Einer solchen Polymerisation sind wir oben am Guajacylglycerin-coniferyläther begegnet. Auch der Zimtalkohol selbst wird in kalter wäßriger Lösung durch Mineralsäure verändert. Das sich ausscheidende Dimerisat hat die Formel XXI<sup>28)</sup> und dürfte das Prinzip anzeigen, nach dem sich auch die p-Oxyzimtalkohole und der Guajacylglycerinconiferylalkohol zu hochmolekularen Gebilden polymerisieren.

Das hier entworfene Bild von der Konstitution des Coniferen-Lignins eröffnet die Möglichkeit, eine weitere sehr umstrittene Frage zu beantworten. Offensichtlich ist das Lignin zum größeren Teile mit Polysacchariden des Holzes verbunden. Die Addition der Radikale XIII und XIV führt zunächst zu einem Chinonmethid, das durch Wasseranlagerung das benzoide System des Guajacylglycerin-coniferyläthers XI zurückbildet. Es ist durchaus denkbar, daß statt Wasser da und dort ein Carbinol eines Polysaccharids eintritt. Es entsteht alsdann der Phenylcarbinoläther eines Polysaccharids, der durch verdünnte Mineralsäuren spaltbar wäre.

Laubholz-Lignin enthält außer der Komponente des Coniferylalkohols die des Sinapinalkohols VIII, der als Glucosid Syringin angetroffen wird. Aus Sinapinalkohol allein läßt sich mit Pilzferment kein Dehydrierungspolymerisat herstellen. Man erhält dunkel gefärbte Lösungen. Wenn aber Coniferylalkohol anwesend ist, selbst in bedeutendem Unterschluß, so wird ein sehr schönes Dehydrierungspolymerisat gebildet, das maximal 3 Einheiten des Sinapinalkohols auf eine des Coniferylalkohols enthält. Dem entspricht auch, daß in der Natur niemals Lignin-Arten angetroffen worden sind, die aus der Sinapinalkohol-Komponente allein bestehen.

Aus der bisherigen Schilderung der Chemie des Lignins geht hervor, daß die analytische Behandlung des Naturstoffs nicht zum Ziele hat führen können. Erst als Vorstellungen über die Genese ausgebildet waren, konnte das Experiment von dieser Seite her angreifen und alle Stufen der Bildung des Lignins untersuchen. Das Ergebnis war die Klarlegung des Bauprinzips und die Beantwortung der Frage, warum der ursprüngliche Coniferylalkohol im Lignin in jenen überaus mannigfaltigen Formen und Kondensations-Produkten auftritt, an denen die analytische Bearbeitung gescheitert war.

<sup>27)</sup> Svensk Kem. Tidskr. 67, 37 [1955].

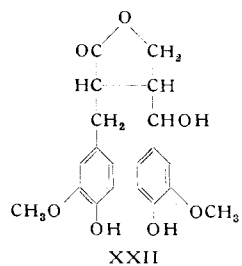
<sup>28)</sup> K. Freudenberg u. O. Ahlhaus, unveröffentl.

## Lignin in der Pflanze, Bildung des Holzes<sup>19)</sup>

In der verholzten Zellwand sind die nach Sperrholzart übereinander liegenden Cellulose-Fibrillen mit Lignin umgeben wie die Eisenstäbe mit Beton im Eisenbeton. Die Hauptmenge des Lignins findet sich in dem Bereich der Mittellamelle. In der Wachstumsperiode der Coniferen ist das Gewebe zwischen Rinde und Holz, in dem das Cambium liegt, reich an dem Glucosid Coniferin. Die Suche nach den sekundären Bausteinen im Saft dieses Gewebes verlief ergebnislos. Die Fichtenrinde enthält zwar (+)-Catechin, Dihydroquercetin (Taxifolin Ia<sup>29)</sup>) sowie ein Hydroxyl-reicheres Phenol, aber diese Stoffe können, wenn überhaupt, nur zu einem sehr geringen Teile an der Lignin-Bildung teilnehmen. Vielleicht ist die Einkondensation solcher oder ähnlicher Phenole in das Lignin schuld an dem bekannten Defizit an Methoxyl, das natürliches Coniferen-Lignin aufweist. Es besitzt je C<sub>6</sub>-Einheit nur 0,92 Methoxyl, während die Kunstlignine aus Coniferylalkohol genau ein Methoxyl enthalten. Aber in der obersten schon holzartigen Schicht des bereits in Verholzung begriffenen Gewebes befinden sich, im Aceton-Auszug durch Chromatographie erkennbar, geringe Mengen der 4 sekundären Bausteine nebst 2 weiteren noch nicht identifizierten Phenol-Körpern. Diese sind vielleicht identisch mit den oben erwähnten zusätzlichen Produkten, die bei dem Zutropfverfahren neben den 4 bekannten sekundären Bausteinen entstehen.

Abseits von dem hier betrachteten Gewebe im Inneren des fertigen Holzes befindet sich neben dem Lignin jener in Alkohol, Aceton oder anderen Lösungsmitteln lösliche geringfügige Anteil (1 bis 2% des Gesamtignins), der als lösliches Lignin oder *Brauns-Lignin* bekannt ist und lange für eine Vorstufe des Lignins gehalten worden ist.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich in diesem Anteil erhebliche Mengen, schätzungsweise 30 bis 40%, eines als Substanz und in Derivaten sehr schwer kristallisierbaren Lignans befinden, dem wir vorläufig die Formel eines Oxymataresinols XXII zuschreiben. Wir besitzen keinen Anhaltspunkt dafür, daß dieser Bestandteil zum Lignin gehört und in dieses eingebaut ist. Auch sonst unterscheidet sich das lösliche Lignin vom eigentlichen Lignin, vor allem im Phenolgruppen-Gehalt, der je nach der Fraktion des Präparates zwischen 0,55 und 0,70 liegt (titrimetrisch bestimmt).



XXII

Kehren wir zum Gebiet des Cambiums zurück. Das saftige Gewebe beiderseits des Cambiums, vielleicht auch des Cambiums selbst sowie die äußeren in Verholzung begriffenen Zellen des Holzes sind reich an Redoxasen. Sie sind teils wasserlösliche, teils zellgebundene Phenol-Dehydrasen und Peroxydasen. Mit ihnen konnten aus Coniferylalkohol nach dem Mischverfahren die 4 sekundären Bausteine und künstliches Lignin gebildet werden. Das Zutropfverfahren ist bei diesem Ferment-System noch nicht angewendet worden. Eine im Zellsaft gelöste Glucosidase ist nicht nachweisbar, muß aber gefordert werden, weil das Coniferin von den Redoxasen nicht angegriffen wird und infolgedessen kein Lignin bilden kann. Es fand sich aber in den in Verholzung begriffenen Zellen eine streng lokalisierte, zellgebundene Glucosidase, die in Schnitten mit Hilfe von Indican nachgewiesen werden konnte, das unter der Einwirkung der  $\beta$ -Glucosidase Indoxyl bildet, aus dem durch den Luftsauerstoff Indigo entsteht.

<sup>29)</sup> Seine Überführung in Catechin ist neuerdings gelungen, K. Freudenberg u. K. Weinges, unveröffentl.



Bild 5 zeigt an *Araucaria excelsa*, einer Conifere, Schnitte durch einen einjährigen Trieb. In Bild 5a ist der Holzkörper durch Phloroglucin-Salzsäure sichtbar gemacht. Verholzte Zellen finden sich zerstreut im Mark. Die Färbung des Holzes ist tiefdunkelrot, die Farbe verschwindet gegen das Cambium hin in unscharfer Weise in den äußersten Holzzellen, in denen die Verholzung im Gange ist. Außen in der Rinde befindet sich ein unterbrochener Gürtel von verholzten Zellen. Das rechte Bild zeigt den Indigo-Effekt. Er ist sichtbar an zerstreuten Zellen im Mark, nicht vorhanden in dem schon fertigen Holze, stark aber in der äußersten Zone des Holzes, wo die Verholzung in vollem Gange ist. Auch außen im verholzenden Gewebe

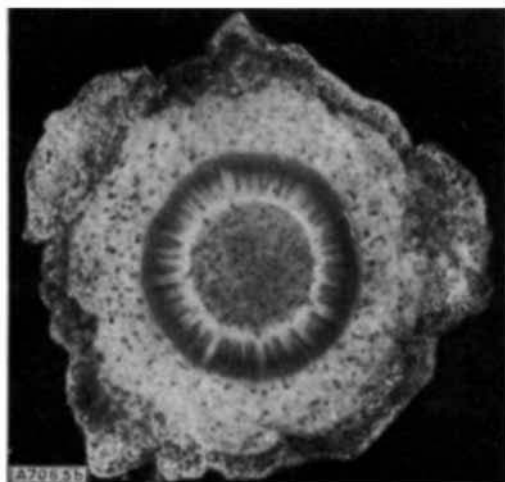
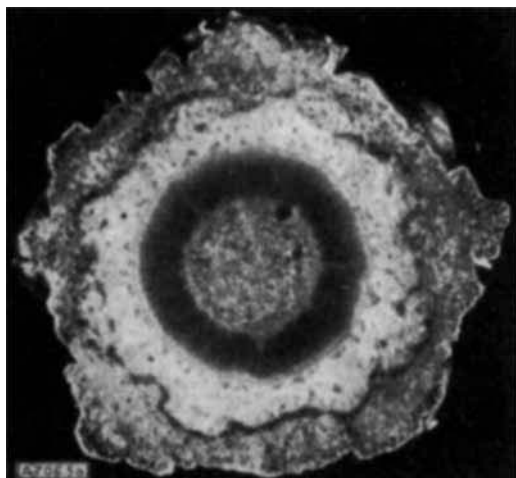


Bild 5a und b

5a) Schnitt durch *Araucaria* (Zimmertanne), mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt. 5b) mit Indican behandelt

der Rinde ist Indigo sichtbar, also Glucosidase nachgewiesen. Damit ist das fehlende Glied, eine  $\beta$ -Glucosidase, festgestellt. Im mittleren Teil des Bildes 6 wird ein Schema des Gebietes um das Cambium gezeigt. Rechts sind die dicken, fertig verholzten Zellen zu sehen. Sie werden nach links hin schwächer und gehen schließlich in ganz zarte neu geschaffene Zellen über, die unmittelbar innerhalb des Cambiums liegen, in das zur Kenntlichmachung die Zellkerne eingezeichnet sind. Weiter links nach außen liegen die ersten nicht verholzten Zellreihen der Rinde. Das untere Bild zeigt die Anfärbung mit Phloroglucin-Salzsäure. Die fertigen Holzzellen sind tiefrot gefärbt. Gegen das Cambium zu wird die Färbung schwächer und hört dann ganz auf. Das obere Bild zeigt den Indigo-Effekt, also den

Sitz der Glucosidase. Die fertigen Holzzellen enthalten keine Glucosidase. Dann tritt gegen das Cambium zu in jähem Anstieg eine reichliche Menge von Glucosidase auf, die erst wenige Zellen vor dem Cambium verschwindet.

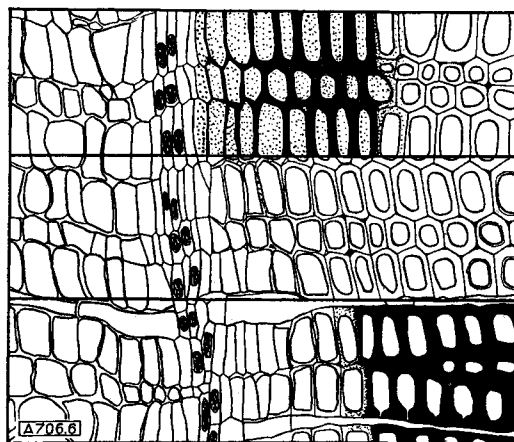


Bild 6

Schnitt durch Coniferenholz. Oben: mit Indican behandelt. Mitte: unbehandelt. Unten: mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt

Daraus ist folgendes zu schließen: In dem blau gefärbten Gebiet, wo die Verholzung vonstatten geht, befindet sich Glucosidase. Das Coniferin, das in dem Gewebe um das Cambium im Zellsaft gelöst ist, diffundiert in das Gebiet der Glucosidase ein. Es wird dort in Glucose und Coniferylalkohol zerlegt, der nunmehr von den dort vorhandenen Redoxasen über die sekundären Bausteine in Lignin verwandelt wird, das wegen seiner Unlöslichkeit und wahrscheinlich auch seiner Bindung an die Polysaccharide an Ort und Stelle liegen bleibt. Wenn die Zellwand und insbesondere das Gebiet der Mittellamelle angefüllt ist, hört das Leben der Zelle auf und damit auch die Tätigkeit der Glucosidase.

#### Versuche mit radioaktivem Coniferin

Die Richtigkeit dieser Vorstellungen ließ sich mit D-Coniferin überprüfen, dessen Aglykon radioaktiven Kohlenstoff enthielt. Es wurde in Wasser gelöst, in eine kleine Retorte gefüllt, deren Tubus über einen kleinen Seitenzweig gestülpt wurde, dessen Nadeln abgestutzt waren. Der Seitenzweig saß an einem 2-jährigen Fichtenstämmchen. Die Tubusöffnung wurde mit Siliconwachs geschlossen, der Tubusansatz umgebogen (Schutz gegen Regen) und offen gelassen zum Ausgleich des Druckes<sup>19</sup>. Bei geeigneter Witterung werden innerhalb von 2 Tagen mehrere Kubikzentimeter der Lösung von der Fichte aufgesogen. Man läßt das Bäumchen weiterwachsen und untersucht nach einigen Wochen oder Monaten den Sitz der radioaktiven Substanz. An einem Stämmchen von Bleistiftstärke ist die Radioaktivität fast ganz oberhalb der Ansatzstelle des kleinen Zweiges lokalisiert und geht nur einige Zentimeter weit in die Höhe. Sie ist am stärksten auf der Seite, auf der der kleine Zweig sitzt und reicht meistens nicht auf die Gegenseite des Stämmchens. Die radioaktive Substanz ist in der Zone des Holzes fixiert, das in den Tagen nach der Einführung des radioaktiven Coniferins gebildet wurde (Bild 7 und 8).

Das radioaktive Holz wurde so gut wie möglich herauspräpariert, zerkleinert und mit Alkohol extrahiert. Der Alkohol nahm keine radioaktive Substanz an. Alsdann wurde das radioaktive Holz mit Alkohol-Chlorwasserstoff gekocht und das Filtrat durch Chromatogramm auf die Hibbertschen Körper geprüft. Die charakteristischen Flecke der Hibbertschen Körper erwiesen sich als radio-



aktiv. Wie schon erwähnt, liefert der Coniferylalkohol selbst keine *Hibbertschen* Körper, wohl aber der Guajacylglycerin-coniferyl-äther des Lignins.

Der Versuch ist ein Beweis dafür, daß das radioaktive Coniferin tatsächlich zu Lignin aufgebaut war.

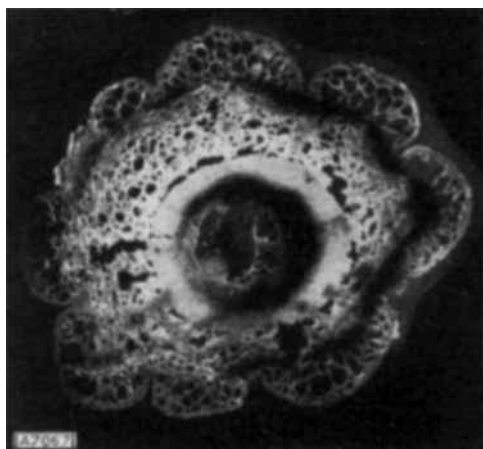


Bild 7. Querschnitt durch einen zweijährigen Fichtentrieb. Bald nach Beginn der Wachstumsperiode (2. Hälfte Mai) wurde radioaktives Coniferin durch einen Seitentrieb eingegeben, der sich rechts unterhalb des Schnittes befunden hat. Die radioaktive Substanz wird vorwiegend auf derselben Seite in den Zellreihen fixiert, die kurz nach der Eingabe angelegt wurden. Im Juni darüber angelegte Holzzellen sind nicht radioaktiv. Außen in der verholzten Zone der Rinde gleichfalls Radioaktivität

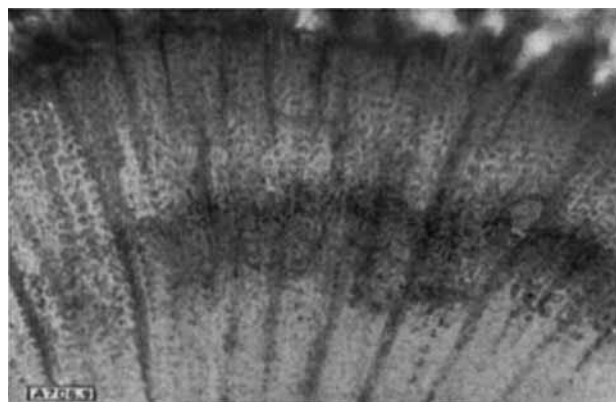


Bild 8. Zweijähriger Fichtentrieb. Unten Frühjahrsholz des 2. Jahres. Darüber zeichnet sich das in der Mitte des Juni eingegebene radioaktive  $D$ -Coniferin ab. Darüber Sommerholz bis zum Cambium. Der Querschnitt wurde einige Zentimeter oberhalb des zur Einführung des  $D$ -Coniferins verwendeten Seitenzweigs hergestellt. Weiter unten (Bild 7) ist die Radioaktivität stärker

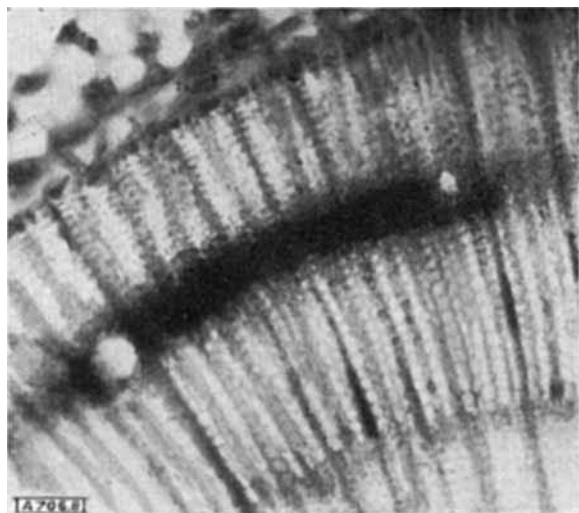


Bild 9. Zweijähriger Fichtentrieb. Unten rechts Holz vom Vorjahr. Darüber im 2. Jahre im Mai und erster Junihälfte angelegtes Holz. Eingabe von radioaktivem Phenylalanin Mitte Juni. Darüber Holz von Ende Juni und Juli, begrenzt vom Cambium

Mit  $L$ -Glucose aufgebautes  $L$ -Coniferin wird von der Pflanze nicht fixiert und zum Teil in der Rinde und den Nadeln abgelagert, von wo es als wasserlösliche Substanz wieder extrahierbar ist. Das ist erklärlich, weil die  $\beta$ -Glucosidase nicht auf ein  $L$ -Glucosid anspricht. Es muß betont werden, daß die Mitwirkung einer  $\beta$ -Glucosidase aus biochemischen Überlegungen gefordert wurde. Ihre Auffindung und die Rolle, die dieses Ferment bei der Holzbildung spielt, stützt die Richtigkeit der Auffassung, daß die *in vitro* nachgebildete Biosynthese des Lignins in der Pflanze ebenso oder ähnlich abläuft. Die Lignin-Bildung wird geregelt durch das Angebot an Coniferin und die Geschwindigkeit, mit der es in das die Glucosidase enthaltende Gewebe eindiffundiert. Der Umsatz in der Zeiteinheit ist, verglichen mit den Versuchen *in vitro*, bei der Pflanze außerordentlich gering. Wir glauben daher, daß der Zutropfversuch der Wirklichkeit näherkommt als die Lignin-Bildung nach dem Mischverfahren. In einem früheren Versuch<sup>19)</sup> wurde gezeigt, daß auch radioaktives  $D$ -Glucovanillin im Holz eingebaut wird. Daraus gewonnene *Hibbertsche* Körper sind jedoch nur äußerst schwach radioaktiv. Daraus ist zu schließen, daß bestenfalls nur ein kleiner Teil des radioaktiven Vanillins zu  $C_9$ -Bausteinen aufgebaut wird, während der größte Teil auf andere Weise in das Lignin einkondensiert wird. Radioaktives Phenylalanin (Bild 9), das gleichfalls irreversibel in das Holz eingebaut wird, liefert jedoch echtes Lignin, denn die daraus bereiteten *Hibbertschen* Körper sind radioaktiv<sup>20)</sup>. Das gleiche gilt für radioaktive Ferulasäure.

Von der Fadenmolekel der Cellulose, die in den Kristalliten ausgerichtet ist, führte der Weg über die Stärke, deren Hauptanteil (Amylopektin) verzweigt ist. Sie neigt, insbesondere im unverzweigten Anteil (der Amylose), teilweise zur schraubenförmigen Anordnung ihrer Ketten. Diesen hydrolysierbaren hochmolekularen Naturstoffen stehen die kondensierten gegenüber. Sie gehen von definierten Grundsubstanzen aus. Von den hier betrachteten gehen die Catechine, vermutlich unter Öffnung des Pyran-Ringes, in Polymerisationsprodukte über. Das Coniferen-Lignin wird gleichfalls zu 90% oder mehr von einem einheitlichen Grundstoff, dem Coniferylalkohol, aufgebaut. Aber hier tritt ein neues Polymerisationsprinzip auf. Durch Entzug von Wasserstoff werden Radikale gebildet, die sich zunächst zu den sekundären Bausteinen stabilisieren, um alsdann durch langsamer verlaufende erneute Dehydrierung verschweißt zu werden. So erklärt sich die außerordentliche Mannigfaltigkeit, in der im Lignin die ursprünglichen Einheiten des dehydrierten Coniferylalkohols auftreten.

Lignin ist kein ungeordneter Schutthaufen. Auch hier herrscht eine klare Ordnung, wenn auch das Ergebnis kompliziert ist. Die Mittel jedoch, mit denen die Natur arbeitet: Radikalbildung durch Dehydrierung und Stabilisierung der Radikale durch Kondensation sind denkbar einfach. Vor 20 Jahren konnte rückschauend auf die Cellulose gesagt werden, daß für die analytische Erforschung hochpolymerer Substanzen, insbesondere optisch aktiver von der klassischen Konstitutions-Chemie ausgehend und stets auf ihr fußend neue Methoden entwickelt werden mußten. Diese bedienten sich des optischen Drehungsvermögens und der Kinetik des Abbaues. Heute kann die Aussage auf das Lignin erweitert werden, bei dem die Biosynthese den Schlüssel für die Konstitutionsermittlung geliefert hat.

Eingegangen am 29. November 1955 [A 706]

<sup>20)</sup> S. A. Brown u. A. C. Neish haben nach Eingabe von radioaktivem Phenylalanin in Weizen u. Ahorn u. durch nachfolgende Oxydation mit Nitrobenzol und Alkali radioaktives Vanillin und radioaktiven Syringaldehyd isoliert (Nature [London] 175, 688 [1955]).