

# Zur Biogenese des Angiospermenlignins

Von

**K. Kratzl\*** und **K. Buchtela**

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 22. November 1958)

Da im Angiospermenlignin Syringyl- neben Guajacylbausteinen vorkommen, wurde für die Äthanolyse eine einfache, nur zu zwei definierten Abbauverbindungen (Aryl-methyldiketone) führende Methode entwickelt.

Es wird die Darstellung eines Mischdehydrierungspolymerisates aus Coniferylalkohol und Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C) beschrieben. Aus den Ergebnissen der Äthanolyse konnte auf die Möglichkeit des Einbaues der Syringylbausteine als  $\beta$ -Aryläther-typen geschlossen werden.

In einer früheren Arbeit wurde die Isolierung von Vanilloyl-acetyl-(3-<sup>14</sup>C) aus Äthanolysaten von <sup>14</sup>C-Implantaten in Fichtenästchen beschrieben<sup>1</sup>. Um jenes Verfahren auch für Versuche mit Laubholzlignin anwenden zu können, wurde eine Methode zur Anreicherung und Trennung von Vanilloylacetyl und Syringoylacetyl entwickelt. Zu diesem Zweck wurde das Gemisch der Phenylpropanketone und -ketole mit Eisen(III)-chlorid zu den Aryl-methyldiketonen oxydiert und diese papierchromatographisch unter Verwendung von Wasser-Benzin (Sdp. 100—110°)-Chloroform-Methanol (5:7:3:1) getrennt. Die Isolierung der Diketone erfolgte in Form der Nickelsalze der Dioxime. Diese Verbindungen sind für Aktivitätsmessungen und weitere Reinigung bestens geeignet. Die erhaltenen reinen Diketone können nun zwecks genauer Lokalisierung des markierten C-Atoms weiter abgebaut werden.

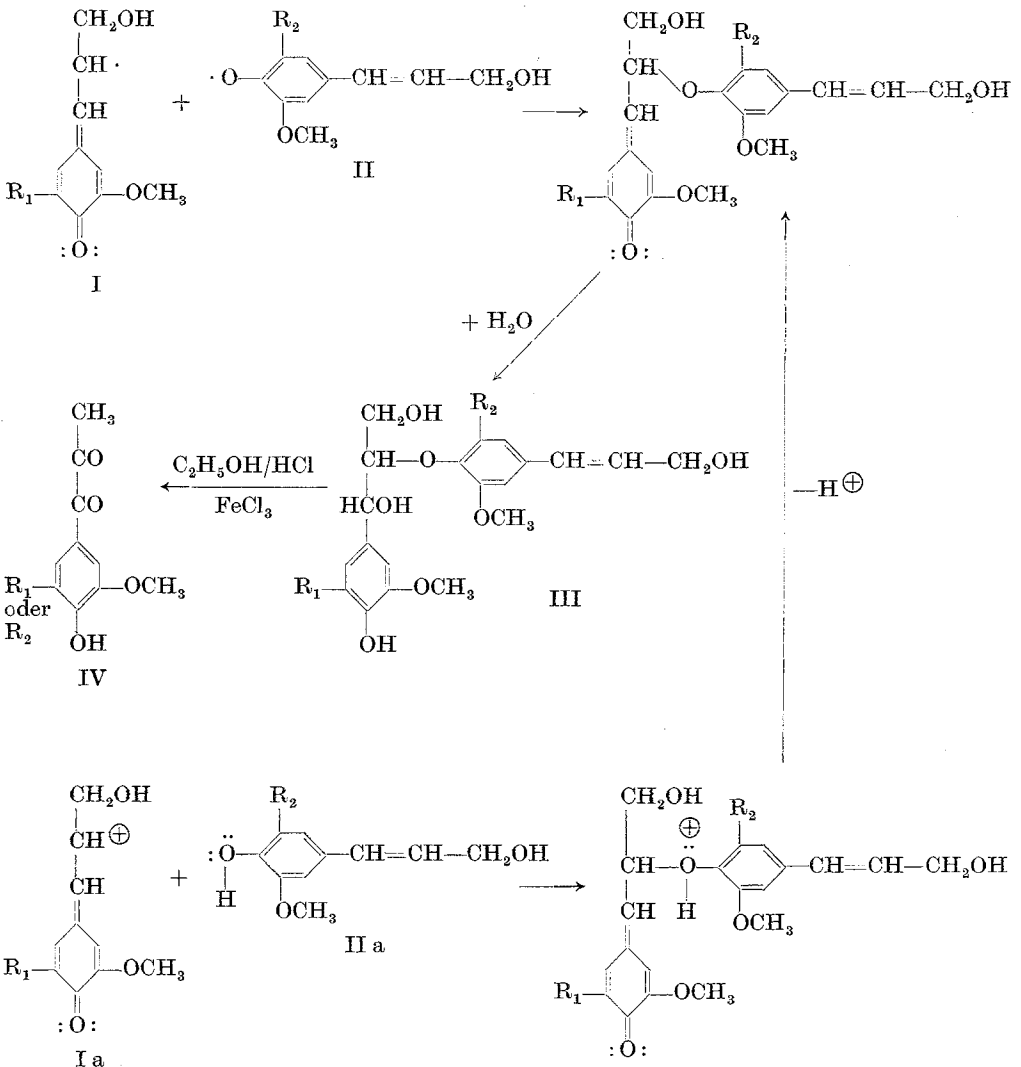
Nach *Freudenberg*<sup>2</sup> wird das Lignin der dicotylen Angiospermen durch eine enzymatisch katalysierte Mischdehydrierungspolymerisation

\* Herrn Doz. Dr. *H. Sadler* (Techn. Hochschule Wien) zum 60. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> *K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela*, Mh. Chem. **88**, 721 (1957).

<sup>2</sup> *K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs und M. Reichert*, Naturwiss. **42**, 29 (1955).

## Dehydrierungsversuche mit Sinapinalkohol



$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ : mögliches Zwischenprodukt bei der Dehydrierung von Sinapinalkohol (I, Ia; II, IIa; III).

$R_1 = R_2 = \text{H}$ : Dehydrierungspolymerisat (DHP) aus Coniferylalkohol; liefert bei der Äthanololyse Vanilloylacetyl (IV).

$R_1 = \text{OCH}_3 \cdot R_2 = \text{H}$ : Mischdehydrierungspolymerisat; liefert bei der Äthanololyse Syringoylacetyl; falls die Seitenkette von II in oxydierter (äthanolysierbarer) Form vorliegt, werden beide Diketone gebildet (IV).

der Aglucone der Cambialsaftglykoside, also von Coniferylalkohol und Sinapinalkohol, gebildet. Bei der enzymatischen Dehydrierung von Sinapinalkohol allein mit einer aus Champignons gewonnenen Laccase wurde als einziges dimeres Produkt Syringaresinol erhalten. Sinapinalkohol erleidet durch die Laccase eine tiefgreifende Veränderung. Als Endprodukt der Dehydrierung konnte das Dimethoxy-p-chinon nachgewiesen werden<sup>3</sup>. Analog wie beim Coniferylalkohol<sup>4</sup> läßt sich auch das bei der enzymatischen Dehydrierung von Sinapinalkohol in erster Stufe postulierte Chinonmethydradikal in mehreren mesomeren Grenzstrukturen anschreiben<sup>5, 6</sup>, die eine Möglichkeit zur Bildung einer C—O—C-Verknüpfung und damit das Auftreten von dimeren oder polymeren Folgeprodukten wahrscheinlich erscheinen lassen.

Sinapinalkohol wurde nun der enzymatischen Dehydrierung unterworfen. Als Ferment diente eine aus Speisechampignons gewonnene rohe Laccase. Die Reaktion wurde in verd. wäßriger Lösung bei pH 7 unter schwacher Belüftung (Durchleiten von Sauerstoff) ausgeführt. Zur Isolierung der Zwischenprodukte wurde die wäßrige Lösung mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Bei der Äthanolanalyse dieses Extraktes konnten alle *Hibbertschen* Bausteine des Syringyltyps papierchromatographisch nachgewiesen werden. Da Sinapinalkohol gegen Luftoxydation sehr empfindlich ist, können diese Typen auch spontan entstanden sein. Da nun nach *Adler* eine Verbindung vom  $\beta$ -Aryläthertyp das äthanolysierbare Strukturelement darstellt, zeigt es sich, daß unter den Zwischenprodukten der enzymatischen Dehydrierung des Sinapinalkohols eine dem *Freudenbergschen* „sekundären Baustein III“ (Formel III) nahestehende Verbindung vorhanden sein könnte. Eine Isolierung und Reindarstellung dieses Körpers gelang uns bisher nicht. Ein DHP, wie etwa beim Coniferylalkohol, wurde nicht erhalten. Es trat nur eine geringe Fällung auf.

#### Mischdehydrierungspolymerisation von Coniferylalkohol und Sinapinalkohol

Als Komponente für die enzymatisch katalysierte Mischpolymerisation mit Coniferylalkohol wurde Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C) durch Reduktion des Acetylsinapinsäurechlorids-(3-<sup>14</sup>C) mittels Lithiumaluminiumhydrid dargestellt. Syringaaldehyd-(carbonyl-<sup>14</sup>C) wurde nach *Kratzl* und *Billek*<sup>7</sup> erhalten.

<sup>3</sup> *K. Freudenberg*, in: Fortschr. Chem. org. Naturstoffe **11**, 43 (1954).

<sup>4</sup> *K. Freudenberg*, Angew. Chem. **68**, 84 (1956).

<sup>5</sup> *K. Freudenberg*, *J. H. Harkin*, *M. Reichert* und *T. Fukuzumi*, Chem. Ber. **91**, 581 (1958).

<sup>6</sup> *E. Adler*, Vortrag IV. Internat. Biochem. Kongreß, Wien 1958.

<sup>7</sup> *K. Kratzl* und *G. Billek*, Mh. Chem. **85**, 845 (1954).

Ein Gemisch von Sinapinalkohol und Coniferylalkohol gibt unter Einwirkung von Pilzlaccase ein DHP, das in gewissen Eigenschaften dem Lignin dicotyler Angiospermen nahesteht.

Aus 3 g Coniferylalkohol und 1,5 g Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C) (2321 Zerf./mg. min, 487 000 Zerf./mMol. min) wurden 3,2 g DHP erhalten. Aus der spezifischen Aktivität des Dehydrierungspolymerisates (872 Zerf./mg. min) läßt sich errechnen, daß dieses zu 37,5% aus Sinapinalkohol und 62,5% aus Coniferylalkohol gebildet wurde. Es wurden also bei diesem Versuch unter diesen speziellen Bedingungen etwa 80% des Coniferylalkohols und 66% des Sinapinalkohols enzymatisch polymerisiert. Die Äthanolyse und weitere Aufarbeitung erfolgte analog dem oben erwähnten Verfahren zum Abbau des Buchenholzlignins. Das Nickelsalz des Dioxims des Syringoylacetyls-(3-<sup>14</sup>C) zeigte eine Aktivität von 1690 Zerf./mg. min (955 000 Zerf./mMol. min), dies entspricht also annähernd der spezifischen molaren Aktivität des eingesetzten Sinapinalkohols-(3-<sup>14</sup>C). Die geringfügige Aktivität des Nickelsalzes des Vanilloylacetyldioxims (etwa 8 Zerf./mg. min) ist nur durch aktive Verunreinigung hervorgerufen.

Damit ist gezeigt, daß bei der Mischdehydrierungspolymerisation von Coniferylalkohol und Sinapinalkohol die letztere Verbindung so eingebaut wird, daß aus ihr äthanolysierbare Strukturelemente entstehen. Dies kann durch eine Reaktion zwischen den Chinonmethydradikalen I und II oder den Kryptoionen I a und II a zu III erklärt werden.

Bei der Äthanolyse werden, je nach der in I vorhandenen Gruppierung, Vanilloylacetyl oder Syringoylacetyl gebildet. Falls I aus Sinapinalkohol und II aus einem in der Seitenkette oxydierten Coniferylalkohol gebildet wird, können bei der Äthanolyse beide Diketone entstehen.

Die Untersuchung von Angiospermenlignin soll Antwort auf die Frage nach den Zusammenhängen zwischen den beiden Phenylpropan-typen der Vanillin- und Syringareihe geben.

Bei der Untersuchung von Bambuslignin findet *Higuchi*<sup>8</sup> eine Abhängigkeit des Mengenverhältnisses obgenannter Bausteintypen vom Verholungsgrad. Bei älteren Pflanzen wird Syringaaldehyd als Hauptprodukt des oxydativen Abbaus erhalten.

*Brown* und *Neish*<sup>9</sup> haben die „Verdünnungsgrade“ der Radioaktivität nach Einbau <sup>14</sup>C-markierter Ligninprogenitoren und anschließendem oxydativem Abbau des Holzes untersucht. Sie fanden bei der Verabreichung von markierter Shikimisäure, ebenso wie bei der Zugabe von markiertem Phenylalanin, eine gleichmäßige Verteilung

<sup>8</sup> *T. Higuchi*, *Physiol. Plantarum* **10**, 633 (1957).

<sup>9</sup> *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **32**, 170 (1954); **33**, 948 (1955); *Nature* **175**, 688 (1955).

der Aktivität auf die beim oxydativen Abbau erhaltenen Phenolaldehyde. Die Einführung von Hydroxy- und Methoxygruppierungen in den aromatischen Kern scheint somit in der pflanzlichen Zelle leicht möglich zu sein. Ob dieser Umbau vor oder nach der Polymerisationsreaktion stattfindet, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Die gleichmäßige Verteilung der Aktivität auf die Aldehydfractionen spricht für eine Umwandlung vor der Polymerisation.

Antwort auf diese Fragen könnte ein Abbau aktiver Hölzer bei verschiedenen Verholzungsgraden der Pflanze geben. Durch Anwendung des in vorliegender Arbeit angegebenen Äthanolyseverfahrens auf aktive Buchenholz-Infusionen ist insofern eine günstige Methode gegeben, da die erhaltenen Abbauprodukte (Phenylpropanketone) einem für Lignin typischen Strukturelement ( $\beta$ -Arylätherstruktur) entstammen. Versuche dieser Art sind in Arbeit.

### Experimenteller Teil

#### Sinapinalkohol-(3- $^{14}$ C)

*Sinapinsäure*-(3- $^{14}$ C): 351 mg Syringaaldehyd-(carbonyl- $^{14}$ C) mit einer spezif. Aktivität von  $3,28 \cdot 10^6$  Zerf./mg. min, 600 mg Malonsäure und zwei Tropfen frisch destill. Anilin wurden in 1,2 ml Pyridin 4 Stdn. auf 60° erwärmt. Danach wurde in verd. HCl gegossen und nach guter Kühlung abgesaugt. Ausb. 402 mg (= 93% d. Th.). Schmp. 192°.

*Acetylsinapinsäure*-(3- $^{14}$ C): 402 mg vorstehender Säure wurden mit 1 ml Essigsäureanhydrid und 1,2 ml Pyridin 1 Stde. auf 100° erwärmt. Anschließend wurde im Vak. zur Trockene gedampft und aus Eisessig/Wasser umkristallisiert. Ausb. 436 mg (= 90% d. Th.). Schmp. 187°

*Acetylsinapinsäurechlorid*-(3- $^{14}$ C): 436 mg Acetylsinapinsäure-(3- $^{14}$ C) wurden mit 7 ml  $\text{SOCl}_2$  2 Stdn. auf 60—65° erwärmt. Danach wurde im Vak. zur Trockene gedampft, der Rückstand in Benzol gelöst und dieses erneut abgedampft. Nach Umkristallisieren aus Benzol wurden 378 mg (= 81% d. Th.) vom Schmp. 148—150° erhalten.

*Sinapinalkohol*-(3- $^{14}$ C): Zur Weiterverarbeitung wurde vorstehendes Säurechlorid mit 3,622 g inaktivem Acetylsinapinsäurechlorid verdünnt, in 40 ml Benzol und 100 ml Äther gelöst und auf 0° gekühlt. Unter kräftigem Rühren und Durchleiten von trockenem reinem Stickstoff wurden im Verlauf von 2 Stdn. 950 mg Lithiumaluminiumhydrid in 100 ml Äther zutropfen gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt weitere 2 Stdn. gerührt, langsam auf Zimmertemp. erwärmt und über Nacht stehen gelassen. Das gelblich gefärbte Anlagerungsprodukt wurde abgesaugt und anschließend in kleinen Anteilen in eine gut gekühlte und mit Äther überschichtete Lösung von 2,7 g Ammoncarbonat in 15 ml Wasser eingetragen. Die äther. Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Lösung mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Nachdem die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet worden war, wurde unter vermindertem Druck im Stickstoffstrom eingedampft, der ölige Rückstand in Chloroform aufgenommen und der Sinapinalkohol durch Zugabe von Petroläther gefällt. Ausb. 1,51 g (= 50,3% d. Th.). Spezifische Aktivität: 2321 Zerf./mg. min.

Enzymatische Dehydrierung eines Gemisches aus Coniferylalkohol und Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C)

In 5 l Phosphatpufferlösung nach *Sörensen* vom pH 7 wurden 3 g Coniferylalkohol und 1,5 g Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C) (spezif. Aktivität 2321 Zerf./mg. min) gelöst und anschließend 1 g Pilzenzym eingetragen. Nach der Zugabe des Enzyms wurde bei Zimmertemp. Sauerstoff in schwachem Strome durch die Lösung geleitet. Schon nach kurzer Zeit trat Trübung ein. Nach drei Tagen wurde der Niederschlag abzentrifugiert. Der in feuchtem Aceton lösliche Anteil konnte mit Wasser wieder ausgefällt werden. Im so gereinigten und anschließend getrockneten Dehydrierungspolymerisat konnte kein Stickstoff nachgewiesen werden. Das hellbraune Endprodukt fiel in einer Ausbeute von 3,2 g (= 70%) an und hatte eine spezif. Aktivität von 872 Zerf./mg. min.

Aus der Aktivität kann errechnet werden, daß das DHP zu 37,5% aus Sinapinalkohol-(3-<sup>14</sup>C) und zu 62,5% aus Coniferylalkohol gebildet worden war.

## Äthanolyse

Bei der Äthanolyse nach *Hibbert* von 3,2 g DHP wurden 102,4 mg „distillable oil“ erhalten.

Bei der Oxydation mit Eisen(III)-chlorid<sup>1</sup> konnte das Gemisch der Nickelsalze der beiden Diketondioxime in einer Ausbeute von 30 mg erhalten werden.

## Trennung der Abbauprodukte

Nach der Zersetzung der Nickelsalze wurden die Diketone papierchromatographisch getrennt. Zu diesem Zweck wurde die Substanz als Streifen am Start des Chromatogramms aufgetragen. Als bewegliche Phase diente ein Gemisch von Benzin : Wasser : Chloroform : Methanol, 7 : 5 : 3 : 1. Die mit Äthanol eluierten Diketone wurden neuerlich als Nickelsalze der Diketondioxime gefällt. Die Aktivität der Nickelsalze wurde in endlicher Schichtdicke auf Aluminiumplättchen gemessen. Diese Präparate wurden durch Sedimentation einer äther. Suspension erhalten.

	Menge	Zerf./ mg · min	Totale Aktivität Zerf./min	Zerf./ mMol · min
Sinapinalkohol-(3- <sup>14</sup> C) . . . . .	1,5 g	2321	3,48 · 10 <sup>6</sup>	487 · 10 <sup>3</sup>
Coniferylalkohol . . . . .	3,0 g	0	0	0
DHP . . . . .	3,2 g	872	2,79 · 10 <sup>6</sup>	—
Nickelsalz des Syringoylacetyl- dioxims . . . . .	14,3 mg	1690	24200	955 · 10 <sup>3</sup>
Nickelsalz des Vanilloylacetyl- dioxims . . . . .	18,6 mg	8	149	4000

Die Aktivität des Vanilloylacetyls ist durch radioaktive Verunreinigungen bedingt.

Der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung danken wir für die großzügige Förderung, die sie dieser Arbeit angedeihen ließ.