LANDBOUWPROEFSTATION
EN BODEMKUNDIG INSTITUUT T.N.O. - GRONINGEN

Rapport II - 1954

EEN ORGANISCH-CHEMISCHE BESCHOUWING VAN ENIGE THEORIEEN OVER HUMUSVORMING

door

H. van Dijk

-o O o-

431689

C 5348

Een organisch-chemische beschouwing van enige theorieën over humusvorming

door

H.van Dijk

Inleiding

Men kan zich moeilijk een meer ingewikkeld reactievat indenken dan de grond, waar een mengsel van stoffen van organische en anorganische aard, van de meest uiteenlopende samenstelling, sommige in vaste, andere in opgeloste en weer andere in gasvormige toestand, met moleculaire afmetingen variërend van die van eenvoudige verbindingen tot die van hoogpolymeren, in onderlinge wisselwerking staan en onderhevig zijn aan allerlei chemische, biologische en microbiologische omzettingen, die gedeeltelijk naast elkaar verlopen, maar ook gedeeltelijk in elkaar grijpen. Het zal dus duidelijk zijn, dat men voor het verkrijgen van inzicht in de processen die zich in de grond afspelen; meestal is aangewezen op onderzoek aan de afzonderlijke bestanddelen of ook, als deze moeilijk uit de grond zijn te isoleren,(wat bij humusstoffen gedeeltelijk het geval is) op onderzoek aan modelstoffen. Uiteraard kan men op grond van de resultaten van dergelijk detailonderzoek (en vergelijkend onderzoek) nog niet exact voorspellen, wat in werkelijkheid in de grond als geheel zal gebeuren, aangezien er onderlinge beïnvloeding is van verschillende processen, maar zo kan men toch de problemen reeël benaderen.

Het humusonderzoek is van organisch-chemisch standpunt bekeken, nog, of liever nog stéeds(want de eerste onderzoekingen dateren reeds van ruim 150 jaar terug) in het allereerste stadium nl. van het proberen de organische stoffen uit de grond te isoleren en hun structuur op te helderen. Dat het onderzoek nog niet verder is, vindt zijn verklaring in de volgende verschijnselen:

1) De isolering van de afzonderlijke componenten is zeer moeilijk, aangezien er gedeeltelijk een binding aan de kleideeltjes bestaat, die moeilijk te verbreken is, zonder ook de organische stof zelf aan te tasten.

2) We hebben hier niet te maken met enkele eenvoudige verbindingen, maar met een mengsel van grotendeels macromoleculaire stoffen van ingewikkelde opbouw.

3) Dit mengsel heeft geen constante samenstelling, maar de humusvorming is afhankelijk van aard en samenstelling van de uitgangsstoffen, klimatologische omstandigheden, bezetting met micro-organismen, vochtigheidstoestand, aard van de minerale bestanddelen, pH enz.

Vandaar dan ook, dat het niet mogelijk is een goede chemische definitie te geven van wat humus is. Het begrip humus is een vrij vage aanduiding, waaraan verschillende onderzoekers ook een verschillende inhoud geven, met als gevolg een aanzienlijke verwarring en veel misverstand in de literatuur. Sommigen (b.v. Waksman en Scheffer) verstaan onder humus het totaal van alle organische stoffen in de grond, andere meer dat deel, dat na een zekere verrotting van de plantaardige en dierlijke resten achter blijft en tamelijk bestendig is tegen verdere omzettingen. In het laatste geval is het koolstofgehalte ongeveer 50 % en het stikstofgehalte ongeveer 5-6 %, de C/N-verhouding is dan dus ongeveer 8-10:1. Deze verhouding blijkt min of meer een constante te zijn. Op het voor en tegen van de verschillende definities zal hier niet nader worden ingegaan. In verband met het doel van deze scriptie zal alleen de volgende definitie van Schuffelen (69) worden vermeld: "Humus is een in de grond door condensatie en polymerisatie van de ontledingsproducten van dierlijke en plantaardige resten gevormde stof".

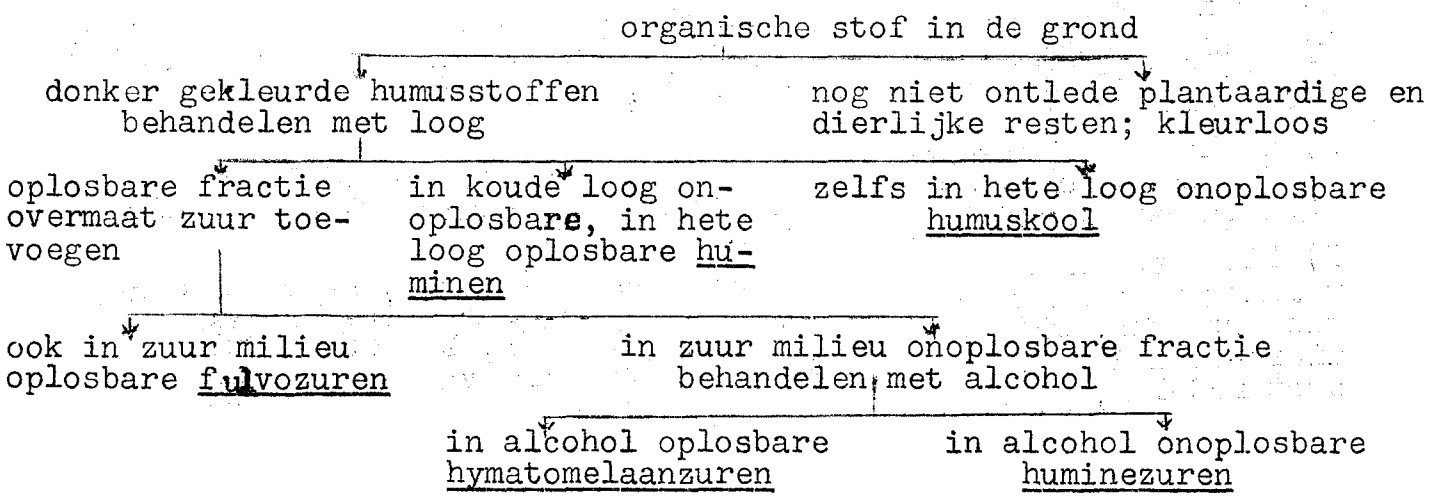
Colloid-chemisch behoren de humusstoffen tot hydrophiele colloiden met electrolytkarakter en wel bij inbouw van weinig stikstof in de macromoleculen tot de zwakke zuren, terwijl de eigenschappen bij hoger stikstofgehalte meer amphoteer zijn. Het colloid-chemisch gedrag is dus afhankelijk van de samenstelling en de opbouw van het macromolecule, maar ook van de pH en de kationenbezetting.

Het doel van deze scriptie is enkele theorieën over de vorming van humusstoffen, in de zin van ter plaatse meer bestendige omzettingsproducten, ontstaan uit plantaardige en dierlijke resten en microbiologische stofwisselingsproducten organisch-chemisch te toetsen.

Om enkele in de humuschemie gebruikelijke namen en begrippen te verstaan, moet echter vooraf nog even kort worden ingegaan op methoden voor fractionering en karakterisering van humusstoffen.

I. Methoden voor fractionering en karakterisering van humusstoffen

Door Scheffer(63) wordt de volgende, reeds voornamelijk door Oden(57) ontworpen fractioneringsmethode gegeven:



De huminezuren vormen slechts een relatief klein deel van het totaal van de organische stof, maar worden algemeen beschouwd als de meest karakteristieke bestanddelen van de humus. Het meeste onderzoek is dan ook hieraan verricht.

Van de fracties fulvozuren en hymatomelaanzuren is niet precies te zeggen in hoeverre deze mengsels van stoffen uit echte humusstoffen bestaan. Zeker is, dat dit slechts voor een gering deel van de fulvozuren geldt. Deze fractie bevat nl. ook alle eenvoudige, in alkali, zuur en water oplosbare suikers, aminozuren, sommige polysacchariden e.d., die zeer goed aantastbaar zijn voor micro-organismen (zie o.a. Forsyth(31,32). De hymatomelaanzuren worden wel beschouwd als lagerpolymere huminezuren(Jodl(42),Welte(85), waaruit door voortgezette condensatie of polymerisatie huminezuren kunnen ontstaan. Dit geldt volgens Forsyth(30) ook voor sommige bestanddelen van de fulvozuurfractie b.v. de phenolische glucosiden, waaruit na hydrolyse met verdund zoutzuur en polymerisatie van de phenolen in alkalisch milieu (zie hoofdstuk IV) huminezuren kunnen ontstaan. Volgens Laatsch(45) is de scheiding van hymatomelaanzuren en huminezuren het doelmatigst te bewerkstelligen door uitschudden met een mengsel van amyl- of isobutylalcohol en zoutzuur. Vermoedelijk ontstaan huminen en tenslotte humuskool door verlies van carboxylgroepen en verdere condensatie uit huminezuren. Deze fracties zijn landbouwkundig vrijwel waardeloos(o.a. geen uitwisselingscapaciteit meer).

Men dacht aanvankelijk met deze fractionering een chemische aantasting van het materiaal te hebben vermeden. Naderhand bleek echter, dat er onder invloed van alkali en zuurstof van de lucht veranderingen plaatsgrijpen. Hierop wordt in hoofdstuk III en IV nog nader ingegaan. Om deze aantasting te vermijden, werd door Simon(72) e.a. ter isolering van huminezuren extractie met oplossingen van zouten van kalkneerslaande zuren als Na F, Na-oxalaat e.d. voorgesteld, terwijl Bremner c.s.(6) extractie met oplossingen van zouten, die complexen vormen met verschillende metaalionen aanbevelen bijv. $Na_4P_2O_7$. De vrije huminezuren, de zouten hiervan met aardalkalimetalen (waarvan Ca met meest in de grond voorkomt) en met metalen als Fe zijn nl. zeer slecht of in het geheel niet in water oplosbaar, terwijl de alkalizouten in het algemeen wel oplosbaar zijn.

Veel onderzoek naar de chemische en physische eigenschappen van de humusstoffen is verricht aan chemisch aangetast materiaal, terwijl bij de hieruit getrokken conclusies voor de werking van de organische stoffen in de grond niet het, op grond van deze aantasting nodige, voorbehoud werd gemaakt. Om een indruk te krijgen van de samenstelling van de organische stof in de grond als geheel, is een analysemethodiek voorgesteld door Waksman(83), die hier, gewijzigd en aangevuld door Springer(74,75) e.a. zal worden weergegeven. Deze methode berust gedeeltelijk op een gefractioneerde hydrolyse van het materiaal. Hier is dus geen sprake van een onveranderd isoleren van de stoffen, waarvan dan structuur en eigenschappen kunnen worden bestudeerd.

De methode is als volgt:

1) het luchtdroge materiaal wordt in een soxhlet geëxtraheerd met aether, waarbij voornamelijk harsen en vetten oplossen.

2) het residu van (1) wordt evenzo geëxtraheerd met alcohol, waarbij naast wassen, looistoffen(tannine), alkaloïden e.d. ook "ligninezuren"(ontstaan door oxydatie van lignine) oplossen.

3) het residu van (2) wordt geëxtraheerd met koud water, waarin suikers, sommige aminozuren en andere organische zuren en sommige proteïnen oplossen; vervolgens met heet water, waarin stijfsel, sommige pectinestoffen, aminozuren en proteïnen, "ligninezuren" en zelfs een gedeelte van de echte huminezuren oplossen. Dit is dus een zeer inhomogeen mengsel. Om hierin het gehalte aan huminezuren te bepalen adviseert Springer tot behandeling van het tot droog ingedampte filtraat met acetylbromide, waarover straks meer. Verder kan natuurlijk een suiker- en stikstofbepaling, eventueel na hydrolyse met zoutzuur in dit extract gedaan worden.

4) het residu van (3) wordt 5 uur lang op 100° verhit met 2%-ig zoutzuur. Hierbij worden de meeste hemicellulosen(pentosanen, hexosanen, polyuroniden e.d.) en verschillende eiwitten, voorzover nog niet door voorafgaande behandelingen verwijderd, gehydrolyseerd. Uit een suikerbepaling in het filtraat wordt dan het gehalte aan "hemicellulosen" berekend. Dit is een minimumwaarde, daar sommige hemicellulosen moeilijk te hydrolyseren zijn, terwijl andere ontleden door koken met verdund zuur (zie hoofdstuk II). Door Bremner (7) is de samenstelling van de verschillende eiwitten onderzocht door chromatografische adsorptie van het hydrolysaat.

5) het residu van (4) wordt enige tijd met koud 80%-ig zwavelzuur behandeld, waarna verdund wordt met water en aan de terugvloeikoeler wordt gekookt. De koolhydraten, die hierbij gehydrolyseerd worden, betitelt Waksman als cellulose, maar hierbij moeten aanhalingstekens geplaatst worden, aangezien dit geen zuivere katoencellulose is (zie over het begrip cellulose bijv. Norman (54). Ook dit, uit een suikerbepaling berekende "cellulose"-gehalte,is waarschijnlijk een minimumwaarde.
Verder worden door deze behandeling nog moeilijk hydrolyseerbare, eventueel aan andere bestanddelen gebonden polypeptiden gehydrolyseerd (zie hoofdstuk II 1b).

6) Het residu van 5 bevat voornamelijk de lignine, de huminezuren, huminen en humuskool en eventuele tussenproducten van de omzetting van lignine in humusstoffen en verder minerale bestanddelen. Met behulp van acetylbromide kan hierin nog het gehalte aan huminestoffen afzonderlijk worden bepaald.

Om het gehalte aan uronzuren en polyuroniden(een groep stoffen, waaraan de laatste tijd steeds meer aandacht wordt besteed en die apart in hoofdstuk II 1a worden behandeld) afzonderlijk te bepalen, gaat men het oorspronkelijke materiaal met ongeveer 12 %-ig zoutzuur verhitten, waarbij de uronzuren CO_2 afsplitsen. Uit een bepaling van deze hoeveelheid CO_2 berekent men dan het uronzuurgehalte. Bij deze bepaling wordt dus aangenomen, dat de CO_2 vrijwel uitsluitend afkomstig is van uronzuren (carbonaten zijn vooraf verwijderd). Volgens Mattson (53) wordt uit geautoxydeerde lignine door koken met 12 % ig zoutzuur een grote hoeveelheid CO_2 afgesplitst. Een nauwkeurig systematisch foutenonderzoek is voor deze bepaling dus noodzakelijk en ook reeds gedeeltelijk uitgevoerd (Fuller c.s.(33,35)). Door de afbraak van vers plantenmateriaal in de grond met behulp van deze groepenanalyse te vervolgen, bleek dat bestendigheid ten opzichte van de gebruikte chemische reagentia min of meer parallel verloopt aan bestendigheid ten opzichte van microbiologische aantasting. Met behulp van deze methodiek kan men dus een indruk krijgen van het humificatiestadium, waarin zich het materiaal bevindt. Eenvoudig-

heidshalve wordt dit ook wel bepaald, door slechts de behandeling met geconcentreerd zwavelzuur als in punt 5 genoemd, toe te passen.

Hierbij moet echter opgemerkt worden, dat onveranderd lignine ook niet oplost in geconcentreerd zwavelzuur, zodat het residu na hydrolyse met zwavelzuur nog niet zonder meer gelijk gesteld kan worden aan huminestoffen. Volgens Springer(75) gaat onder aerobe omstandigheden de omzetting van lignine in huminestoffen wel min of meer gelijk op met de vertering van het gemakkelijker aantastbare materiaal, maar kan onder anaerobe omstandigheden ophoping van onveranderd of slechts gedeeltelijk omgezet lignine plaatsvinden. Daarom is door verschillende onderzoekers, vooral door Springer, voorgesteld het materiaal met acetylbromide te behandelen, waarin behalve koolhydraten en andere stoffen ook lignine en nog maar weinig omgezet lignine oplost. Aangezien bleek, dat anorganische bestanddelen als kleien en Ca^{++}-ionen sterk van invloed zijn op de oplosbaarheid in acetylbromide, stelde Springer voor het materiaal vooraf 30 min. met 5 %-ig zoutzuur bij ongeveer 50°C te behandelen om het praeparaat asvrij te maken. Door Laatsch(45) werd echter aangetoond, dat deze voorbehandeling lang niet altijd voldoende is, om minerale bestanddelen te verwijderen. Verondersteld wordt, dat de werking van acetylbromide voornamelijk berust op een acetylering, waardoor verschillende verbindingen oplosbaar worden. In plaats van acetylbromide wordt door Springer(77) ook wel een behandeling met een mengsel van ijsazijn, azijnzuuranhydride en geconcentreerd zwavelzuur voorgesteld. Dit acetyleringsmengsel werkt nog rigoureuzer dan acetylbromide en heeft het voordeel gemakkelijker te maken en te hanteren te zijn.

Het verloop van de humificatie wordt ook wel colorimetrisch nagegaan(Springer(76), Scheffer(63).

Vervolgens moet nog even nader worden ingegaan op de functie van de stikstof in humus. Reeds vroeg werden allerlei pogingen gedaan om stikstofhoudend materiaal (dat als verontreiniging werd beschouwd) te scheiden van de "zuivere humuszuren". Dit mislukte steeds en tegenwoordig is men dan ook van mening, dat deze stikstof gedeeltelijk heterocyclisch in het macromolecuul van de huminezuren is ingebouwd. Hierop zal bij de behandeling van verschillende theorieën wel nader worden ingegaan.

De meestal gevolgde methode voor het onderzoek naar de vorm, waarin stikstof is gebonden, bestaat hieruit, dat men N-totaal bepaalt volgens Kjeldahl en de hoeveelheid als NH_3 vrijkomende stikstof bij verhitting met MgO. (Volgens Flaig(25) worden bij de laatste bepaling niet altijd juiste waarden verkregen en is verhitting met natronloog misschien meer aan te bevelen.) Het verschil tussen de zo verkregen waarden voor N-totaal en voor NH_3-N beschouwt men dan als heterocyclisch gebonden stikstof.

De bepaling van het gehalte aan aminozuren in een hydrolysaat wordt meestal uitgevoerd volgens de methode van Slyke (behandeling met salpeterigzuur, waarbij uit de hoeveelheid vrijkomende N, het gehalte aan aminozuren berekend wordt). Helaas heeft men ook hier geen systematisch onderzoek ingesteld naar storende invloeden van andere stoffen, zodat de waarde van deze bepalingen nog maar betrekkelijk is. Dit wordt gedemonstreerd door het onderzoek van Bremner(8), die aantoonde dat er ook bij behandeling van lignine en andere phenolische verbindingen met salpeterigzuur N_2-ontwikkeling optrad. Reeds bij de hydrolyse kunnen er complicaties optreden naar bleek uit een onderzoek van Laatsch

en Schlichting(48). Zij vonden nl. te lage waarden voor aminoverbindingen, als de grond bruinsteen bevatte. Bij hydrolyse met 6 n. zoutzuur werd dit door MnO_2 geoxydeerd waarbij chloor vrijkwam. Vermoedelijk worden dan door vorming van HCl en HClO de aminozuren aangetast tijdens de hydrolyse.

Door verschillende onderzoekers wordt nog onderscheid gemaakt tussen z.g. "Grau"- en "Braun"-huminezuren. "Grau"-huminezuren vertonen een hogere lichtabsorptie, grotere bestendigheid ten opzichte van loog, grotere electrolytgevoeligheid, sterkere binding aan kleien en andere adsorbentia en hoger stikstofgehalte dan de "Braun"huminezuren. In de meeste gronden zou een mengsel van beide typen voorkomen. Als karakteristieke eigenschappen van de huminezuren worden wel de volgende genoemd:

1) ze zijn onoplosbaar in acetylbromide (dit gaat overigens volgens Laatsch(45) niet geheel op).
2) in droge toestand zijn het donkerbruine tot zwarte metaalachtig glanzende stoffen.
3) De Ca^{++}- en Fe^{+++}-zouten zijn onoplosbaar(ook dit moet men niet al te absoluut zien. De calciumhumaten zijn soms beter oplosbaar dan de vrije zuren).
4) Ze zijn in alkali oplosbaar en met overmaat zuur (pH <3.0) weer neer te slaan.
5) Volgens Laatsch(45) hebben huminezuren een looistofkarakter (De bepaling geschiedt als volgt: De huminezuren worden opgelost in een 1%-ige NaF-oplossing en op pH 5-6 gebracht waarna een 1 %-ige verse gelatine-oplossing, waarin 10 % NaCl aanwezig is, wordt bijgedruppeld, totdat een neerslag ontstaat).
6) Bij oxydatie met chloordioxyde in een waterige oplossing volgens Schmidt en Atterer(67) wordt o.a. maleïnezuur gevormd.
7) De chloreringsproducten zijn volgens Laatsch(45) oplosbaar in aether.
8) De extinctiecoëfficiënt en dergelijke colorimetrische grootheden.
9) Het absorptiespectrum in ultra-violet licht.
10) Het basenuitwisselingsvermogen.
11) Het Röntgenspectrum, het electronen-microscopisch beeld, het gedrag als redoxsysteem, de viscositeit, de loopsnelheid bij electrophorese e.d.

Het is wel zeker, dat men bij vergelijking van verschillende huminezuren niet kan volstaan met het onderzoeken van één of enkele eigenschappen, maar dat een hele reeks eigenschappen moet worden onderzocht om gefundeerde uitspraken te kunnen doen.

II Theorieën over vorming van humus uit koolhydraten en eiwitten

Ongetwijfeld spelen koolhydraten en eiwitten een belangrijke rol bij de humusvorming. In de literatuur worden daarbij twee mogelijkheden onderscheiden.

1) Ze kunnen als zodanig, eventueel gebonden aan andere stoffen, integrerende bestanddelen van humus vormen, in die zin dat ze in het milieu waarin ze aanwezig zijn, betrekkelijk resistent zijn ten opzichte van microbiologische aantasting.

2) Uit splitsingsproducten zoals aminozuren en monosacchariden, die zijn ontstaan door fermentatieve hydrolyse of uit stofwisselingsproducten (speciaal chinoide verbindingen) van micro-organismen, die koolhydraten en eiwitten hebben benut als voedingsbron, ontstaan door chemische of enzymatische omzettingen humusstoffen.

1a Wat betreft de koolhydraten als zodanig

Bij toepassing van de groepenanalyse volgens Waksman op plantaardige resten in verschillende stadia van ontleding, bleek dat de inhoud van de plantencellen nl. eiwitten, suikers en andere in water oplosbare celstoffen, snel wordt aangetast en dat daarna de celwandstoffen aan de beurt komen, die langzamer ontleden. Hiertoe behoort het grootste deel van de koolhydraten. Daarbij kwam echter een merkwaardig feit aan het licht. Het "cellulose"-gehalte bleek nl. in het algemeen regelmatig af te nemen tot vrijwel alles verteerd was, maar het "hemicellulose"-gehalte bereikte na een aanvankelijk soms snellere afname dan de "cellulose"-fractie een soort evenwichtstoestand of nam zelfs relatief toe. Bij nader onderzoek bleek het polyuronzuurgehalte in deze fractie te gaan overheersen (zie o.a. Springer + Lehner(278)). Zo werd door Forsyth(31) in de oppervlaktelaag van de minerale gronden in Noord-Oost Schotland gemiddeld 5-20 % "hemicellulose" (waarvan 5-15 % "uronzuuranhydride") en slechts 0-5 % "cellulose" gevonden. Ook Fuller(35) merkt op, dat de verhouding uronzuur C: totaal C bij planten veel lager is dan bij de organische stof in de grond en dat er een werkelijke ophoping is bij voortgaande ontleding.

Het uronzuur C-gehalte van een groot aantal gronden bleek te variëren van 1/10-1/3 van de totale hoeveelheid koolstof.

Norman en Bartholemew (56) geven de verdeling van uronzuur-C in twintig grondprofielen en komen tot de conclusie, dat ongeveer 10-15 % van de organisch gebonden koolstof uit de oppervlaktelaag in de vorm van uroniden aanwezig is, terwijl dit gehalte nog stijgt met de diepte, vooral bij gronden waar gemakkelijk uitspoeling optreedt.
Zoals bij de bespreking van de bepalingsmethodiek voor uronzuur in hoofdstuk I reeds is opgemerkt, staat de betrouwbaarheid van de opgegeven cijfers nog niet vast, maar er zijn toch duidelijke (ook indirecte) aanwijzingen, dat een algemene tendens tot ophoping van polyuroniden wel bestaat. Hoe moet dit verklaard worden?
Norman(55) merkt op, dat accumulatie van onveranderde hemicellulosen uit de plant onwaarschijnlijk is, want deze zijn gemakkelijk microbiologisch aantastbaar. Dit hoeft echter niet altijd het geval te zijn. Volgens Tenney en Waksman (81) zijn de hemicellulosen uit sphagnum zeer resistent ten opzichte van microorganismen.
Door Anderson en Sands(1) wordt opgemerkt, dat extractie van plantenuroniden met alkali soms moeilijkheden oplevert, doordat ze door lignine afgeschermd worden of hieraan gebonden zijn. Hiermee is echter nog niet gezegd, dat ze daardoor ook microbiologisch onaantastbaar zijn, al zal een eventuele binding hierop wel van invloed zijn. Anderson en Sands merken echter ook op,

dat de in hemicellulosen dikwijls aanwezige, zeer stevig aetherisch gebonden methylgroepen in het algemeen de hydrolyse van deze polyuroniden bemoeilijken. Hetzelfde kan worden gezegd van de carboxylgroepen, terwijl een pyranoside binding tussen de eenheden ook veel moeilijker te verbreken is dan een furanoside.
Op grond van de vrij algemeen aanvaarde hypothese, dat microbiologische bestendigheid min of meer parallel loopt met bestendigheid ten opzichte van chemische hydrolyse, zou deze moeilijke aantastbaarheid dus misschien gedeeltelijk verklaard kunnen worden uit de structurele opbouw van sommige polyuroniden. De in de grond aanwezige koolhydraten zijn echter zeker niet alle van plantaardige oorsprong. Een groot aantal micro-organismen is in staat polysacchariden te synthetiseren, waarin dikwijls uronzuurgroepen voorkomen (slijmontwikkeling). Volgens Fuller (34) zijn de polyuroniden in de grond zelfs voornamelijk van microbiologische oorsprong. Deze uitspraak baseert hij op de volgende waarnemingen:

1) Er vond een werkelijke synthese van uroniden plaats tijdens een later stadium van ontleding van gecomposteerde alfalfa.

2) Naarmate de ontleding van plantenuroniden verder gaat en de gesynthetiseerde uroniden zich ophopen, nadert de decarboxylatiesnelheid (weer bepaald door koken met 12 %-ig zoutzuur) meer die van uroniden uit grond.

3) geïsoleerde bacteriële polyuroniden decarboxyleren met een snelheid, die meer overeenkomt met die van grond, dan met die van planten. De meningen zijn nog verdeeld over de vraag of deze microbiële polyuroniden ontstaan door een beperkte oxydatieve afbraak van de plantaardige koolhydraten of dat ze volledig worden opgebouwd door de micro-organismen. Het laatste kan in ieder geval voorkomen, want men heeft polyuroniden geïsoleerd uit een voedingsbodem waarin slechts glucose als C-bron aanwezig was, maar dat het eerste niet óók kan optreden is nog niet uitgesloten (zie o.a. het overzicht van O.v.Plotho(60)). Nader onderzoek naar de structurele opbouw van deze relatiefbestendige koolhydraten is zeker gewenst, mede in verband met het feit, dat volgens verschillende onderzoekers(Geoghegan en Brian (36), Swaby (80) polysacchariden en -uroniden invloed uitoefenen op de aggregatietoestand van de grond (er zijn structuurregelaars gemaakt op carboxymethylcellulose basis).

1b Wat betreft de eiwitten als zodanig

Een ophoping van vrije eiwitten in de grond, vindt voorzover bekend, niet plaats, maar eiwitten worden i.h.a. snel afgebroken,(voorzover niet aanwezig in levende organismen) tenzij ze door binding aan andere bestanddelen microbiologisch min of meer onaantastbaar worden.
Ensminger en Gieseking(22) gingen de enzymatische hydrolyse van albumine en haemoglobine na in zuur en alkalisch milieu in aanwezigheid van verschillende kleien. Daarbij bleek, dat deze eiwitstoffen in sterke mate geconserveerd werden door binding aan sommige kleien (afhankelijk van de uitwisselingscapaciteit. Montmorilloniet bleek zeer actief, terwijl kaoliniet slechts een gering effect uitoefende). Ensminger en Gieseking zien twee verklaringsmogelijkheden nl. adsorptie van het eiwitmolecuul in zodanige oriëntatie, dat de actieve groepen onbereikbaar zijn voor het enzym of een adsorptie van het enzym, maar ze geven aan

de eerste verklaring de voorkeur. Volgens Pinck en Allison is er echter een derde verklaring nl. dat het eiwitmolecuul tussen de roostervlakken van het montmorilloniet schuift. Ook dit wordt echter weer door anderen ontkend. Het werkelijke mechanisme is dus nog niet definitief opgehelderd.
Waksman en Iyer(84)maakten ligno-proteïne complexen door alkalische oplossingen van lignine en eiwit (caseïne) te mengen in verhoudingen van 3 : 1 tot 6 : 1, waarna de mengsels òf met mineraal zuur bij pH 4.8 òf met zouten als $CaCl_2$, $FeCl_3$ en $AlCl_3$ bij pH 7.0 werden neergeslagen. Na filtreren, wassen en drogen werden complexen verkregen die wat betreft kleur, oplosbaarheid in water en in alkali, chemische reactiviteit (basen uitwisselingsvermogen) en weerstand tegen microbiologische afbraak overeenkwamen met de in loog oplosbare en met zuur te precipiteren fractie van humus. Op grond hiervan veronderstelde Waksman, dat het grootste deel van de humus in grond, venen en composten bestaat uit een dergelijk of overeenkomstig ligno-proteïnecomplex.
Wat betreft het reactiemechanisme tussen lignine en eiwit bespreekt Waksman(84) de volgende mogelijkheden:

a zoutvorming door reactie van carboxylgroepen uit lignine met aminogroepen uit het eiwit.

b reactie tussen phenolische hydroxylgroepen uit lignine en aminogroepen uit het eiwit.

Het bezwaar van Waksman tegen deze twee mogelijkheden is, dat de complexen moeilijk waren te hydrolyseren, wat niet geldt van deze bindingen.

c reactie tussen een carbonylgroep van lignine en een aminogroep van het eiwit, waarbij een schiffse base zou ontstaan, door Waksman als volgt geformuleerd:

$$C52\ H46\ O10(OCH_3)(COOH)(OH)_4\ CO + H_2N.R.COOH$$
$$= C52\ H46\ O10(OCH_3)(COOH)(OH)_4C{:}N.R.COOH + H_2O$$

Deze laatste verklaring acht Waksman de meest waarschijnlijke op grond van de stabiliteit en de basenuitwisselingscapaciteit van het complex. Naar Mattson(zie hoofdstuk III) aantoont, komen de mogelijkheden a en b wel degelijk in aanmerking. Op een vierde bindingsmogelijkheid wordt aan het eind van hoofdstuk IV nog gewezen.
Nieuwere onderzoekingen o.a. die aan actinomyceten huminezuren, waarover straks meer, hebben aangetoond, dat Waksmans ligno-proteïne theorie wel een zekere kern van waarheid bevat, maar in zijn algemeenheid zeker niet opgaat.
Uit het feit, dat bij hydrolyse van humus (i.c. in alkali oplosbare en met zuur te precipiteren fractie van de organische stof uit de grond) slechts een klein gedeelte van de hierin aanwezige stikstof wordt afgesplitst, concluderen Sowden en Atkinson (73), dat er van een eenvoudige band tussen een groot lignine-molecuul en een groot eiwitmolecuul geen sprake kan zijn, maar dat de beide moleculen dan wel zeer intiem met elkaar verbonden moeten zijn.
Laatsch en Schlichting(48) maakten verschillende koppelingsproducten uit gelatine en looistoffen (o.a. een lignineprepa-

raat uit roggestro, dat zo voorzichtig mogelijk was geëxtraheerd om het karakter van de lignine niet aan te tasten), in de verhouding 2:1. Het bleek hun, dat dit gelooide eiwit nog volledig was te hydrolyseren met 6 n.zoutzuur. Vermoedelijk zullen de complexen dus ook biologisch niet resistent zijn, maar hierover wordt door Laatsch en Schlichting niets vermeld. Zij merken wel op, dat deze complexen misschien wel moeilijker te hydrolyseren zijn, naarmate ze meer "verouderen". De veronderstelling, dat looien de verteerbaarheid van eiwit ongunstig beïnvloedt, ligt overigens wel voor de hand (daarop berust tenslotte de leerbereiding), alhoewel daar andere looistoffen worden gebruikt. Volgens Laatsch(45) is de looiende werking van huminezuren bij pH 5-6 het gevolg van een binding tussen phenolische OH-groepen uit huminezuren en aminogroepen uit gelatine. Reactie met carboxylgroepen kon blijkens proeven met verschillende huminezuren pas eventueel optreden bij een pH lager dan 4 d.i. beneden het isoelectrische punt van gelatine maar daar huminezuren bij die pH op zich zelf reeds onoplosbaar zijn, kon reactie met carboxylgroepen niet experimenteel worden aangetoond. Uit verschillende voedingsmedia, waarop enige maanden bepaalde schimmels en actinomyceten waren gegroeid, konden Laatsch en medewerkers (46,47) stoffen met huminezuurkarakter isoleren. Deze "huminezuren" bleken polypeptideketens te bevatten. Uit het feit, dat deze polypeptideketens ook werden aangetoond in "huminezuren", geïsoleerd uit een voedingsbodem, waarin glycerine en asparagine als enige C- resp. N-bron aanwezig waren, bleek dat deze ketens, althans in dit geval, van microbiële oorsprong waren. Deze ketens kunnen echter, zoals aan het eind van hoofdstuk IV zal worden uiteengezet, ook wel op andere wijze gebonden zijn dan via OH-, COOH- of CO-groepen van de huminezuren.
Dat de stikstof in huminezuren niet volledig ontoegankelijk is voor micro-organismen bewijst Küster(44). Hij kweekte verschillende schimmels op voedingsbodems, waarin slechts huminezuren als N-bron aanwezig waren. Voor een goede groei bleek wel een aparte C-bron, maar geen aparte N-bron nodig te zijn. Deze proeven werden zowel met natuurlijke huminezuren uitgevoerd als met synthetische, ontstaan door autoxydatie van chinon in ammoniakaal milieu (zie hierover hoofdstuk IV). Het is landbouwkundig van grote betekenis, dat we in de huminezuren een langzaam werkende stikstofbron hebben.

2 Humusstoffen uit fermentatieve hydrolyseproducten van eiwitten en koolhydraten en uit andere stofwisselingsproducten

a. Het is een sinds lang bekend verschijnsel, dat er door verhitten van suikers en polysacchariden, vooral fructose, in een waterige oplossing, die enigszins is aangezuurd, donkerbruine amorphe stoffen ontstaan. Deze stoffen noemt men dikwijls huminestoffen, waarmee een verband met de humusvorming in de grond gesuggereerd wordt.
Hierbij veronderstelt men intermediair, vorming van furfural uit pentosen en hydroxymethylfurfural uit hexosen, die dan verder condenseren tot harsachtige producten. Door Wolfrom,Schuetz en Cavalieri(86) werd de omzetting van d-glucose in 5-hydroxymethylfurfural in zure en neutrale waterige oplossing spectroscopisch vervolgd op grond waarvan zij hiervoor een reactieschema opstelden. In zuur milieu kan de reactie bij hexosen verder gaan onder vorming van laevulinezuur en mierenzuur, maar over het verdere reactiemechanisme bij de vorming van de bruine producten is niets bekend. De vraag of deze stoffen echte "huminezuren" zijn, overeenkomstig met die uit grond, wordt door Scheffer en

Welte(64) o.a. op grond van ultra-violetspectrametingen bevestigend beantwoord. Aan deze absorptiebepalingen in ultraviolet licht wordt echter een overdreven waarde gehecht. De absorptiecurven voor "Grau"-, "Braun"- en "koolhydraat"-huminezuren hebben in het geheel geen karakteristieke extremen, alleen heeft de ene een iets steiler verloop dan de andere. Het is een zeer hachelijke zaak om uit dergelijke absorptiespectra verantwoorde conclusies te trekken voor de structuur van de monomere groepen. De vorming van "koolhydraathuminezuren" in de natuur wordt door Welte(85) als volgt beredeneerd: onder perhumide omstandigheden treedt zuurstofgebrek op. De biologische activiteit wordt daardoor geremd, waardoor cellulose veel langzamer wordt afgebroken. Hierbij ontstaan door hydrolyse reactieve tussenproducten, waaruit in zuur milieu huminezuren met furanoide structuur kunnen ontstaan door condensatie.

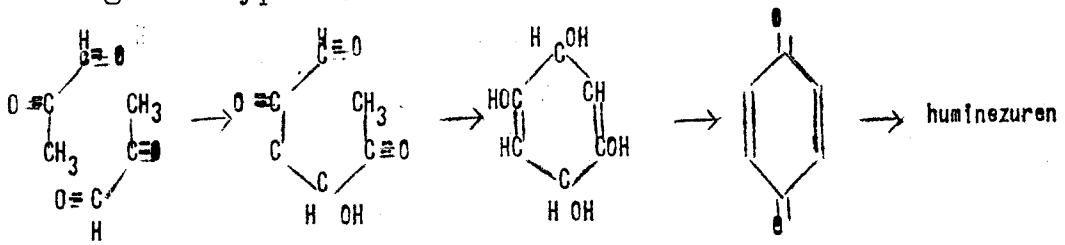
Welte stelt zich dus een condensatie langs chemische weg voor. Als men dan weet, dat voor de vorming van "glucosehuminezuren" in zuur of neutraal milieu uren lang koken nodig is (de omzetting van ketosen in bruine producten verloopt sneller), en dat volgens Waksman(82) anaerobe bacteriën, die cellulose ontleden in allerlei organische zuren, zeer talrijk zijn in moerassige grond, dan lijkt deze theorie toch wel zeer onwaarschijnlijk. Verder vermelden Scheffer en Welte nog overeenkomst met natuurlijke huminezuren wat betreft oplosbaarheid, maar ook dit is op zichzelf een onvoldoende criterium. Waar Eller(13) in 1923 reeds aantoont, dat "koolhydraathuminezuren" verschillen van de natuurlijke wat betreft hun chlorerings- en nitreringsproducten, wekt het verbazing, dat Scheffer en Welte niet meer moeite doen hun conclusies waar te maken door ook andere eigenschappen te onderzoeken.

b. Ook Hahn en Schales(39) veronderstellen, dat er in de natuur huminezuren gevormd worden uit koolhydraten, maar dan niet via furfuralderivaten, maar door polymerisatie van methylglyoxaal. Dioxyacetonphosphorzuur(I) en glycerinealdehyde phosphorzuur(II) zijn nl. aangetoond als primaire splitsingsproducten bij suikerafbraak in vivo en hieruit kan in een secundair reactie methylglyoxaal onstaan.

I $CH_2OH \cdot CO \cdot CH_2OPO_3H_2$

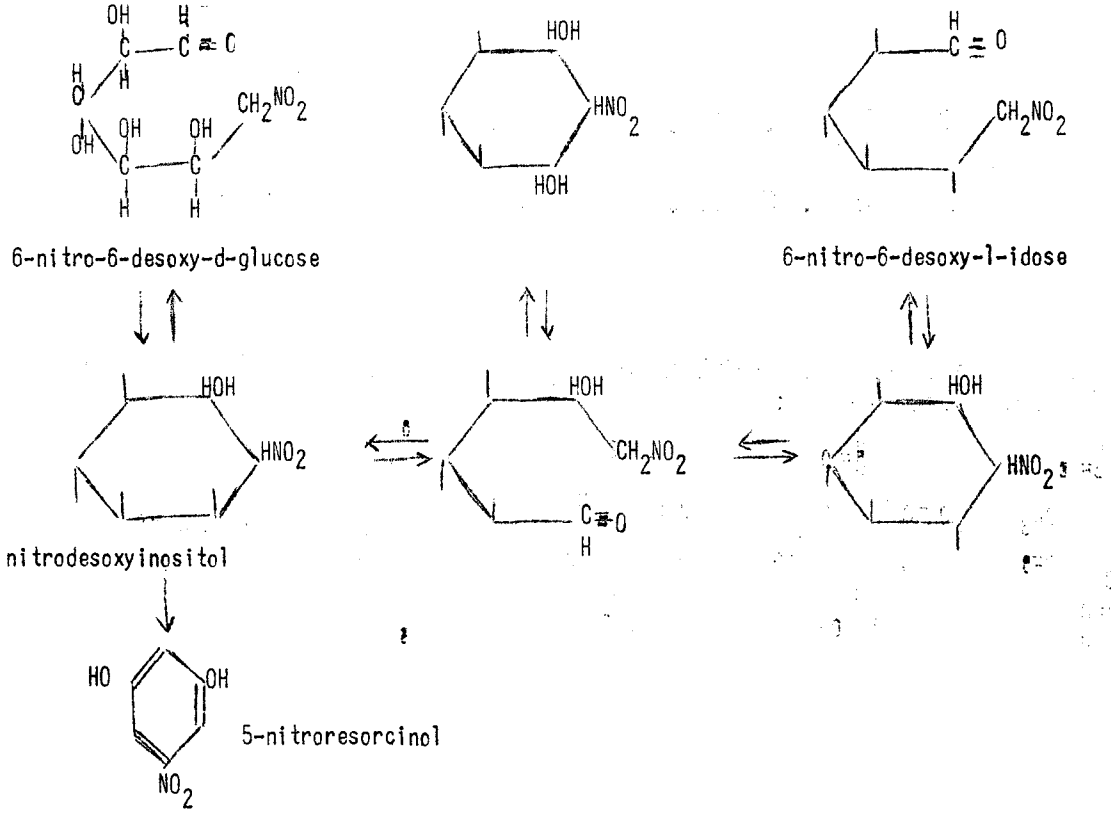
II $CHO \cdot CHOH \cdot CH_2OPO_3H_2$

Voor het verdere reactieverloop geven Hahn en Schales de volgende hypothese:



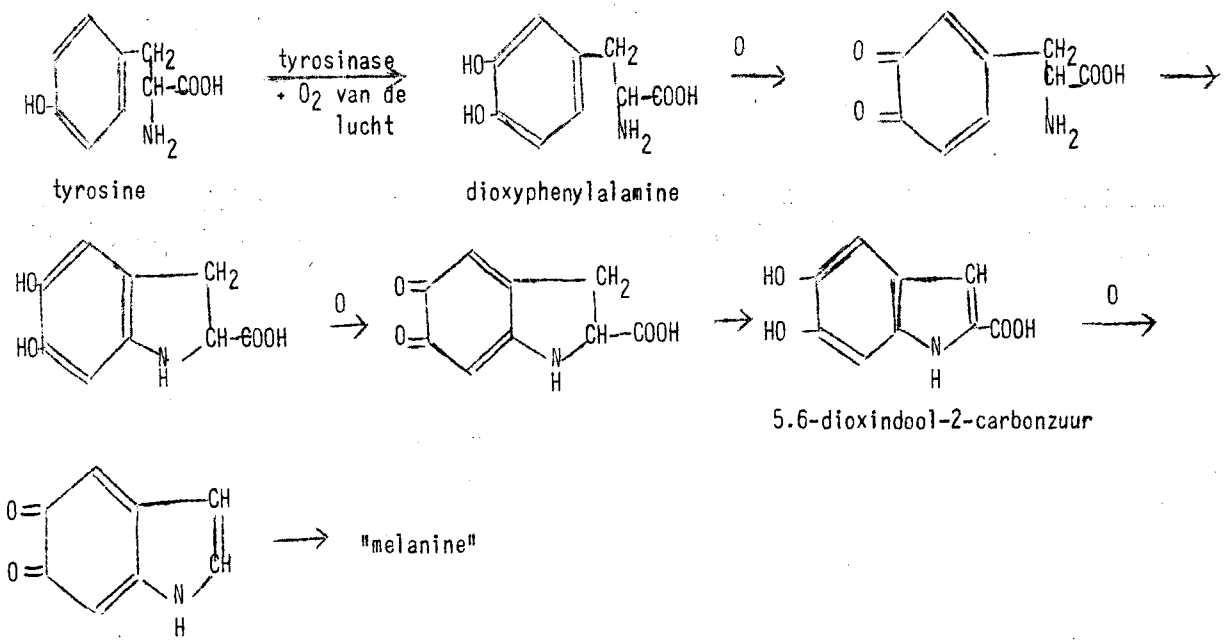
Dat een dergelijke omzetting in de natuur optreedt is niet onmogelijk, al heeft men het nog niet in vitro kunnen aantonen bij methylglyoxaal. Wel heeft men in vitro volgens hetzelfde schema dimethylchinon verkregen uit diacetyl onder invloed van alkali (Karrer 3e druk pg 565). Hahn en Schales verkregen een donkerbruine stof door methylglyoxaal te verwarmen in een 2 n. zure oplossing. De door hen vermelde eigenschappen van het verkregen product komen niet overeen met die van natuurlijke huminezuren en de eigenschappen, waaruit volgens de onderzoekers de overeenkomst blijkt, vermelden zij niet. Hier kan echter opgemerkt worden, dat het door hen verkregen product niet via chinon als tussenstap kan zijn ontstaan, aangezien chinon in zuur milieu niet polymeriseert. Dat optimale vorming van deze producten optreedt bij pH 5.9:(zoals Hahn en Schales opgeven) wordt trouwens door Enders (14) ontkent. Volgens Enders is vorming van bruine producten pas merkbaar na het neutraalpunt en maximaal bij pH 11-12. Bij nog hogere pH ontstaat melkzuur(Cannizzaro). Deze theorie van Hahn en Schales behoort dus niet tot de onmogelijkheden, gezien ook wat in hoofdstuk IV wordt vermeld.

c. Een andere hypothese over de vorming van huminezuren uit koolhydraten in de natuur is die, waarbij men zich cyclisering van hexosen voorstelt, waarbij inositol ontstaat, een stof die zeer verspreid in het plantenrijk voorkomt. Door waterafsplitsing uit inositol zouden dan weer chinonderivaten kunnen ontstaan, die in alkalisch milieu kunnen polymeriseren tot huminezuren.
Ook deze cyclisering is in vitro nog niet gelukt, maar wel met een nitroderivaat.
Grossheintz en Fischer(38) verkregen uit 6-nitro-6-desoxy-d-glucose in waterige oplossing, onder invloed van zeer kleine hoeveelheden alkali een mengsel van stereoisomeren, dat geen optische activiteit meer vertoonde. Na acetylering met azijnzuuranhydride werd hieruit het penta-acetaat van nitrodesoxyinositol verkregen, dat bij oplossen in warme pyridine onmiddellijk en quantitatief omgezet werd in diacetyl-5 nitroresorcinol. Grossheintz en Fischer geven, mede op grond van verdere experimentele bijzonderheden het volgende reactieschema:

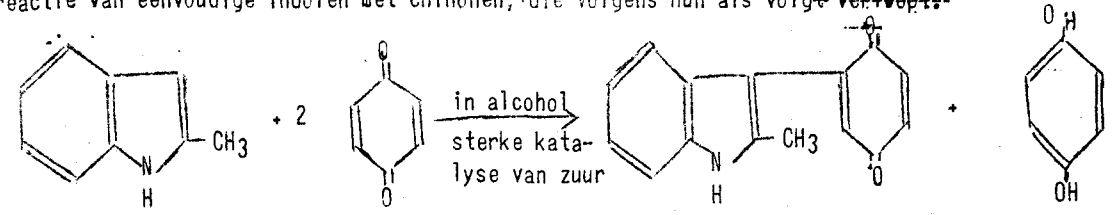


Het feit, dat deze ringsluiting gemakkelijk en onder milde omstandigheden plaats vindt, doet vermoeden, dat door een enzymatisch proces hetzelfde gebeurt in de natuur met de hexosen zelf.
Flaig(25) merkt op, dat men zich zo niet alleen vorming van phloroglucinol, maar ook van 1, 2, 4-trihydroxybenzeen kan voorstellen, waaruit door oxydatie hydroxychinon kan ontstaan, wat als tussenproduct is aangetoond bij de synthese van huminezuren uit hydrochinon (zie hoofdstuk IV).

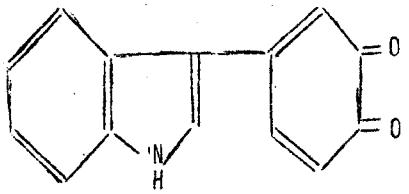
d. Bij de stofwisselingsproducten van micro-organismen, die op eiwitten zijn gegroeid, vindt men dikwijls bruine tot zwarte macromoleculaire kleurstoffen, de z.g. melaninen, waarin 7-13 % N.
Door Raper(62) werd het reactieverloop bij inwerking van het enzym tyrosinase op tyrosine opgehelderd:



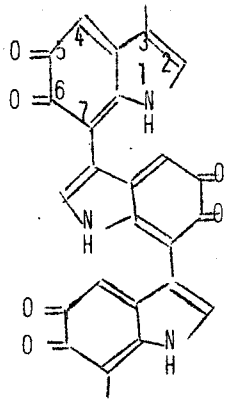
Om de structuur van het melaninepolymeer op te helderen bestudeerden Du'Lock en Harley-Mason (10) de reactie van eenvoudige indolen met chinonen, die volgens hun als volgt verloopt:



Zonder de methylgroep was de opbrengst gering en ontstonden er bijproducten.
2-methylindool gaf géén reactie met 2,5- of 2,6-dimethylchinon
orthochinonen bleken nog reactiever te zijn dan parachinonen. Hierbij ontstonden producten als:

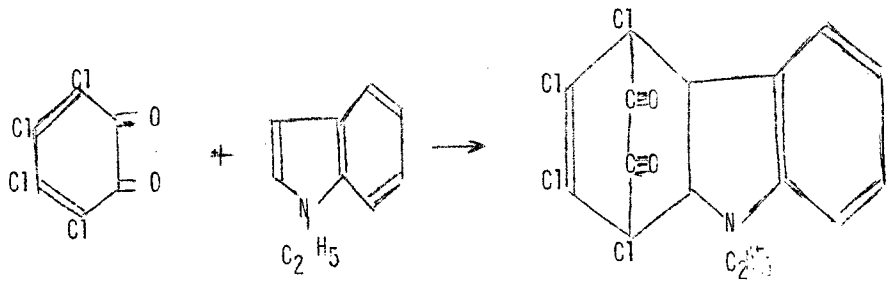


Met 4.5-dimethylorthochinon trad geen reactie op.
Bij de polymerisatie van indoolchinon zal dus, volgens deze onderzoekers, waarschijnlijk de 3-positie van het ene molecuul en de 7-positie van het andere molecuul betrokken zijn. Reactie op positie 4 is, theoretisch ook mogelijk, maar dan zou het ontstane product geen coplanaire structuur kunnen hebben, zoals melanine wel heeft. Als mogelijke formule voor het melanine-polymeer werd daarom door Bu'Lock en Harley-Mason voorgesteld:

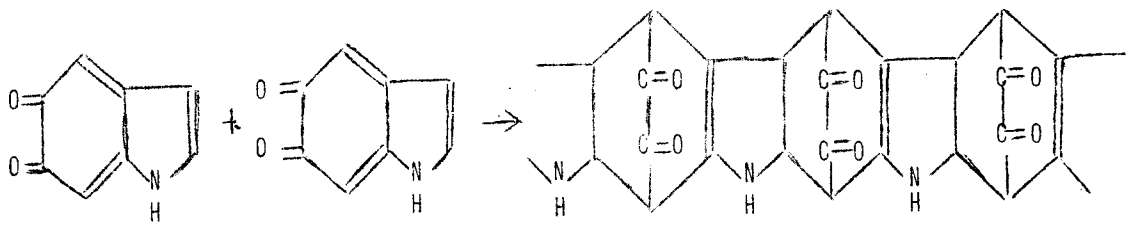


Zo is bovendien een goede conjugatie van dubbele bindingen verkregen, wat de intense lichtabsorptie over een groot golflengtegebied verklaart. Om de extreme onoplosbaarheid van melaninen te verklaren, veronderstellen zij enkele "cross-linkings" tussen een vrije 2-plaats en een 4- of 7-plaats van een ander molecuul.

Horner(40) ging de reactie tussen O.tetrachloorchinon en N-aethylindool na, waarvan hij het volgende schema geeft(dieënsynthese):



Op grond hiervan veronderstelt Flaig(25) voor de melanine-vorming uit tyrosine het volgende reactieschema:



Hieruit is niet zo goed de diepe kleur verklaarbaar, maar deze formule geeft ook zonder cross-linkings wel een verklaring voor de extreme onoplosbaarheid van melaninen. Uit het tot dusver verrichte onderzoek is nog geen definitieve conclusie omtrent de structuur van melaninen te trekken.

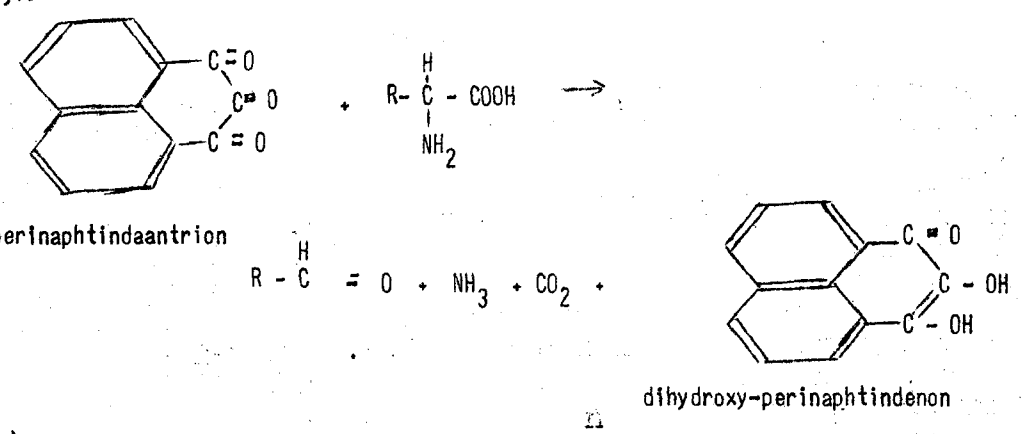
De melaninevorming is niet tot tyrosine beperkt. Ook bij andere aminozuren als tryptophaan heeft men dergelijke producten verkregen.
Laatsch(45) toonde aan, dat huminezuren niet identiek zijn met zuivere melaninen. De oplosbaarheid van beide verbindingen bleek niet gelijk te zijn, terwijl de melaninen bovendien ontkleurd werden bij behandeling met een 3%-ige waterstofperoxyde oplossing, wat bij huminezuren niet het geval is.
Het lijkt ook weinig plausibel, dat er in de grond een zuivere melanine-vorming zal optreden, aangezien er bij de afbraak van koolhydraten ook allerlei reactieve tussenproducten ontstaan, die op een of andere manier met de eiwitstofwisselingsproducten kunnen reageren, zodat vorming van een soort mengpolymeer dan waarschijnlijker lijkt. Ook lignine heeft na ontmethylering en oxydatie reactieve chinoide structuur-elementen, waardoor het op de een of andere manier in de reactie kan worden betrokken.

e. von Plotho(59) onderzocht uit bosgrond geïsoleerde schimmels, actinomyceten en bacteriën op hun vermogen stoffen te vormen met de karakteristieke kentekenen van huminezuren, door ze te kweken op verschillende voedingsbodems. Door Laatsch(45) werd reeds aangetoond, dat de aard van de koolstofbron in het voedingsmedium van invloed is op de oplosbaarheid van de, uit dit medium geïsoleerde actinomycetenhuminezuren in acetylbromide.
Uit het onderzoek van von Plotho bleek bovendien de aard van de stikstofbron zeer belangrijk te zijn. Actinomyceten gaven de hoogste opbrengst aan "huminezuren" bij gebruik van aminozuren als N-bron, terwijl aspergilli en fusaria hieruit geen huminezuren vormden. Aspergilli gaven het beste resultaat met nitraten en penicillia met ammoniumzouten als N-bron. Als bij de actinomycetencultures het aminozuur dienst moest doen als C- en als N-bron (dus geen aparte C-bron toegevoegd), dan hield de groei na enige dagen op. In het substraat waren dan hydroxybenzeenderivaten aan te tonen (roodkleuring met $FeCl_3$ in alkalisch milieu, overgaand in groen bij aanzuren; met gediazoteerd sulfanilzuur werden bruinrode azokleurstoffen gevormd). Bij toevoeging van een aparte C-bron als glycerine waren na enige dagen groei geen phenolen meer aan te tonen.
Werd als N-bron glutaminezuur of tryptophaan gebruikt, dan was de reactie op indoölverbindingen ook positief(roodkleuring van de amylalcohollaag bij toevoeging van de zure amylalcoholische oplossing van p.dimethylamino-benzaldehyde aan het substraat).
Voor een goede groei en optimale huminezuurvorming bleek een C/N-verhouding van ongeveer 30 : 1 in het oorspronkelijke voedingsmedium het beste terwijl de aanwezigheid van luchtzuurstof noodzakelijk was. In een vervolg op dit onderzoek vermeldt von Plotho(60) de isolatie van verschillende chinonderivaten uit de substraten en tevens uit grond. Deze chinonen polymeriseerden in alkalisch milieu onder invloed van zuurstof uit de lucht tot stoffen met het karakter van huminezuren. Mede op grond van absorptiespectra in het ultraviolette gebied(!!) komen Scheffer, von Plotho en Welte(65) tot de volgende uitspraak: "Die Bildung natürlicher Huminsäuren vom Grauhuminsäuretyp ist eine im Boden selbständig ablaufende mikrobiell bedingte Synthese. Sie nimmt ihren Ausgang von chinoiden Stoffwechselprodukten der mikroorganismenwelt, aus denen bei schwach alkalischer Reaktion durch Autoxydation mit nachfolgenden Kondensations -bzw. Polymerisationsprozessen das Makromolekül der Grauhuminsäure aufgebaut wird". Ook Laatsch c.s.(47) veronderstellen, mede op grond van

onderzoekingen van Schlichting(66) aan heidehumus, dat in de grond naast elkaar voorkomen N-arme "ligninehuminezuren" en N-rijke, uit het mycelium van schimmels en actinomyceten ontstane huminezuren. Hiermee in tegenspraak is de conclusie van Springer en Wagner (79), gebaseerd op colorimetrisch onderzoek, oplosbaarheid in acetylbromide, gedrag bij hydrolyse met sterk zuur en bij oxydatie in alkalisch milieu van verschillende huminezuren(merkwaardig genoeg zijn in dit onderzoek geen natuurlijke "Grau"-huminezuren betrokken). Volgens hen worden schimmelhuminezuren nl. betrekkelijk snel afgebroken in de grond en ontstaan "echte" huminezuren alleen uit lignine, waarmee in wisselende hoeveelheden aminozuren of eiwitresten en eventueel chinoide stoffen gekoppeld zijn.
Het hangt er maar van af, wat men "echte" huminezuren noemt. Zoals reeds opgemerkt, toonde Küster(44) aan, dat ook de stikstof in z.g. "ligninehuminezuren" niet ontoegankelijk is voor schimmels. Bovendien isoleert Springer zijn "echte" ligninehuminezuren o.a. uit sphagnumveen, terwijl sphagnum volgens een recente uitspraak van Freudenberg in tegenstelling tot de algemeen gangbare mening geen lignine bevat.
Ook door Flaig en medewerkers(26a), waarvan vooral Küster(43) genoemd moet worden, werd de vorming van huminezuren door microorganismen bestudeerd en werden chinoide tussenproducten aangetoond, die in alkalisch milieu onder opname van zuurstof uit de lucht polymeriseren tot huminezuurachtige verbindingen, eventueel onder fixatie van aminoverbindingen of NH_3.
De structuur van vele van deze phenolische of chinoide stofwisselingsproducten is opgehelderd(zie Raistrick c.s.(61) en Flaig en Otto (27)). Hiertoe behoren ook verschillende antibiotica.
In verband met de door verschillende onderzoekers beweerde groeistofwerking van humus, hebben Flaig en Otto een onderzoek ingesteld naar de groeistofwerking van verschillende chinonen, waaruit huminezuren kunnen zijn gevormd. Zij komen tot de conclusie, dat chinoide systemen inderdaad de wortelgroei beïnvloeden en dat humus het dus ook wel zal doen.

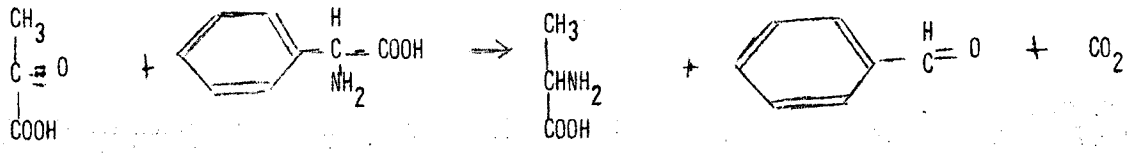
f. Tenslotte moet hier nog de theorie van Enders(14-21) besproken worden. Volgens Enders ontstaan de huminezuren, door een niet-enzymatische reactie van methylglyoxaal met aminozuren. Enders noemt dit melanoïdinen.
Vorming van methylglyoxaal:(zie dit hoofdstuk onder 2b) zou optreden als de organismen in ongunstige levensomstandigheden komen te verkeren met als gevolg autolyse of plasmolyse van de organismenlichamen. Deze ongunstige levensomstandigheden ontstaan door periodieke schommelingen in de temperatuur, het vochtgehalte, de pH, de samenstelling van de voedingsoplossing (groeistofgebrek), de redoxpotentiaal, door osmotische effecten, heterolyse e.d. Hierdoor zou dus de humusvorming begunstigd worden. Als resultaten van onderzoek aan de grond deelt Enders alleen maar cijfers over het gehalte aan methylglyoxaal mee. Enders en Sigurdsson(15) bepaalden het gehalte aan methylglyoxaal in bosgrond, door die te gaan stoomdestilleren en het destillaat met 2.4-dinitrophenylhydrazine te behandelen. Hierbij werd uit 1500 g grond een hoeveelheid osazon verkregen overeenkomend met 10 mg methylglyoxaal. Zij schatten echter het werkelijke gehalte op ongeveer 20 mg per 1500 g grond. Verder merkten zij op, dat de in de grond aanwezige hoeveelheid methylglyoxaal omgekeerd evenredig is met het aantal levende micro-

organismen.
(17) Enders entte een voedingsoplossing, waarin cellulose als koolstofbron aanwezig was met micro-organismen die deze cellulose konden afbreken en huminezuren konden vormen. Bij het aanbrengen van ongunstige levensomstandigheden kon Enders methylglyoxaal aantonen, terwijl huminezuurvorming te verhinderen was door calciumsulfiet, semicarbazide, dimedon(1.1- dimethylcyclohexadion -3.5) of 2.4-dinitrophenylhydrazine(waardoor methylglyoxaal wordt vastgelegd) toe te voegen. Als Enders heeft aangetoond, dat deze stoffen alleen methylglyoxaal vastlegden(wat niet uitdrukkelijk wordt meegedeeld), is dit een interessante bevestiging van zijn theorie, dat methylglyoxaal als tussenproduct kan optreden bij de omzetting van koolhydraten in huminezuren. Er moet anders ook rekening worden gehouden met de mogelijkheid, dat de celluloseafbraak bij een ander stadium (bv.hexosen) wordt stilgelegd. De proeven van Enders om in vitro huminezuren te synthetiseren uit methylglyoxaal en aminozuren hebben geen bevestiging opgeleverd van zijn theorie. Enders bereidde zijn "melanoïdinen" o.a. door methylglyoxaal te verhitten met verschillende aminozuren in waterige oplossing. Reactie bleek op te treden in het "physiologische pH-gebied" van pH 4-7 (tussentijdse vorming van chinon lijkt dus onwaarschijnlijk; zie 2b). De reactiesnelheid nam toe met stijgende pH en was verder afhankelijk van concentratie en temperatuur. De structuur van het aminozuur bleek niet van invloed te zijn op de reactiesnelheid, mits de aminogroep maar niet gesubstitueerd was. Bij proeven met methylglyoxaal en glycocoll bleek de grootste reactiesnelheid en de hoogste opbrengst te worden verkregen bij een oplossing, waarin 10 % methylglyoxaal en 20 % glycocoll. Enders geeft geen enkele reactievergelijking, maar hierover wordt opheldering gegeven door Schönberg,Moubasher en Mostafa (68). Zij delen mee, dat de meeste verbindingen waarin de groepering . CO . $(CH : CH)_n$. CO . (waarin n=0,1,2...) voorkomt in staat zijn alpha-aminozuren af te breken tot aldehyden met 1 C-atoom minder.
Dit wordt door hen de "Strecker-reactie" genoemd.
De α-NH_2 groep kan hierbij
1) worden geëlimineerd in de vorm van NH_3
bijv.



2) gebonden worden aan de carbonylverbinding, die de afbraak bewerkstelligt, waarbij een aminoverbinding van overeenkomstige structuur ontstaat (transaminering).

bijv.

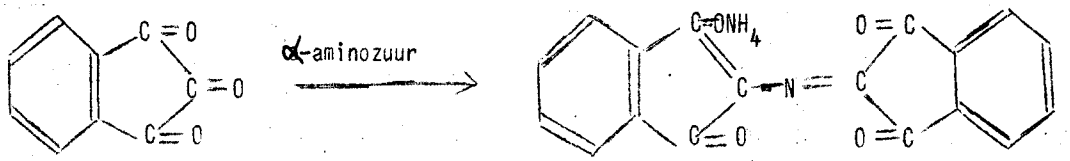


pyrodruivenzuur alanine

phenylglycine benzaldehyde

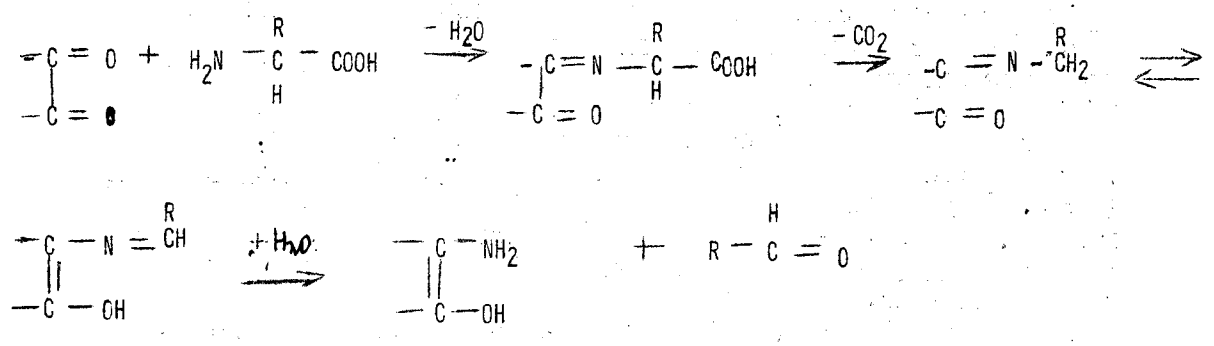
3) reageren met de carbonylverbinding, waarbij N-verbindingen van ingewikkelde structuur ontstaan.

bijv.



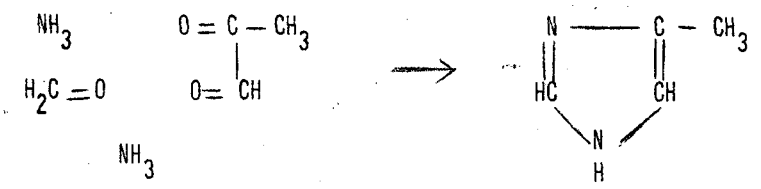
ninhydrine

De reacties werden door Schönberg c.s.uitgevoerd, door het aminozuur 15 min. te laten reageren met de in kokend water opgeloste of gesuspendeerde carbonylverbinding in een CO_2-atmosfeer. Als algemeen reactieschema geven zij het volgende:



Bij de carbonylverbindingen, die deze afbraak kunnen bewerkstelligen worden o.a. methylglyoxaal en ortho- en parachinon vermeld.
Wat er uit het methylglyoxaal zelf ontstaat en waarom een CO_2-atmosfeer vereist is, wordt door Schönberg c.s. niet aangegeven. Gezien de resultaten van Enders zal onder invloed van zuurstof van de lucht het eindproduct of een tussenproduct van deze omzetting polymeriseren. De eerste stap zal echter ook hier wel zijn de vorming van een schiffse base i.c. een α-iminozuur die, zoals bekend, gemakkelijk CO_2 afstaan. Een duidelijke aanwijzing hiervoor is, dat volgens Enders geen reactie met N-gesubstituueerde aminozuren optreedt.
Het heeft weinig zin, zich zonder nader experimenteel onderzoek te verdiepen in het mechanisme van deze polymerisatiereactie. Het lijkt wel zeker, dat eventueel gevormde ringsystemen

heterocyclisch zullen zijn.
In dit verband kan nog de reactie van Windaus(Karrer 3e dr.pg 774) vermeld worden. Windaus verkreeg nl. door verhitting van glucose in een ammoniakale zinkhydroxydeoplossing 4-methyl-imidazol. Hierbij denkt men zich tussentijds formaldehyde en methylglyoxaal gevormd die als volgt met NH_3 reageren:



4-methyl-imidazol

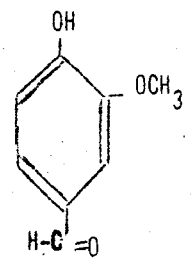
De aanwezigheid van chinoïde structuurelementen, zoals in huminezuren (zie hoofdstuk IV) lijkt niet waarschijnlijk bij deze melanoïdinen.
Laatsch(45) toonde trouwens reeds aan, dat de melanoïdinen van Enders niet voldoen aan de bij de karakterisering van huminezuren vermelde eigenschappen 3, 5, 6 en 7(zie hoofdstuk I).
Er kan in dit verband dan ook weinig waarde worden gehecht aan de door Schuffelen en Bolt(70) vermelde overeenkomst tussen deze melanoïdinen en huminezuren, wat betreft hun C/N-verhouding, uitwisselingscapaciteit en titratiecurven.

Enders bereidde ook"melanoïdinen" door van glucose zelf uit te gaan. Op grond van het feit, dat de reactiesnelheid in dit geval veel kleiner is dan bij methylglyoxaal en dat er bij verhitten van glucose in alkalisch, zuur of neutraal milieu geringe hoeveelheden methylglyoxaal worden gevormd, veronderstelt Enders bij deze "melanoidinevorming" uit suikers ook methylglyoxaal als tussenproduct.
Dit is echter volgens een onderzoek van Wolfrom,Schuetz en Cavalieri(86) onjuist. Door deze onderzoekers werd nl. aangetoond, dat bij de vorming van bruine producten bij verhitting van pentosen, resp. hexosen en glycine in waterige oplossing furfural resp. hydroxymethyl-furfural als tussenproduct optreden. Inderdaad bleken er ook bepaalde verschillen te bestaan tussen melanoidinen uit methylglyoxaal bereid en die uit hexosen.

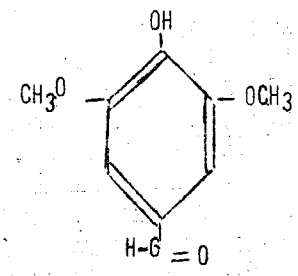
III De betekenis van lignine voor de humusvorming

"Lignine" is evenals "huminezuren" meer een collectieve term voor de groep macromoleculaire, amorphe verbindingen, die chemisch zeer nauw verwant zijn. Ook bij lignine levert de isolering uit het oorspronkelijke plantenmateriaal, waar het in combinatie met cellulose, hemicellulosen, chemisch enigszins verwante tanninen, phlobaphenen etc. voorkomt, bijna onoverkomelijke moeilijkheden op. Totaal inerte oplosmiddelen lossen lignine niet op. Vrijwel iedere extractie is te beschouwen als een reactie van lignine, waarbij oplosbare producten ontstaan. De eigenschappen van het geïsoleerde product zijn dus ook afhankelijk van de methode van isolering. Er is in natuurlijke toestand reeds een grote verscheidenheid in soorten lignine, evenals dat het geval is bij polysacchariden, terwijl door het grote aantal verschillende isolatiemethoden, die ieder hun eigen

stempel drukken op het geïsoleerde product, de situatie helemaal ingewikkeld wordt. Het valt dan ook niet te verwonderen, dat Brauns(5) verzucht: "The lignin literature is full of contradictions, not only in the work of different chemists, but often in the work of the same investigator.".
Hier zal geen opsomming worden gegeven van de vele structuurformules, die in de loop der tijd zijn opgesteld voor lignine, aangezien ze alle hypothetisch zijn en de juistheid van nog geen enkele onomstotelijk bewezen is. Mede doordat er bij een goede verwerking van lignine, dat in enorme hoeveelheden als afvalstof bij de chemische hout- en stroverwerking ter besshikking komt, grote industriële belangen gemoeid zijn, wordt aan de opheldering van de structuur intensief gewerkt. Waar lignine een van de belangrijkste uitgangsstoffen is voor de humusvorming,(de overblijfselen van de oogst in de grond bestaan voor ongeveer 20 % uit lignine) is het humusonderzoek ook zeer gebaat bij de opheldering van de structuur van lignine. Een moeilijkheid is echter, dat het lignineonderzoek voornamelijk plaats vindt aan houtlignine en niet aan materiaal waaruit in de cultuurgronden humus gevormd wordt. Volgens Mattson (51) is lignine uit hout of stro veel minder reactief ten opzichte van autoxydatie in alkalisch milieu dan lignine uit assimilatieorganen als boombladeren. De lignine uit bladeren zou een hoger basenbindend vermogen hebben dan die uit hout of stro. De lignine uit bladeren gedraagt zich volgens Mattson meer als phenolische zuren, terwijl die uit hout of stro meer overeenkomt met de lager geoxydeerde phenolen. Op grond hiervan onderscheidt Mattson "structureel" lignine (verleent stevigheid aan het materiaal) en "functioneel" lignine(dat een rol zou spelen bij de regeling van de base-zuurtoestand en bij de osmotische en dergelijke verschijnselen.) Al is het dan nog niet mogelijk een structuurformule voor "lignine" op te stellen, men kent toch al verschillende kwalificaties, waaraan deze formule moet voldoen. Brauns(5) geeft er de volgende opsomming van: Zuivere lignine bestaat alleen uit de elementen C,H en O. Uit het feit, dat bij hydrogenering van lignine tot 50 % cyclohexylpropaanderivaten worden verkregen, blijkt dat lignine vóór een groot deel is opgebouwd uit phenylpropaanderivaten, aangezien vaststaat dat de cyclohexylring ontstaat door hydrogenering van de benzeenring. Dit blijkt uit het waterstofverbruik bij de hydrogenering; uit de elementairanalyse, die op sterk onverzadigd karakter wijst nl. een hoog C-gehalte(tussen 62 en 68 % afhankelijk van herkomst en methode van isolering), een relatief laag H-gehalte (ongeveer 5-6%), gecombineerd met het feit, dat de meeste zuurstofatomen in lignine als OH en OCH_3 groepen voorkomen (15-23 % OCH_3) en in de derde plaats uit het feit, dat bij milde alkalische oxydatie tot 25 % vanilline werd verkregen.

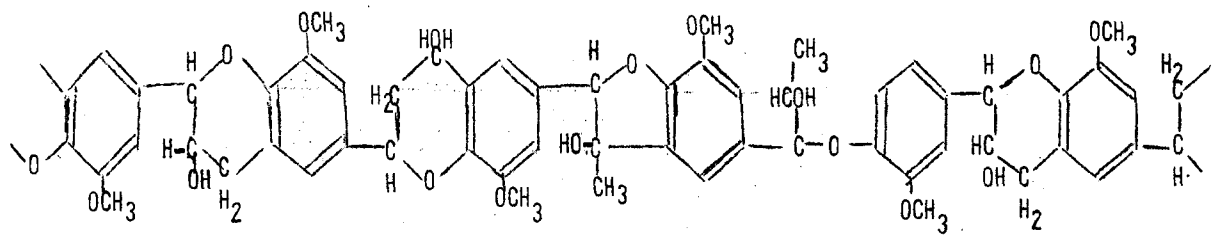


vanilline

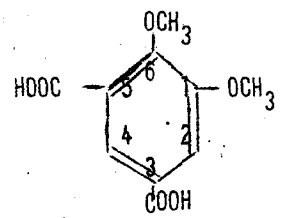


syringaldehyde

Ook werd dikwijls (in geringere hoeveelheden) syringaldehyde verkregen uit lignine.
De vorming van vanilline uit lignine bewijst verder, dat tenminste in een deel van de lignine, de phenylring een OCH_3-groep meta en een OH of OC_6H_5 groep para ten opzichte van de zijketen bevat. Er kan vrijwel geen twijfel meer aan bestaan, dat lignine een hoogpolymeer is, gevormd voor tenminste 75 %, indien niet geheel, uit phenylpropaan-bouwstenen. Hoe deze bouwstenen met elkaar zijn verbonden en of zij volgens één patroon dan wel op verschillende manieren zijn verbonden is nog niet definitief vastgesteld. Het lijkt niet onwaarschijnlijk, dat het aantal verschillende bouwstenen helemaal niet zo groot is, maar dat de soort lignine voornamelijk bepaald wordt door de rangschikking en de koppeling van deze bouwstenen.
Na 20 jaar studie van physische en chemische eigenschappen van lignine en op grond van vergelijkend onderzoek aan modelstoffen, beschouwt Freudenberg nu het grootste deel van sparrenlignine, als een hoogpolymeer product van bifunctioneel gecombineerde bouwstenen van guajacylpropaanderivaten met een zijketen waarin gemiddeld 3 zuurstofaequivalenten. De bouwstenen kunnen met elkaar reageren door afsplitsen van water, waarbij een aether gevormd wordt, gevolgd door partiële nucleaire condensatie onder vorming van benzopyraan- en benzofuraanringen als volgt:



Dit is slechts een schema. Het aantal typen en de volgorde van de bouwstenen en de aard van de condensatie is willekeurig gekozen, alleen zijn de verschillende mogelijkheden aangegeven, die volgens Freudenberg waarschijnlijk voorkomen. De isolering van isohemipinezuur bij milde behandeling met alkali, gevolgd door oxydatie, wijst er op dat, tenminste in een deel van het ligninemolecuul het C-atoom 5 van de benzeenring verbonden is met de zijketen van een andere bouwsteen door een C-C-binding.



isohemipinezuur

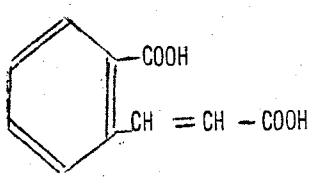
Aan de andere kant is in een ander deel van het ligninemolecuul de 5-plaats vrij, aangezien er 5-joodvanilline uit gejodeerd lignine kan worden geïsoleerd. De 5-plaats is ongetwijfeld vrij in een eindgroep en misschien is hij ook vrij in een centrale bouwsteen, die met de volgende slechts door een phenol-aetherbinding is verbonden.
Verder is in lignine ongeveer 2 % phenolische OH aanwezig.
Bij reactie van lignine met alcoholen in aanwezigheid van een

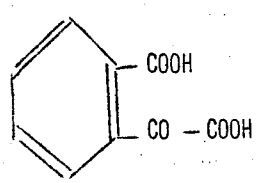
spoor HCl, ontstaan er lignineacetalen, die door minerale zuren gemakkelijk weer worden gesplitst. Dit bewijst de aanwezigheid van carbonylgroepen of, wat minder waarschijnlijk is, van ketolgroepen.
Dit zijn enkele van de voornaamste feiten, beschikbaar voor opstelling van een structuurformule.
Over de toestand waarin lignine in het plantenmateriaal voorkomt, kan nog het volgende opgemerkt worden.
In bepaalde houtsoorten is een klein gedeelte van de lignine vrij in blijkbaar lagerpolymere toestand, want door extractie met alcohol of dioxaan is een klein gedeelte van de lignine te iseleren. Het grootste deel is echter onoplosbaar in koude indifferente oplosmiddelen. Dit kan veroorzaakt worden door een hogere condensatie- of polymerisatiegraad, maar het kan ook het gevolg zijn van een chemische binding aan andere stoffen als koolhydraten.
Er zijn verschillende argumenten pro en contra chemische binding, maar een overtuigend bewijs is niet geleverd. In ieder geval is niet alle lignine gebonden gezien de gedeeltelijke oplosbaarheid in alcohol of dioxaan en de rest kan ook niet volledig gebonden zijn aan koolhydraten op grond van de heterogene verdeling van lignine en koolhydraten in de celwand.
Soms komen lignine en koolhydraten zelfs in morphologisch verschillende lagen voor. Er kan dan uiteraard slechts sprake zijn van binding in de overgangslagen. Volgens Norman(54) zijn er sterke aanwijzingen voor een zekere binding tussen lignine en hemicellulosen en is binding aan cellulose practisch van geen belang.

Wat gebeurt er nu met de lignine in de grond?

Dat er verband bestaat tussen lignine en humus staat wel vast; verschillende onderzoekingen hebben dit aangetoond. Hiervan zullen voornamelijk slechts die onderzoekingen worden besproken, waaruit een inzicht werd verkregen in de processen, die zich bij de omzetting van lignine in humus afspelen.
Er is vrij veel onderzoek verricht over de microbiologische ontleding van lignine, maar het is lang niet altijd zeker, dat de hiervoor gebruikte lignineprapeparaten koolhydraatvrij waren. Bovendien is als maatstaf voor de ontleding dikwijls genomen de CO_2-ontwikkeling en werd niet nagegaan, welke afbraakproducten er uit de lignine ontstonden. De ontleding van lignine bleek, zoals te verwachten, afhankelijk te zijn van de soort lignine, die men voor het onderzoek gebruikte.
In het algemeen bleek lignine vrij moeilijk of nietaantastbaar te zijn voor de micro-organismen, met het gevolg dat het zich ophoopte in de grond, zij het in min of meer veranderde toestand. Tot de organismen die lignine kunnen ontleden, behoren vooral de basidiomyceten, die veel in rottend hout voorkomen, maar betrekkelijk weinig in de grond (uitgezonderd bosgrond).
Volgens Küster(44) e.a. kan lignine bijdragen tot de humusvorming, doordat het als zodanig wordt omgezet of doordat uit chinoide stofwisselingsproducten van organismen, die lignine ontleden, door polymerisatie en ammoniakfixatie humusstoffen ontstaan (zie hiervoor hoofdstuk IV). In dit verband kan opgemerkt worden, dat volgens Küster slechts die schimmels meewerken aan humusvorming die polyphenoloxydasen bezitten.
Dat lignine, in het algemeen gesproken, biologisch vrij resistent is, betekent zeker niet, dat het als zodanig wordt opgehoopt.

Integendeel, het lignine wat achterblijft na afbraak van de overige plantenstoffen is zeer reactief en ondergaat allerlei omzettingen. Forsyth(29) ging huminezuren van verschillende ouderdom acetyleren, methyleren, veresteren enz. en komt op grond van de verkregen resultaten tot de conclusie, dat de humificatie is een combinatie van hydrolyse van OCH_3-groepen in het oorspronkelijke lignine en oxydatie van OH-groepen tot carbonyl-, chinon- en carboxylgroepen. Des te verder het materiaal gehumificeerd was, des te minder OCH_3-groepen waren er aanwezig, terwijl het aantal OH-groepen niet steeg evenredig met de afnemende hoeveelheid OCH_3-groepen. Volgens Gottlieb en Hendricks(37) vindt tijdens de omzetting van lignine in de grond tevens een condensatie van het ligninemolecuul plaats, waarbij polycyclische ringstructuren ontstaan, die meer bestendig zijn ten opzichte van hydrogenolyse dan het oorspronkelijke lignine. Door verschillende onderzoekers wordt lignine beschouwd als de uitgangsstof voor koolvorming. Daarbij wordt het bestaan van de volgende reeks verondersteld: lignine ⟶ veen ⟶ bruinkool ⟶ steenkool ⟶ anthraciet ⟶ graphiet. Een uitvoerig en goed opgezet onderzoek naar de omzetting van lignine in de grond is gedaan door Mattson en Koutler-Andersson (49-53) waaraan hier het volgende ontleend is: Plantenresten en humus zijn in alkalisch milieu onderhevig aan snelle autoxydatie bij toetreding van lucht. Het gehalte aan eenvoudige en colloidale zuren en het vermogen om ammoniak te binden in nietuitwisselbare vorm, bleek daarbij sterk toe te nemen, terwijl hiertussen een verband bleek te bestaan, dat ook bij lignine gevonden werd. De vorming van carboxylgroepen verklaart Mattson uit autoxydatie van de onverzadigde aldehydezijketens van de phenylpropaaneenheden. Voorzover de zijketen in lignine in een ringsysteem aanwezig zou zijn, is volgens Mattson vergelijking mogelijk met de oxydatieveringverbreking bij gecondenseerde phenolen als α-naphtol, waaruit bij voorzichtige oxydatie O. kaneel-benzeencarbonzuur(I) ontstaat, of β-naphtol, waaruit O. carboxylphenyl-glyoxylzuur(II) ontstaat.

I 

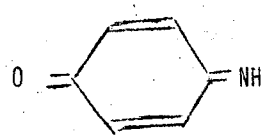
II 

Bij autoxydatie van lignine en humus bleek het gehalte aan zwak zure groepen (waarschijnlijk phenolische OH-groepen) af te nemen en het gehalte aan sterker zure groepen (Mattson veronderstelt: -COOH) toe te nemen. Dit zou te verklaren zijn, als de oxydatieve aantasting van lignine van dezelfde aard is als de naphtol oxydatie. Tevens zou dan de vorming van eenvoudige zuren als benzeenpolycarbonzuren, azijnzuur, mierenzuur en CO_2 verklaard zijn, maar hiermee is nog geen verklaring gegeven over het verband, wat er bestaat met NH_3-fixatie. Het verdwijnen van de zwak zure phenolische hydroxylgroepen hoeft echter, naar Mattson zelf reeds opmerkt, nog niet het gevolg te zijn van een afbraak, maar kan ook veroorzaakt worden door vorming van hydroxy-chinonen, die een sterker zuur karakter hebben(vinyloge

carbonzuren).
Hiermee kan Mattson echter evenmin de NH_3-fixatie verklaren, tenzij chinonimineverbindingen gevormd worden, terwijl dit tevens geen verklaring geeft voor de vorming van brokstukken. (we komen hierop in hoofdstuk IV nog nader terug). Mattson ontdekte ook, dat de NH_3-fixatie alleen tijdens de autoxydatie kan plaatsvinden en niet achteraf. Het zuurstofverbruik van humus in alkalisch milieu verloopt eerst zeer snel en daarna langzamer. De verhouding tussen de hoeveelheid afgespitste CO_2 en de hoeveelheid zuurstof, die opgenomen wordt is echter tijdens de snelle oxydatie veel lager dan tijdens de langzame. Bij de autoxydatie in ammoniakaal milieu wordt meer zuurstof opgenomen, dan bij autoxydatie in een calciumhydroxydeoplossing. Voor de NH_3-fixatie is dus ook zuurstof nodig. De autoxydatie werd steeds bij kamertemperatuur uitgevoerd zowel met nat als met droog materiaal. Mattson merkte op, dat NH_3 niet alleen door lignine, maar ook door in water oplosbare stoffen uit verschillende boombladeren werd gefixeerd, waarbij tevens humusstoffen ontstonden. Van beukenbladeren was oorspronkelijk 14.62 % onoplosbaar in acetylbromide, na oxydatie was dit gestegen tot 30.6 % en na autoxydatie in ammoniakaal milieu zelfs tot 68.44 %. Dat door autoxydatie de oplosbaarheid in acetylbromide vermindert, verklaart Mattson uit de afname van het aantal OH-groepen, terwijl het effect van de NH_3-fixatie te vergelijken is met het effect van Ca^{++}-ionen, maar alleen bij NH_3 zich nog sterker uit. Wat betreft Springers verdeling in "Braun"- en "Grau"-huminezuren veronderstelt Mattson, dat de "Grau"-huminezuren

1) sterker zijn geoxydeerd en daardoor stabieler zijn in alkalische oplossing.
2) een lager hydroxylgehalte hebben en daardoor minder "hydrophiel" zijn en meer gevoelig voor uitvlokking met electrolyten.
3) meer carboxylgroepen bevatten en daardoor sterker reageren met kleien en ander adsorbentia.
4) een hoger N-gehalte bezitten als resultaat van NH_3-fixatie tijdens de autoxydatie en daarom een diepere kleur en grotere chemische stabiliteit bezitten.

Mattson komt wat betreft de functie van stikstof in humus, tot de volgende conclusie: De basische stikstof in de humus functioneert als electropositieve groepen, die ieder voor zich een electro negatieve groep compenseren, hetzij door directe binding, hetzij door hun electrisch veld. Hierdoor neemt de polaire attractie op oplosmiddelmoleculen af, waardoor dus de oplosbaarheid afneemt.
Mattson heeft ook de NH_3-fixatie tijdens de autoxydatie bij een aantal stoffen van bekende structuur nagegaan, zoals glucose, fructose, di- en tri hydroxybenzenen, galluszuur, tannine e.a. Hierbij bleek, dat deze NH_3-fixatie een typische eigenschap is van di- en trihydroxybenzeenderivaten. Ook door glucose en vooral door fructose werd zo NH_3 in niet-uitwisselbare vorm gebonden. Dit zou, volgens Mattson óók wel eens veroorzaakt kunnen worden door phenolische verbindingen, ontstaan door ringsluiting en wateronttrekking bij deze suikers. Hij veronderstelt, dat er bij autoxydatie van bijv. hydrochinon in ammoniakaal milieu indermediair chinon-iminen ontstaan, die zeer reactief zijn en gemakkelijk condenseren tot donkere amorphe stoffen. Zelfs zouden er chinondi-iminen kunnen worden gevormd. Bij ligninen (die immers het karakter van polyphenolen hebben) zou een dergelijk mechanisme kunnen



chinonimine

optreden.
Fuchs(Ref 50) veronderstelde in 1931 reeds, dat bij de humificatie heterocyclisch gebonden zuurstof in lignine zou worden vervangen door heterocyclisch gebonden stikstof. De juistheid hiervan staat zeker niet vast. Wel kan gezegd worden dat, wanneer stikstof zelfs door koken met geconcentreerde alkali niet als NH_3 wordt afgesplitst,(zoals bij een gedeelte van de in huminezuren gebonden stikstof het geval is) het toch wel heel waarschijnlijk wordt, dat deze stikstof heterocyclisch gebonden is. Van chinoniminen is bekend, dat daaruit door behandeling met zuur of alkali NH_3 wordt vrijgemaakt. Dat de aanwezigheid van vrije phenolische OH-groepen is vereist voor de NH_3-fixatie, bleek uit een onderzoek van Bennett(3). Voorafgaande methylering van lignine bleek nl. gedeeltelijk de NH_3-fixatie te verhinderen. De bezwaren van Mattson tegen het door Waksman voorgestelde reactiemechanisme bij de binding van eiwit aan lignine (zie hoofdstuk II) nl. de vorming van een schiffse base, zijn eigenlijk alleen gericht tegen Waksmans opmerking, dat geen reactie tussen carboxyl- of hydroxyl-groepen van lignine en aminogroepen van het eiwit zou optreden. Volgens Mattson bindt namelijk een lignine-eiwit complex minder base dan vrije lignine als beide tegelijk aan autoxydatie worden bloot gesteld. Titratiecurven van proteinehumaten en -lignaten bewezen ook, dat de basenbindingscapaciteit van humus en lignine verlaagd wordt bij toevoeging van proteïne. Het proteïne gedraagt zich dus als een base beneden het isoelectrische punt. Er vindt dus wel reactie van de aminofunctie met de carboxylgroepen van lignine plaats. Mattson veronderstelt dan ook, dat Waksman niet-geoxydeerd lignine gebruikte, dat tijdens de bereiding van het ligno-proteïnecomplex is geoxydeerd, waardoor de afname van de uitwisselingscapaciteit ten gevolge van de reactie van aminogroepen met carboxylgroepen weer gecompenseerd werd door toename van het aantal zure functies in lignine. De theoretische mogelijkheid, dat er althans gedeeltelijk, vorming van een schiffse base optreedt, kan Mattson echter moeilijk ontkennen, gezien zijn eigen chinoniminetheorie.
Ook hierop wordt aan het eind van hoofdstuk IV nog nader ingegaan. De conclusie, dat de humificatie van lignine bestaat uit een ontmethylering, gevolgd door autoxydatie waarbij gelijktijdig NH_3 en andere aminoverbindingen gefixeerd kunnen worden, lijkt in ieder geval wel gerechtvaardigd.
Hoe het reactiemechanisme precies is, kan alleen nader onderzoek leren.

IV Modelstoffen van huminezuren uit polyhydroxybenzeenderivaten en overeenkomstige chinonen

Zoals in vorige hoofdstukken reeds opgemerkt, wordt thans als vaststaand aangenomen, dat de meeste huminezuren zijn opgebouwd uit eenheden met chinoide structuur.
Deze aanname wordt gebaseerd op de volgende feiten:

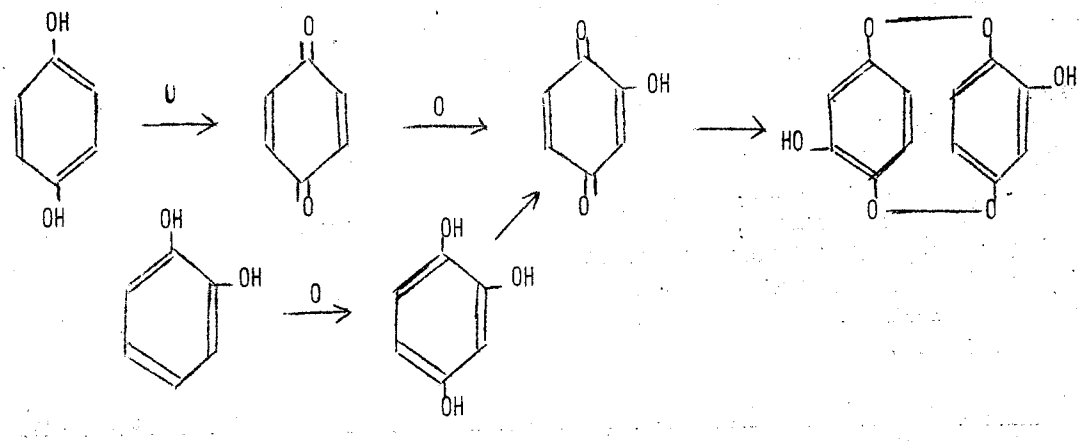
1) Bij oxydatie van huminezuren met chloordioxyde in verdunde waterige oplossing volgens Schmidt en Atterer(67) ontstaat (in betrekkelijk geringe hoeveelheden) maleïnezuur. Dit wijst op het structuurelement C . CH : CH . C of C : CH . CH : C
2) De huminezuren hebben een uitgesproken redoxkarakter (Beutelspacher (4)).

3) Bij reductie van huminezuren met natriumamalgaam en water in een N_2-atmosfeer verkreeg Forsyth(29) zwak geel gekleurde "leu-co-huminezuren", met het karakter van aromatische polyphenolen, die bij staan aan de lucht weer tot bruin-zwart worden geoxydeerd, waarbij de kleurdragende (chinoide) structuur dus weer terugkeert.

4) Verschillende micro-organismen vormen, zoals vermeld, op bepaalde voedingsbodems bruine kleurstoffen met het karakter van huminezuren, terwijl hierbij in verschillende gevallen chinonderivaten als tussenproducten konden worden aangetoond.

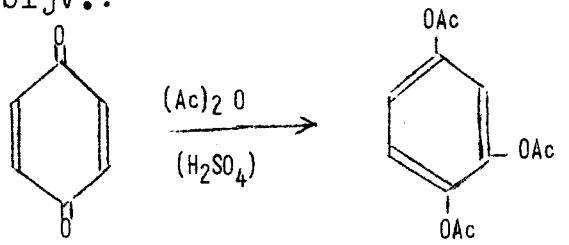
Op grond hiervan werden door verschillende onderzoekers, waarvan vooral Eller en Flaig genoemd moeten worden, synthetische huminezuren gemaakt uit di- en polyhydroxybenzeenderivaten en de overeenkomstige chinonen. De verregaande overeenkomst in eigenschappen van deze synthetische producten en natuurlijke huminezuren, bewees de juistheid van de veronderstelling, dat in ieder geval de meeste natuurlijke huminezuren zijn opgebouwd uit chinoide monomeren. Het voert te ver hier een bespreking te geven van al deze eigenschappen. Een opsomming ervan is in hoofdstuk I gegeven.
Hier zal een overzicht en een bespreking worden gegeven van de pogingen het polymerisatiemechanisme van chinolen en chinonen op te helderen.

Eller(12) ging verschillende di- en polyhydroxybenzeenderivaten en chinonen in alkalisch milieu oxyderen met luchtzuurstof of andere oxydatiemiddelen en verkreeg in de meeste gevallen zwart-bruine amorphe producten met een hoog moleculair gewicht.
Hij stelde voor de autoxydatie van hydrochinon en pyrocatechol in alkalisch milieu de volgende reactievergelijking op:

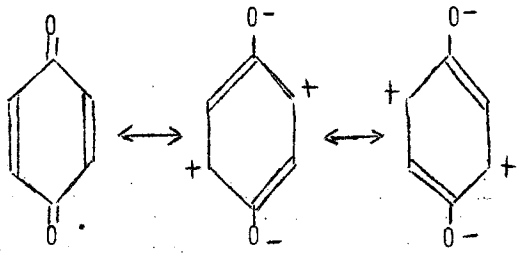


Hiervoor worden geen andere bewijzen aangevoerd dan dat de analyse wees op een polymeer oxychinon $(C_6H_4O_3)_n$ en dat de ontstane verbinding een aromatisch karakter had.
Bij de oxydatie van deze phenolen tot huminezuren met kaliumpersulfaat werd geen CO_2 afgesplitst, zodat volgens Eller ringverbreking onwaarschijnlijk is. Hierop komen we bij de theorie van Flaig nog op terug.
De (overigens ook vrij onwaarschijnlijke) formule voor het eindproduct is bij latere onderzoekingen onjuist gebleken, maar dat intermediair chinon en hydroxychinon wordt gevormd is voor hydrochinon als uitgangsstof definitief bewezen.
Een serieuze poging het reactiemechanisme op te helderen wordt

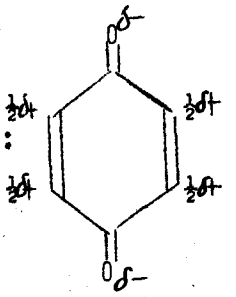
ook gedaan door Erdtman (23). Hij maakt een uitvoerige studie van de reactiviteit van chinonen wat betreft (1.4)-additie. Als criterium hiervoor neemt hij de reactiesnelheid van chinonen met azijnzuuranhydride in aanwezigheid van zwavelzuur(Thiele-acetylering), waarbij acetaten van hydroxychinolen worden gevormd, bijv.:



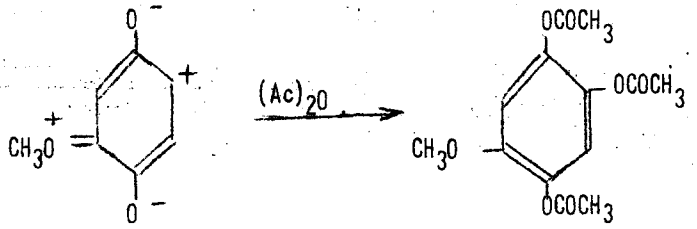
De theoretische beschouwingen van Erdtman zullen hier enigszins aangevuld en met gebruikmaking van de huidige terminologie worden weergegeven.
Bij chinon treedt een mesomeer effect op. De gebruikelijke structuurformule geeft niet de werkelijke toestand aan. De carbonyl-zuurstofatomen trekken nl. electronen aan uit de C-O-dubbele band, die "nageleverd" kunnen worden uit de C-C-dubbele band, waardoor een zekere electrische polarisatie van het molecuul tot stand komt. Doordat er twee carbonylgroepen op geconjugeerde plaatsen in chinon aanwezig zijn, ontstaat echter niet op een bepaalde plaats in de kern een groter tekort aan electronen (dus een grotere positieve lading) dan op een andere plaats, maar is dit voor alle vier C-atomen die tussen de carbonylgroepen liggen gelijk.
Dit kan als volgt worden weergegeven:



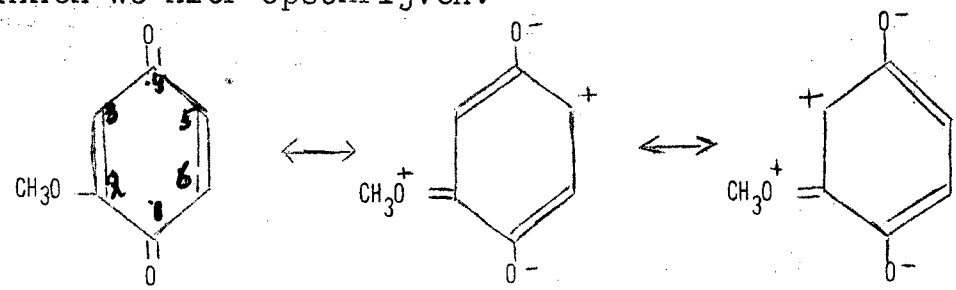
of in één formule:



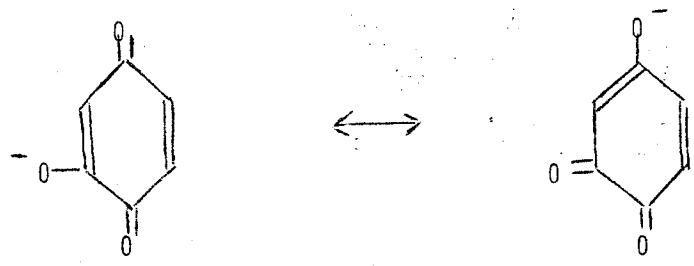
Dat de positieve lading gelijkelijk verdeeld is over vier C-atomen verklaart de betrekkelijke stabiliteit van chinon ten opzichte van acetylering vergeleken met bijv. methoxychinon. Hier ligt de situatie nl. geheel anders.
Erdtman drukt dat ongeveer als volgt uit:
Eén van de beide geconjugeerde systemen -c ═ c-c═O is geneutraliseerd, doordat het ene carbonyl-O-atoom nu zijn behoefte aan electronen kan dekken uit de OCH_3 groep, terwijl het andere hiervoor is aangewezen op de dubbele C-C band, zodat de plaats para ten opzichte van de OCH_3-groep positief geladen is en hier dus gemakkelijk een acetoxygroep kan worden gebonden:



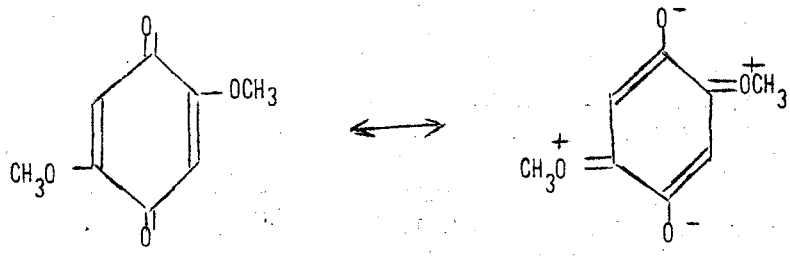
Dit is echter niet geheel juist. In methoxychinon treedt een veel sterker mesomeer effect op dan in chinon, doordat we op geconjugeerde plaatsen een OCH_3-groep hebben met een +M-effect en carbonylgroepen met een -M-effect. Als grens-structuren kunnen we hier opschrijven:



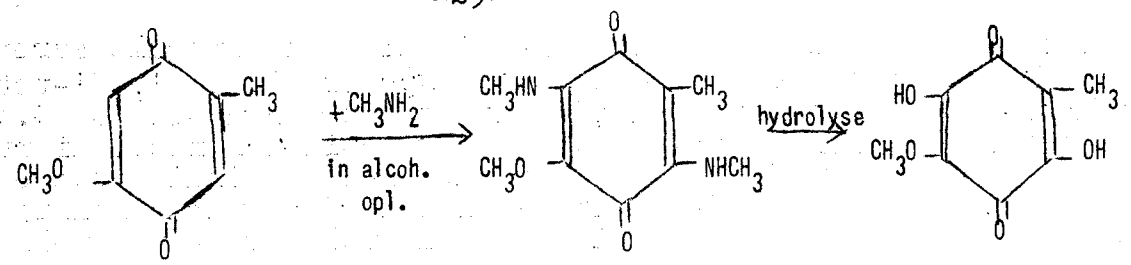
C-atoom 6 wordt dus niet meer positief, dus hier zal geen acetoxygroep komen. Door het sterkere mesomeer effect is de positieve lading op de C-atomen 3 en 5 groter dan op één der C-atomen in chinon, dus methoxychinon zal reactiever zijn dan chinon ten opzichte van acetylering. Dat de acetoxygroep alleen aan het C-atoom 5 addeert zal waarschijnlijk het gevolg zijn van een zekere sterische belemmering van additie aan C-atoom 3. Dat methoxychinon in alkalisch milieu stabieler is ten opzichte van oxydatie dan hydroxychinon kan worden verklaard uit het feit, dat O^- een sterker +M-effect heeft, dan de OCH_3-groep. In alkalisch milieu krijgen we echter ook de volgende mesomerie:



en van ortho-chinonconfiguraties is bekend, dat ze veel minder stabiel zijn ten opzichte van oxydatie dan parachinonen.
Dat 2,5-dimethoxychinon zeer stabiel is ten opzichte van acetylering is nu begrijpelijk, want daar is immers geen positief geladen C-atoom meer aanwezig:

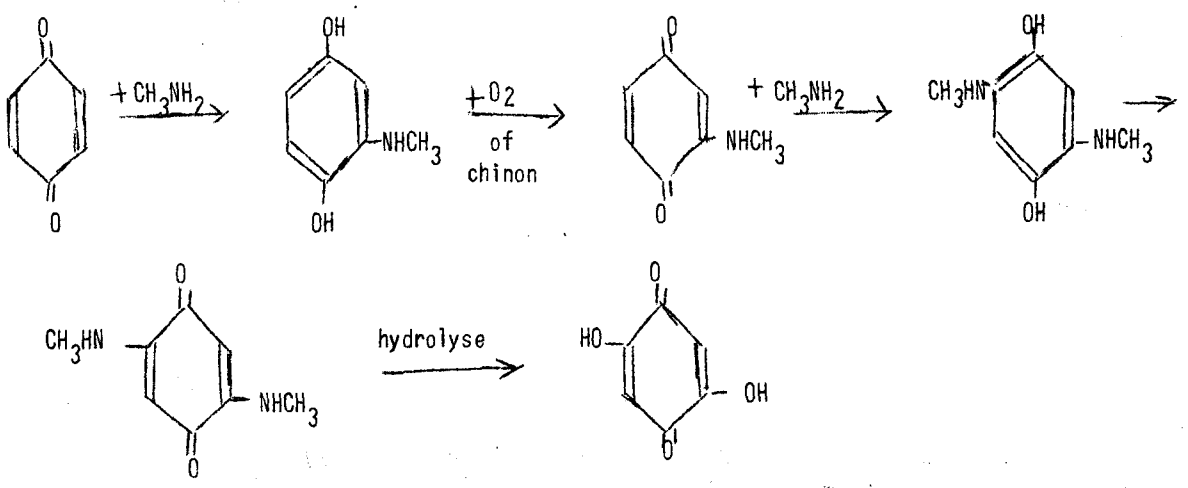


In alkalisch milieu treedt dan ook slechts ontmethylering op (als een verzeping van vinyloge esterfuncties op te vatten), maar geen polymerisatie.
Interessant is in dit verband ook wat Anslow en Raistrick(2) vermelden. Zij probeerden spinulosine(3.6-dihydroxy-4-methoxy-2.5-toluchinon) als volgt te synthetiseren:



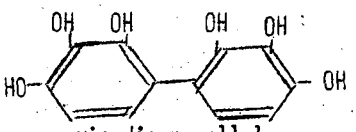
4-methoxytoluchinon spinulosine

Dit naar analogie van de (nucleophiele)1.4-additie van methylamine aan chinon:

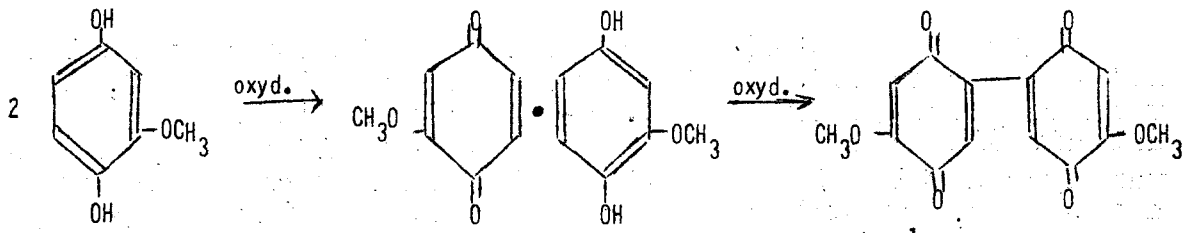


2.5-bismethylaminochinon 2.5-dihydroxychinon

Uit 4-methoxytoluchinon verkregen Anslow en Raistrick echter ook 2.5-bismethylaminochinon, evenals uit methoxychinon en 2.5-dimethoxychinon. De CH_3 en OCH_3-groep werden dus vervangen door de $NHCH_3$-groepen en de verwachte additie aan C-atoom 3 en 6 vond niet plaats. Dit is echter op grond van het bovenstaande heel verklaarbaar.
Vervolgens onderzocht Erdtman de oxydatieve koppeling van phenolen en chinonen tot diphenylderivaten.
Bij oxydatie van pyrogallol in barietwater kon vicinaal dipyrogallol worden geisoleerd.
De structuur hiervan werd bewezen.
Op grond hiervan veronderstelt Erdtman, dat ook bij autoxydatie van pyrogallol in verdunde natronloog, waarbij "huminezuren" ontstaan, intermediair vic.dipyrogallol gevormd wordt. Erdtman slaagde er niet in om eenvoudige koppelingsproducten van hydroxychinol (1,2,4-trihydroxybenzeen) te isoleren noch in alkalisch, noch in zuur milieu. De polymerisatie gaat onmiddellijk verder. Hij onderzocht daarom het meer stabiele methoxychinol in zuur milieu. Door oxydatie met chroomzuur ontstond hieruit via een "chinhydron" 4.4'-dimethoxydichinon.

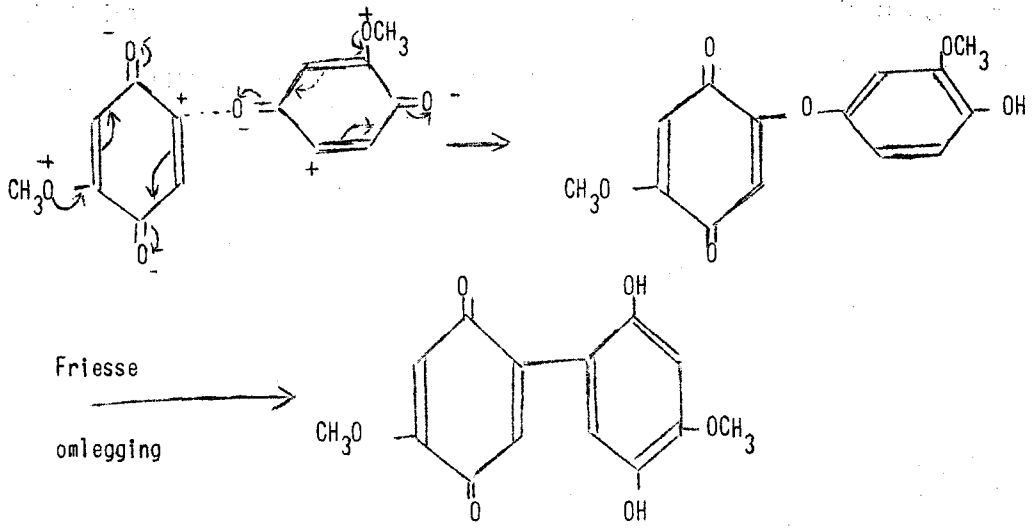


vic.dipyrogallol

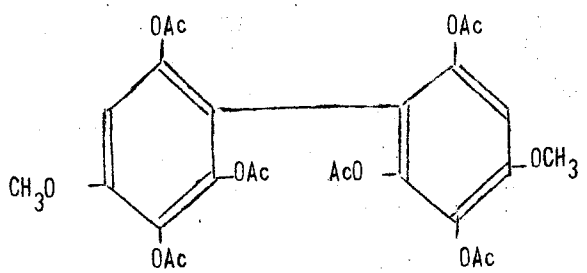


methoxychinol 4,4'-dimethoxydichinon

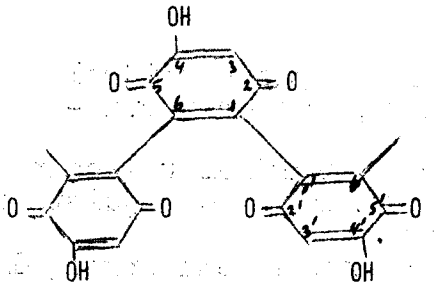
Methoxychinon dimeriseert in aanwezigheid van minerale zuren quantitatief tot een gedeeltelijk geoxydeerd 2.5, 2', 5'-tetrahydroxy-4.4'-dimethoxydiphenyl waaruit door oxydatie ook 4.4'-dimethoxydichinon ontstaat. Over het reactiemechanisme hiervan laat Erdtman zich niet uit. Een rechtstreekse binding tussen twee positief geladen C-atomen is uiteraard onwaarschijnlijk. Misschien is de koppeling het beste als volgt voor te stellen:



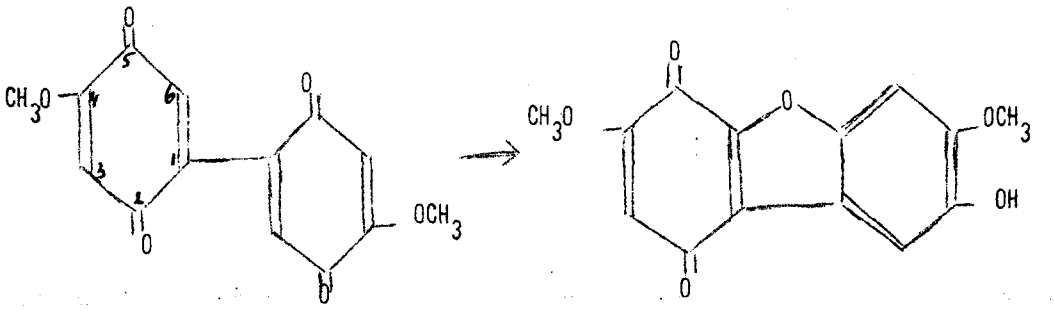
Voor alle vier(twee aan twee gelijkwaardige) ongesubstitueerde C-atomen in 4.4'-dimethoxydichinon is wel een zekere reactiviteit te beredeneren, maar men kan niet meer op grond van theoretische overwegingen voorspellen, welke twee C-atomen hiervan het sterkst positief geladen zijn, gezien het grote aantal mesomere structuren, dat zich voor deze verbinding laat uitschrijven. Een vergelijking met 2.5-dimethoxychinon gaat uiteraard niet op, omdat door de directe binding der kernen een nieuw geconjugeerd systeem is ontstaan. Het enige, wat misschien voorspeld kan worden is, dat de acetylering van 4.4'-dimethoxydichinon langzamer zal verlopen dan die van methoxychinon. De stabiliteit van een verbinding wordt nl. in belangrijke mate bepaald door het aantal aequivalente mesomere structuren, dat men voor die verbinding kan opschrijven en dat zijn er voor dit dichinon verscheidene.
Volgens Erdtman ontstaat bij acetylering 2, 5, 6, 2', 5', 6'-hexa-acetoxy 4.4'-dimethoxydiphenyl.



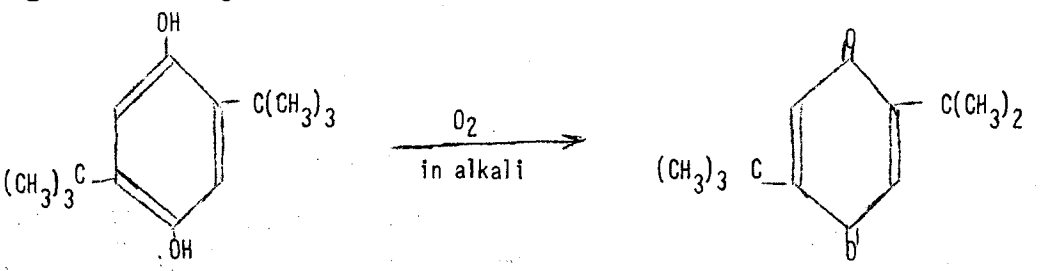
De plaatsen 6 en 6' bleken dus ten opzichte van acetylering het meest reactief. Het is echter helemaal niet gezegd, dat verdere polymerisatie van 4.4'-dihydroxydichinon (aangenomen, dat dit dimeer als tussenproduct ontstaat bij de polymerisatie van hydroxychinon) in alkalisch milieu zal verlopen volgens het schema, dat Erdtman op grond van de ervaringen bij acetylering opstelt en wat in de volgende formule wordt weergegeven:



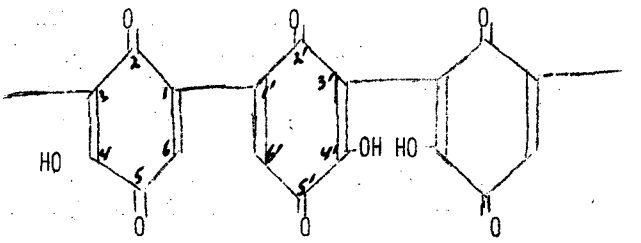
In dit milieu en bij deze verbinding zou verdere reactie ook wel op de plaatsen 3 en 3' kunnen plaatsvinden. Alleen het experiment kan hier de beslissing brengen. Een tweede bewijs voor de reactiviteit van de 6- en 6'-plaatsen ziet Erdtman in het feit, dat er bij verhitten van 4.4'-dimethoxydichinon op 210-215° of bij lager temperatuur in aanwezigheid van zuren, een intramoleculaire condensatie plaats vindt, waarvoor Erdtman het volgende reactieschema geeft:



Op zichzelf is deze conclusie misschien niet onjuist, maar het is zeker geen bewijs tegen reactiviteit van de 3- en 3'-plaatsen, aangezien intramoleculaire condensatie op deze plaatsen niet mogelijk is. Eén van de bezwaren van Flaig en Schulze(28) tegen de theorie van Erdtman is, dat een reactie waarbij een stof zou ontstaan met een structuurformule als door Erdtman gegeven sterisch belemmerd is. Zij onderzochten nl. de autoxydaten van 2.5-di-tert.butyl-hydrochinon in alkalisch milieu. Hierbij bleek de reactie niet verder te gaan dan tot vorming van het overeenkomstige chinon, wat zij aan sterische belemmering toeschrijven:

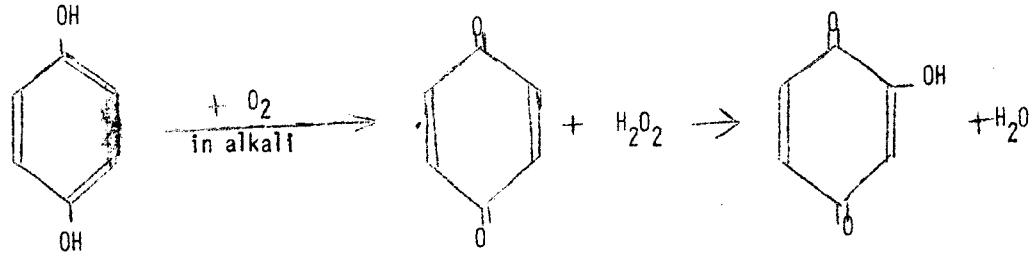


Verder gaande polymerisatie van 4.4'-dihydroxydichinon via de plaatsen 3 en 3' zou een verbinding geven met de volgende structuur:

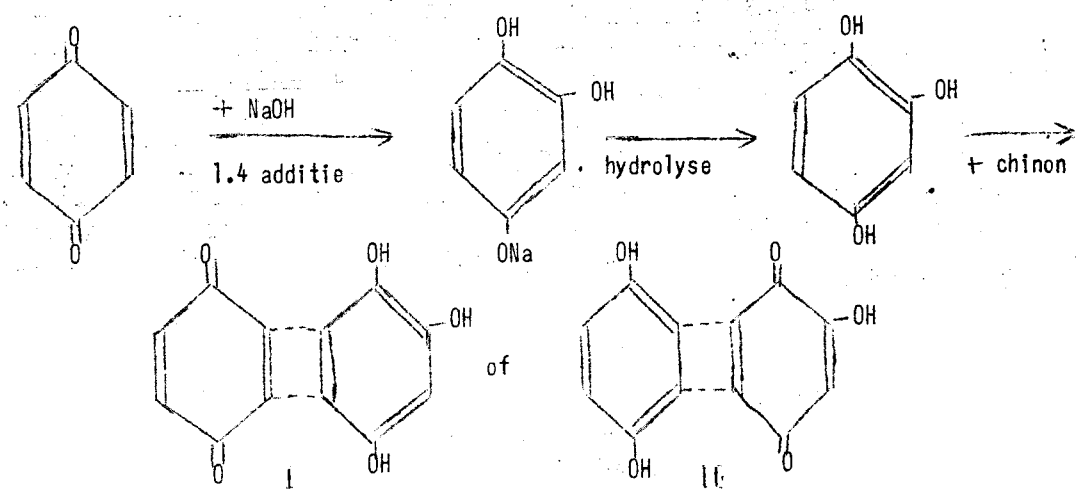


Hierbij zou dus een min of meer "lineair" polymeer ontstaan. Door Flaig en Beutelspacher(26) werd echter aangetoond, dat de ontstane verbinding een spherocolloid is. Bovendien concludeert

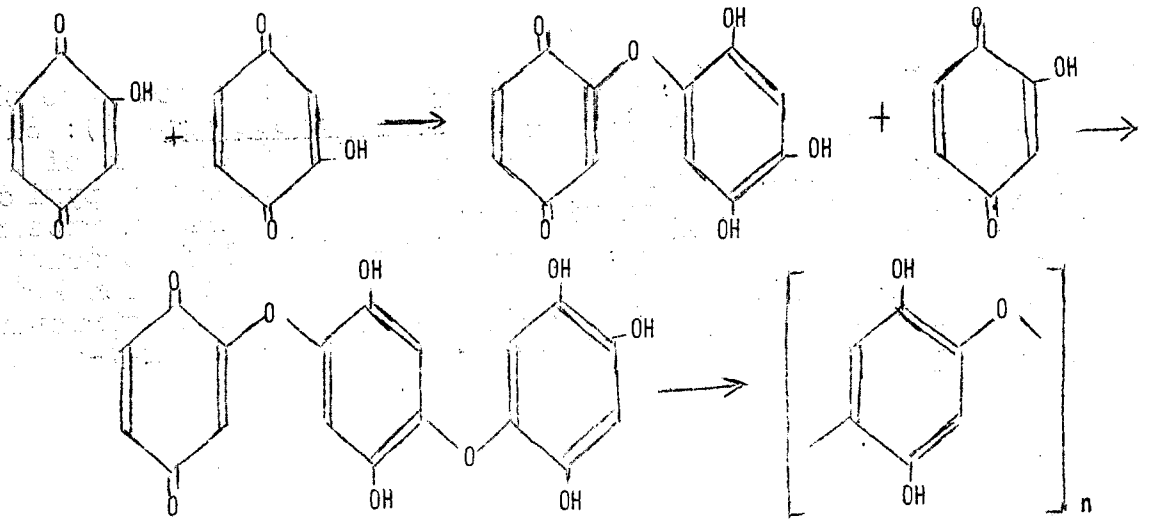
Flaig (25) uit het feit, dat het ontstane polymeer vrijwel onoplosbaar is in organische oplosmiddelen, dat er vertakkingen in het polymeer optreden.
Er zijn dus verschillende bezwaren tegen de vrijwel volkomen hypothetische theorie van Erdtman aan te voeren. De onjuistheid is echter nog niet onomstotelijk bewezen.
Inmiddels is door Flaig (25)echter een reactieschema opgesteld, dat een grotere mate van waarschijnlijkheid bezit en dat nu zal worden besproken.
Door James, Snell en Weissberger(41) is bewezen dat de eerste stap bij de autoxydatie van hydrochinon in alkalisch milieu is de vorming van chinon en H_2O_2, waaruit vervolgens hydroxychinon gevormd wordt:



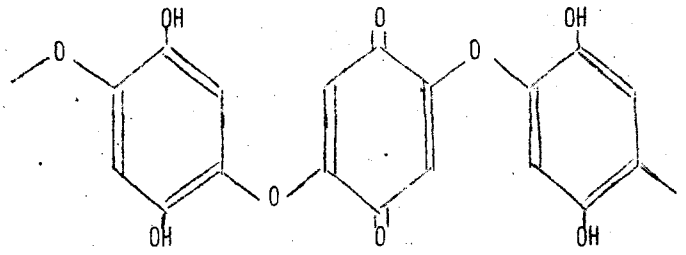
Het intermediair ontstaan van hydroxychinon is door Flaig ook waarschijnlijk gemaakt, wanneer men niet uitgaat van hydrochinon, maar van chinon zelf. Het reactieschema is dan volgens Flaig:



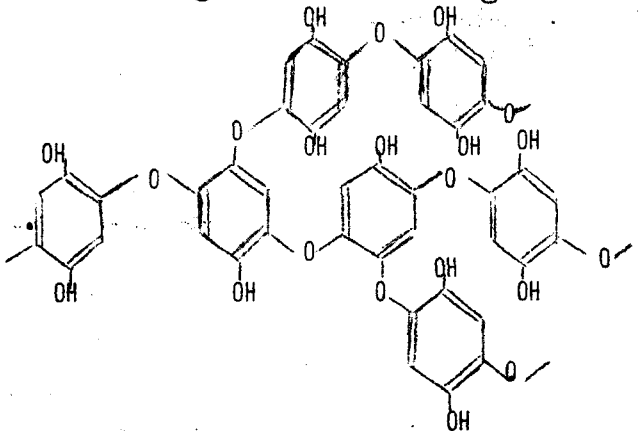
Bij toevoeging nl. van verdunde natronloog aan een waterige oplossing van chinon onder afsluiting van de lucht, treedt onmiddellijk een intensieve groene kleur op, wat wijst op chinhydronvorming. Bij aanzuren met overmaat zwavelzuur slaat de kleur om naar wijnrood en er scheiden zich zwartbruine huminezuren af. Na affiltreren hiervan is uit het filtraat een aanzienlijke hoeveelheid hydrochinon uit te aetheren en is geen chinon meer aan te tonen. Het laatste wijst dus op formule II. Bovendien bleken de huminezuren bereid uit hydrochinon, chinon, en hydroxychinon, voor zover dit bij dergelijke zeer nauw verwante polymeren is na te gaan, in alle opzichten gelijk te zijn.
Flaig veronderstelt nu, dat het koppelingsmechanisme is, een steeds verder gaande 1.4-additie te vergelijken met de Thieleactylering:



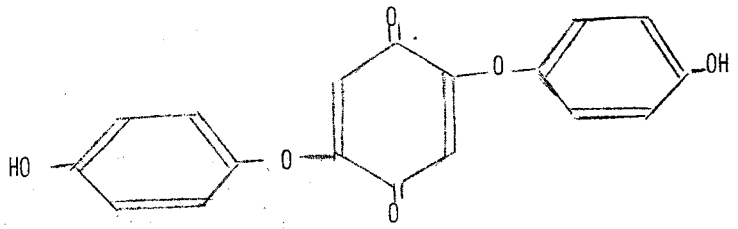
Op grond van wat boven over de reactiviteit van chinonen ten opzichte van acetylering gezegd is lijkt dit een zeer plausibel schema. Zo is volgens Flaig ook het geringe aantal carbonylgroepen te verklaren, dat met phenylhydrazine carbamaat is aan te tonen. Bij verdere zuurstofopname ontstaat dan volgens Flaig een partieel-chinoide stof met chinhydronkarakter.



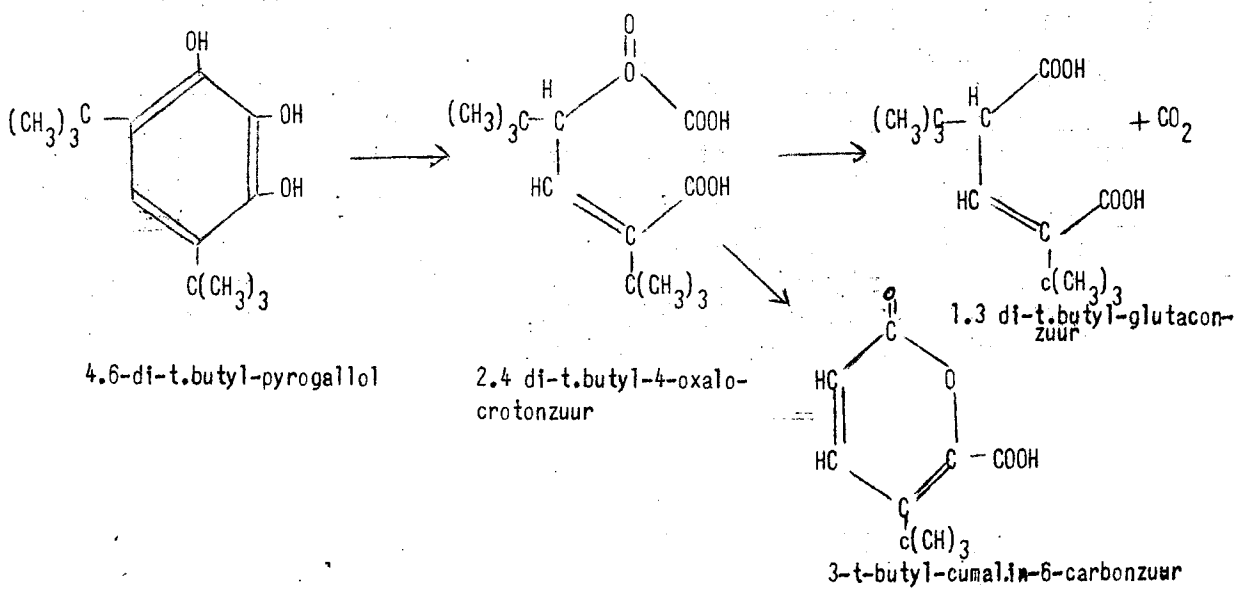
Hieruit is de donkere kleur, het gedrag als redoxsysteem en de oplosbaarheid in alkali verklaarbaar.
Dit is volgens Flaig misschien te beschouwen als een min of meer stabiele eindtoestand van de polymerisatie bij pH 8-9.
De structuur van het chinoide monomeer is nl. te vergelijken met die van het stabiele 2.5 dihydroxychinon en maximale opbrengst aan huminezuur uit hydrochinen (nl.40 %) wordt verkregen bij een zuurstofopname van 2.5 at.per molhydrochinon wat precies klopt met dit reactieschema. Deze hoeveelheid zuurstof wordt opgenomen bij pH 8-9.
Bij hogere pH werd meer zuurstof opgenomen, waarbij de zesring werd verbroken en er CO_2 werd afgesplitst (bij aanzuren treedt nl. CO_2 ontwikkeling op). Dit is uit de formule van Flaig goed in te zien, als men bedenkt, dat bij verdere oxydatie van de overige phenolische monomeren tot chinoide systemen, de ontstane verbinding te vergelijken is met een polymeer zuuranhydride. Omdat de vorming van een lineair polymerisaat onwaarschijnlijk is, zoals reeds opgemerkt, neemt Flaig vertakkingen aan als volgt:



Een zekere steun vóór, maar ook een bezwaar tegen deze theorie van Flaig levert het werk van Diels en Kassebart(11): Bij toevoeging van enkele druppels watervrij mierenzuur of een zeer geringe hoeveelheid water aan een mengsel van pyridine en p.chinon vond een reactie plaats onder sterke warmteontwikkeling, waarbij een taai, rood, niet-kristallijn product ontstond. Bij behandeling hiervan met water werd een kristallijn trimeer van chinon verkregen, waarvan de structuur onomstotelijk bewezen werd nl. 2.5-di(p.oxyphenoxy)-benzochinon-1.4.

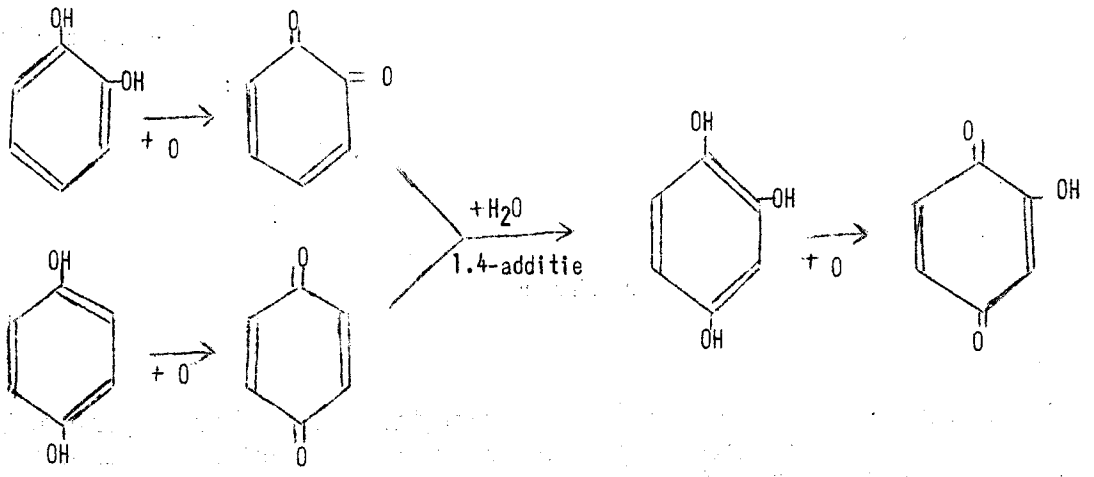


Hier hebben we dus een dergelijke structuur als in de formule van Flaig. Met alkali trad echter splitsing op in hydrochinon en 2.5 dihydroxychinon (weer als een verzeping te beschouwen van de vinyloge esters) en met dimethylsulfaat en alkali (10%-ige kaliloog) een zeer vlotte splitsing in de dimethylaether van hydrochinon en 2.5-dihydroxychinon. Bij behandeling met methylalcohol in de warmte of ook bij kamertemperatuur ontstond in goede opbrengst 2.5 dimethoxychinon.
Dergelijke reacties worden niet van chinonhuminezuren vermeld en dit pleit niet voor de formule van Flaig. Het mechanisme van de ringopening bij ortho-chinonen ten gevolge van autoxydatie in alkalisch milieu werd door Flaig en Schultze(28,71) bestudeerd bij 4.6 di- tert.Butyl - pyrogallol.
Hierbij werd in een opbrengst van 70 % 2.4-di-tert.butyl-4-oxalocrotonzuur verkregen, waaruit in een 10%-ige NaOH-oplossing door behandeling met 30%-ige H_2O_2 quantitatief 1.3 di-t-butyl-glutaconzuur ontstond en waaruit met geconc.zwavelzuur in een opbrengst van 86 % 3-t.butyl- cumalin-6-carbonzuur werd verkregen.
Reactieschema:

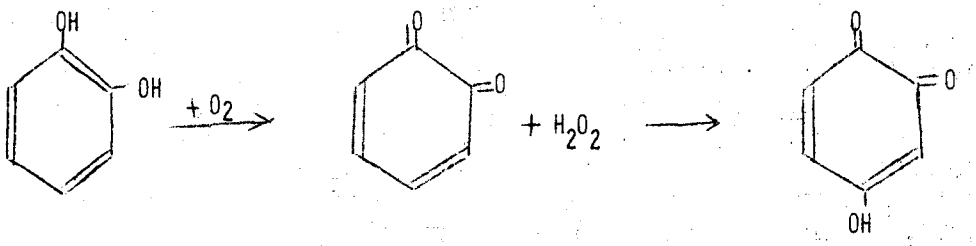


Ook 3.5 di-tert.butyl-pyrocatechol onderging in alk.milieu autoxydatie onder ringopening, waarbij een olieachtig zuur ontstond. De structuur hiervan is nog niet opgehelderd.

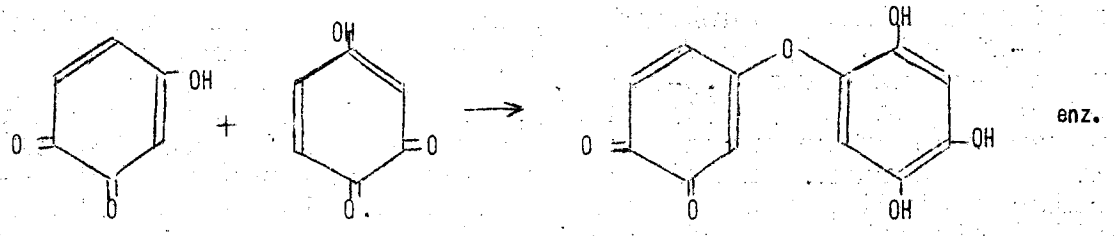
Flaig voert zelf als bezwaar tegen zijn schema aan, dat hieruit niet verklaarbaar is, dat er verschil (zij het ook slechts gradueel) bestaat tussen hydrochinon- en pyrocatecholhuminezuren. Immers volgens Flaig zouden we het volgende reactieschema hebben:



Uit beide dihydroxybenzenen ontstaat dus volgens Flaig intermediair 1, 2, 4 trihydroxybenzeen.
Volgens het schema van James, Snell en Weissberger (die overigens de autoxydatie van pyrocatechol niet bestudeerd hebben) zou een ander hydroxychinon kunnen ontstaan als volgt:

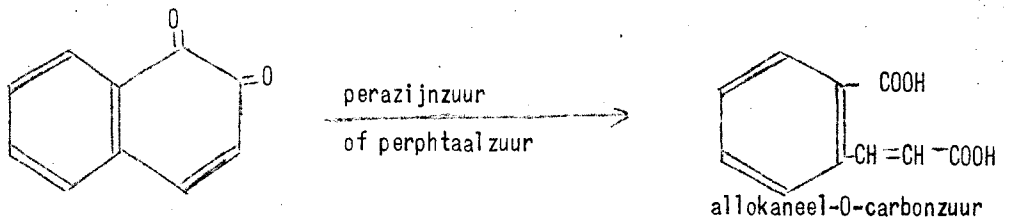


Dit hydroxychinon is echter tautomeer met het uit hydrochinon ontstane, terwijl zoals reeds opgemerkt de ionen hiervan mesomeer zijn. Tussen deze beide hydroxychinonen is in alkalisch milieu dus geen verschil.
Een koppelingsmechanisme in analogie van dat van Flaig zou overigens ook nog hetzelfde polymeer geven:

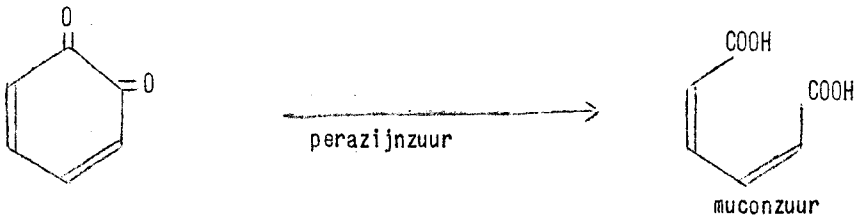


Dit is blijkens het (gradueel)verschil in eigenschappen niet het geval. Vermoedelijk zal er dus uit O.chinonen en H_2O_2 een ander oxydatie-product ontstaan en zal daardoor het polymeer een enigszins andere structuur hebben. Hierbij kan nog opgemerkt worden, dat ringverbreking gemakkelijker optreedt bij O-chinonconfiguraties. Volgens Boeseken en Karrer reageren

1.4-naphtochinonen niet met perazijnzuur of perphtaalzuur terwijl bij 1.2-naphtochinonen het volgende optreedt:



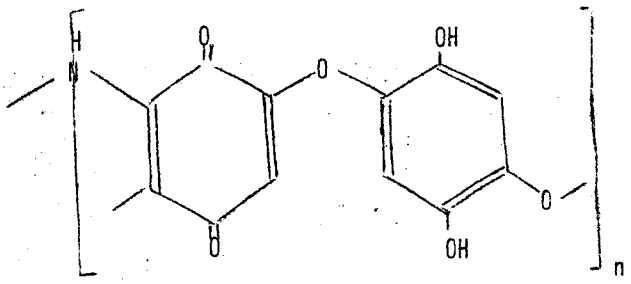
Uit O.chinon ontstaat met perazijnzuur in geringe opbrengst muconzuur:



Definitieve conclusies over de structuur van deze synthetische huminezuren kunnen dus nog niet worden getrokken. Wel kan worden gezegd, dat het schema van Flaig een grotere mate van waarschijnlijkheid bezit dan dat van Erdtman.

De binding van stikstof in huminezuren

Zoals reeds in voorgaande hoofdstukken is opgemerkt, is men tegenwoordig van mening, dat in natuurlijke huminezuren stikstofatomen heterocyclisch zijn ingebouwd. Alle pogingen om de huminezuren te zuiveren van N-houdende verontreinigingen faalden. De stikstof bleek zelfs gedeeltelijk niet door verhitten met geconcentreerde loog als NH_3 af te splitsen te zijn. Reeds door Eller werd een poging gedaan hierover meer licht te verschaffen. Hij verkreeg nl. ook "huminezuren" ten gevolge van autoxydatie van aminophenolen in alkalisch milieu, waarbij een gedeelte van de stikstof uit de aminophenolen als NH_3 vrijkwam, maar ook een gedeelte stevig gebonden werd in het ontstane polymeer. Ook maakt Eller stikstofhoudende huminezuren door de autoxydatie van hydrochinon in ammoniakaal milieu te doen verlopen. Bepaalde conclusies voor de structuur van de ontstane verbindingen werden door Eller niet getrokken.
In de publicaties van Erdtman wordt over een binding van stikstof niet gerept, maar door Flaig werd het onderzoek van Eller voortgezet. Hij bestudeerde de autoxydatie van hydrochinon in ammoniakaal milieu nauwkeuriger, wat betreft zuurstofverbruik en NH_3-fixatie. Bij pH 7-8 werden producten verkregen met een totaal N-gehalte van 3.5-3.8 %. Bij nader onderzoek van een product waarin 3.6 % N(Kjeldahl), bleek hieruit door verhitten met verdunde of geconcentreerde natronloog 1 % N als NH_3 afgesplitst te worden. Hieruit concludeert Flaig tot een heterocyclische binding van de overige 2.6 % N. Bij de gebruikelijke destillatie met MgO werd slechts 0.5 % N als NH_3 afgesplitst, wat volgens Flaig veroorzaakt werd, doordat de stof hier niet goed oploste of doordat de "verzeping van de niet in de kern gebonden N" onvolledig was).
Bij deze autoxydatie werden iets meer dan 3 at.zuurstof per mol. hydrochinon verbruikt.
Op grond hiervan geeft Flaig aan het ontstane product de volgende formule:

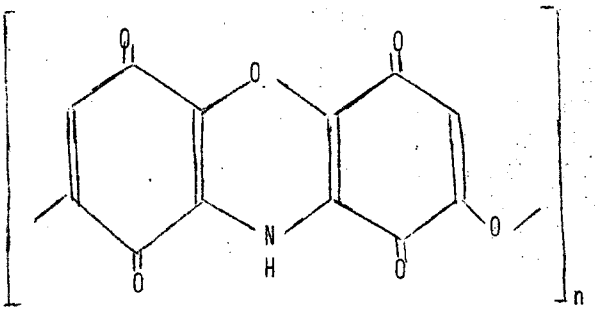


$(C_{12}H_5O_6\frac{NH}{2})n$

M.g. 253 n.

berekend N-gehalte 2.75 %

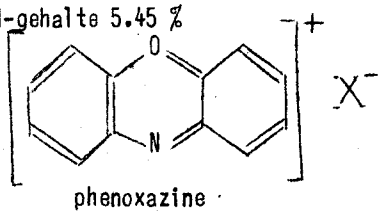
Hierin is het verbruik van 3 at.zuurstof per mol. hydrochinon verantwoord. Bij een pH van ongeveer 10 werden 4 at. zuurstof per mol.hydrochinon verbruikt en was het totaal N-gehalte in het ontstane product 12.29 %, waarvan 5.65 % "heterocyclisch" gebonden.
Voor dit product stelt Flaig de volgende formule voor:



$(C_{12}H_3O_6N)n$

M.g. 257 n.

berekend N-gehalte 5.45 %



phenoxazine

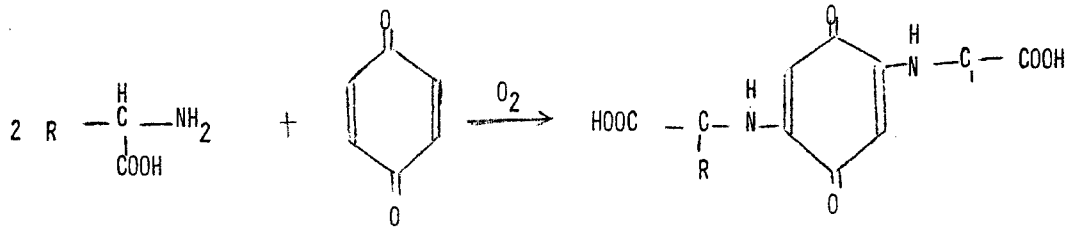
Dit is dus te beschouwen als een phenoxazinederivaat.
Uit het ontstaan van een verbinding met een dergelijke structuur zou,volgens Flaig, misschien de grotere kleurdiepte van "Grau"-huminezuren ten opzichte van "Braun"-huminezuren verklaard kunnen worden.
Door Flaig werden verschillende phenoxazinederivaten zowel met zuur als met geconcentreerde loog behandeld en hierbij bleek geen NH_3 te worden afgesplitst, terwijl dit wel gebeurt bij chinoniminen(zie de theorie van Mattson in het hoofdstuk over lignine) onder dergelijke omstandigheden.
Flaig vermeldt niet welke phenoxazinederivaten hij onderzocht heeft. Het lijkt niet erg waarschijnlijk, dat de stikstof in een verbinding met een formule als door Flaig aan dit polymeer gegeven zo stevig gebonden zal zijn, dat het door behandeling met zuur of geconcentreerde alkali niet zal worden afgesplitst. De C-N-binding wordt immers aanzienlijk verzwakt door de aanwezigheid van de carbonylfuncties (te vergelijken met vinyloge zuuramiden). Van N-methyl-aminochinonen is bekend, dat de $NHCH_3$-groep vrij gemakkelijk door behandeling met alkali wordt vervangen door een OH-groep.

Het gehalte aan "heterocyclisch" gebonden stikstof bleek nooit hoger te zijn dan 6 % (ook bij natuurlijke huminezuren wordt deze waarde vrijwel nooit overschreden).
Een zeer interessante waarneming van Flaig is, dat na voltooide polymerisatie van hydrochinon in natronalkalisch milieu ammoniak niet meer "heterocyclisch" kon worden gebonden. Dit pleit voor de formule van Flaig voor N-vrije hydrochinon-

huminezuren, aangezien de reactiviteit van de chinoide monomeren hierin te vergelijken is met die van 2.5-dimethoxychinon.(of er met alcoholische ammoniak of methylamine een vervanging van zuurstof door NH resp. $NHCH_3$ plaats vindt in analogie met de reactie van 2.5-dimethoxychinon volgens Anslow en Raistrick, wordt door Flaig niet vermeld. Dit zou overigens een goede aanwijzing zijn voor de juistheid van Flaigs formule voor N-vrije hydrochinonhuminezuren).
Deze waarneming, dat in het in alkalische oplossing ontstane polymeer geen heterocycli meer worden gevormd met NH_3 en die een treffende analogie vertoont met een waarneming van Mattson bij lignine, bewijst dat reactie met NH_3 tijdens een der eerste phasen van het polymerisatieproces plaatsvindt.
Uit het feit, dat bij verbruik van 4 at.zuurstof per mol. hydrochinon in natronalkalisch milieu de opbrengst aan huminezuren slechts 3-5 % is en dat daarbij sterke CO_2-ontwikkeling optreedt, terwijl in ammoniakaal milieu de opbrengst 90 % is en er vrijwel geen CO_2-ontwikkeling optreedt, kan worden geconcludeerd, dat de reactie met NH_3, zoals ook te verwachten was, een additie is aan een chinoide verbinding, die daardoor in e en phenolische overgaat, waardoor opnieuw zuurstof nodig is voor oxydatie tot de chinoide structuur. Dit is dus tevens nog een bezwaar tegen de chinonimine theorie van Mattson.
Bij autoxydatie van hydrochinon in een waterige monomethylamineoplossing verkreeg Flaig ook hoogmoleculaire, stikstofhoudende producten maar niet in een waterige di- of trimethylamineoplossing.
Hieruit volgt dus, dat er bij de reactie met NH_3 twee H-atomen van de NH_3 betrokken zijn.
Door Flaig werd tenslotte nog een interessante overeenkomst ontdekt tussen NH_3 en formaldehyde bij deze reacties.
Bij autoxydatie van hydrochinon in alkalisch milieu werd in aanwezigheid van formaldehyde een vaste hars verkregen.
In ammoniakaal milieu verliep de huminezuurvorming normaal.
Er vindt dus blijkbaar eerder additie van NH_3 plaats dan reactie met formaldehyde, terwijl na additie van NH_3 geen reactie met formaldehyde meer kan optreden. Dezelfde verschijnselen werden gevonden bij de autoxydatie van pyrogatechol of chinon. De overeenkomst gaat echter nog verder, want na normaal voltooide polymerisatie zowel in natronalkalisch als in ammoniakaal milieu trad bij toevoeging van formaldehyde geen verharsing meer op, evenmin als er dan nog NH_3 heterocyclisch kon worden gebonden.
Tenslotte deelt Flaig nog mee, dat ook de huminezuren, verkregen bij pH 10 in ammoniakaal milieu, bij sterkere oxydatie (meer dan 4 atomen zuurstof per mol. hydrochinon) werden afgebroken (CO_2-ontwikkeling bij aanzuren). Dit zijn de experimentele gegevens, die door Flaig worden vermeld van de autoxydatie in ammoniakaal milieu. Een bevredigend reactieschema laat zich op grond hiervan nog niet opstellen en de formule van Flaig voor het hierbij verkregen eindproduct moet nog als sterk hypothetisch worden beschouwd.

Uiteraard wordt door Flaig niet gesuggereerd, dat de natuurlijke huminezuren volkomen identiek zijn met de synthetische. Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat in de natuur gemengde polymerisatie optreedt van de daar aanwezige phenolische en chinoide verbindingen, terwijl we in het ligninemolecuul reeds een polymeer hebben met na ontmethylering en oxydatie ortho-chinoide structuurelementen.
Het ging Flaig in de eerste plaats er om het koppelings-

mechanisme op te helderen. Gezien echter de grote overeenkomst in chemische en physische eigenschappen van de synthetische huminezuren en de natuurlijke, is de individualiteit van de verwante monomeren min of meer verloren gegaan in het polymeer en kunnen er, onder enig voorbehoud, uit het onderzoek aan synthetische huminezuren ook conclusies worden getrokken voor de natuurlijke.
Een van deze conclusies is, dat huminezuren niet onveranderd uit de grond kunnen worden geëxtraheerd met loog, tenzij onder afsluiting van zuurstof en dat extractie met verdunde ammonia nog minder toelaatbaar is. Tengevolge van de pH-verhoging wordt immers meer zuurstof uit de lucht opgenomen gepaard gaande met voortschrijdende polymerisatie maar tenslotte overgaande in een afbraak, waarbij CO_2 vrijkomt. Dit is in volledige overeenstemming met de waarnemingen van Mattson bij lignine en humus. Verder zal bij de huminezuurvorming in de natuur waarschijnlijk niet alleen NH_3 een rol spelen bij de vorming van heterocyclische ringsystemen, maar zullen ook andere verbindingen met ongesubstitueerde aminogroepen op dezelfde manier in het macromolecule worden ingebouwd, zoals door Flaig reeds werd aangetoond voor methylamine. Hierbij moet in de eerste plaats gedacht worden aan aminozuren en peptiden.
Schönberg, Moubasher en Mostafa(68) vermelden in hun publicatie bij de dicarbonylverbindingen, die α-aminozuren kunnen afbreken tot aldehyden met één C-atoom minder (zie hoofdstuk II bij de theorie van Enders) ook verschillende chinonen o.a. ortho- en para-chinon. Hierbij stellen zij zich intermediair de vorming van een schiffse base voor, door reactie van de carbonylgroep met de aminogroep. Waksman veronderstelt dat de reactie tussen lignine en eiwitten ook door vorming van een schiffse base tot stand komt (zie hoofdstuk II). Chinoide verbindingen kunnen echter ook nog op een andere manier reageren met aminozuren. Fischer en Schrader(24) vermelden reeds de additie van aminozuren aan chinon, analoog aan de additie van methylamine:



Zo kunnen misschien ook peptiden en eiwitten aan chinonen gebonden worden. Buchholcz(9) voegde chinon toe aan een heet geconcentreerd gelatinesol en verkreeg daardoor een thermisch irreversibel gel. Laatsch c.s.(46) verkregen ook uit chinon en pepton polymere verbindingen op dezelfde manier als uit chinon en ammonia, die, hoewel het N-gehalte hoger was dan in NH_3-chinonhuminezuren, toch de typische eigenschappen van huminezuren hiermee gemeen hadden.
Zo kunnen ook de polypeptideketens, die volgens Laatsch c.s. in actinomycetenhuminezuren voorkomen (zie hoofdstuk II) geaddeerd zijn aan de chinoide stofwisselingsproducten van de actinomyceten tijdens de autoxydatie en polymerisatie van deze

chinonen tot huminezuren, naar analogie van de additie van NH_3 tijdens het polymerisatieproces. De looiende werking van eenmaal gevormde huminezuren wordt vermoedelijk niet veroorzaakt door nucleophiele additie van NH_2-groepen aan een chinoide structuurelement, evenmin als NH_3 nog heterocyclisch kan worden ingebouwd in het eenmaal ontstane polymeer.
In dit verband wordt Mattsons critiek op de bereiding van ligno-proteïnecomplexen door Waksman (zie hoofdstuk III) dubbel belangrijk. Wanneer Waksman inderdaad is uitgegaan van niet-geoxydeerd lignine, en tijdens de bereiding van het complex is autoxydatie opgetreden, dan kunnen tijdens dit autoxydatieproces tegelijkertijd NH_2-groepen van het eiwit op dezelfde manier als NH_3 zijn geaddeerd aan de chinoide structuurelementen van lignine, waarna verdere condensatiereacties en vorming van heterocyclische ringsystemen kunnen zijn opgetreden. Dit is tevens een theoretisch mogelijke verklaring voor het "veroüderingsproces" van lignine-proteïnecomplexen.
Dit zijn allemaal veronderstellingen, waarvoor nog geen bewijzen zijn aan te voeren, maar die min of meer afgeleid kunnen worden uit ervaringen opgedaan bij de synthese van "huminezuren" in het laboratorium. Zo kan ook in dit opzicht het onderzoek aan modelstoffen een steun en een stimulans zijn voor het humusonderzoek en een bijdrage leveren tot een beter begrip van de processen, die zich in de natuur afspelen.

25-10-8-'54

LITERATUUR

1.	Anderson,E and L.Sands	Advances in carbohydrate chemistry Vol.I pg.329-344
2.	Anslow,W.K.and H.Raistrick	J.Chem.Soc.(1939)1446-1457
3.	Bennett,E.	Soil Sci.68 (1949)399-480
4.	Beutelspacher,H.	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk. 57(1952)57-65
5.	Brauns,F.E.	The chemistry of lignin(New-York 1952)
6.	Bremner,J.M. and H.Lees	J.Agric.Sci.39(1949)247-279
7.	Bremner,J.M.	Nature 165(1950) 367
8.	Bremner,J.M.	J.Sci.Food and Agric. 3(1952)497-500
9.	Buchholcz,J.	Koll.Ztschr. 70(1935)200-202
10.	Bu'Lock,J.D.and J.Harley Mason	J.Chem.Soc.(1951)703-712
11.	Diels,O.und R.Kassebart	Ann.d.Chem. 530(1937) 51-67
12.	Eller,W.	Ber.dtsch.chem.Ges.53(1920)1469-1476; Brennst.chem.2(1921)129-133 en 3(1922) 49-52 en 6(1925)55; Ann.d.Chem.431 (1923)133-161 en 442(1925) 160-180
13.	Eller,W e.a.	Ann.d.Chem.431(1923)162-186
14.	Enders,C.	Bioch.Ztschr. 312(1942) 339-348
15.	Enders,C.a.S.Sigurdsson	ibid.313(1942)174-181
16.	Enders, C.	ibid.313(1943)352-371
17.	Enders,C.	ibid.315(1943)259-292
18.	Enders,C.a.S.Sigurdsson	Ber.dtsch.chem.Ges.76(1943)560
19.	Enders,C.	Die Chemie 56(1943)281-285
20.	Enders,C.a.S.Sigurdsson	Bioch.Ztschr. 318(1947) 44-46
21.	Enders,C; M.Tschapek u. R.Glawe	Koll.Ztschr.110(1948)240-244
22.	Ensminger,L.E.a.J.E.Giese-king	Soil Sci. 53(1942)205-209
23.	Erdtman,H.G.	Proc.Roy.Soc.London A 143 177-241; Ann.d.Chem.513 (1934)240-250
24.	Fischer,E.a.E.Schrader	Ber.dtsch.chem.Ges.43(1910)325(Ref (25)
25.	Flaig,W.	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.51(1950)193
26.	Flaig,W.a.H.Beutelspacher	ibid.52(1951)1
26a.	Flaig,W;E.Küster;G.Segler-Holzweiszig;H.Beutelspacher	ibid.57(1952)42-51
27.	Flaig,W.a.H.Otto	Landw.Forsch.Band III. Heft 2; Z.Pfl. ern.Düng.Bodenk.56(1952) 46-49
28.	Flaig,W.a.H.Schulze	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.58(1952)59
29.	Forsyth,W.G.C.	J.Agric.Sci.37(1947)132-138

30. Forsyth,W.G.C. Bioch.J.41(1947)176

31. Forsyth,W.G.C. Chem.Industr.(1948)515-519

32. Forsyth,W.G.C. Bioch.J.46(1950)141-146

33. Fuller,W.H;W.v.Bartholemew a.A.G.Norman Soil Sci.64(1947)143-156

34. Fuller,W.H. Proc.Soil Sci.Soc.Amer.11(1946) 280-283

35. Fuller,W.H. Soil Sci.64(1947)183-197

36. Geoghegan,M.J.a.R.C.Brian Bioch.J.43(1948)5-14

37. Gottlieb,S.a.S.B.Hendricks Proc.Soil Sci.soc.Amerik.10(1945) 117-125

38. Grosheintz,J.M.a.H.O.L.Fischer J.Am.Chem.Soc.70(1948)1479-1484

39. Hahn,G.u.O.Schales Ber.dtsch.chem.Ges.67(1934)1816

40. Horner,L. Vortrag Tag.G.D.Ch.München 1949(Ref. 25)

41. James,T.H.; J.M.Snell a. A.Weissberger J.Am.Chem.soc.60(1938)2084-2093 en 98-105

42. Jodl,R. Brennst.Chem. 22(1942)259

43. Küster,E. Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.57(1952)51-57

44. Küster,E. Landw.Forsch.Sonderh.4(1953)80-82

45. Laatsch,W. Beitrage zur Agrarwissenschaft Heft III(1948)3-23

46. Laatsch,W;L.Hoops u.I.Bauer Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.53(1951)20

47. Laatsch,W;L.Hoops u.O.Bieneck ibid. 58(1952)258-268

48. Laatsch,W.u.E.Schlichting ibid. 62(1953)50-63

49. Mattson,S.a.E.Andersson Lantbr.Högsk.Ann.9(1941)1-73

50. Mattson,S.a.E.Koutler-Andersson ibid. 10(1942)284-332

51. Mattson,S.a.E.Koutler-Andersson ibid. 11(1943)107

52. Mattson,S.a.E.Koutler-Andersson ibid. 11(1943)207-217

53. Mattson,S.a.E.Koutler-Andersson ibid. 12(1944-'45)70-100

54. Norman,A.G."The biochemistry of cellulose, the polyuronides,lignine etc."(London1937)

55. Norman,A.G. Proc.soil Sci.Amer. 7(1942)7-15

56. Norman,A.G.a.W.V.Bartholemew Soil Sci. 56(1943)143-150

57. Oden,S. Koll.Beihefte XI (1922)

58. Pinck,L.A.a.F.E.Allison Science 114(1951)130-131

59. Plotho,O.von Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.51(1950)212-224

60. Plotho, O.von ibid. 55(1951)151-169

61.	Raistrick,H.a.o.	Phil.Trans.Roy.Soc.London B 220 Part.I
62.	Raper,H.S.	Fermentforschung 9 (1928)206-213
63.	Scheffer,F.	Agrikulturchemie Teil C:Humus und Humusdüngung (Stuttgart 1941)
64.	Scheffer,F.u.E.Welte	Naturwissenschaften 37(1950)321-329
65.	Scheffer,F;O.v.Plotho u. E.Welte	Landw.Forsch.1(1950)81-92
66.	Schlichting,E.	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.61(1953) 1-12;97-107;193-204
67.	Schmidt,E.u.M.Atterer	Ber.dtsch.chem.Ges.60(1927)1671
68.	Schönberg,A;R.Moubasher a. A.Mostafa	J.Chem.Soc.(1948)176-182
69.	Schuffelen,A.C.	Maandbl.Landb.Voorl.D.7(1950) 213-218
70.	Schuffelen,A.C.a.G.H.Bolt	Landbouwk.Tijdschr.62(1950)333-338
71.	Schulze,H.a.W.Flaig	Ann.d.Chem. 575(1952)231-241
72.	Simon,K.	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk. A 18(1930) 323
73.	Sowden,F.J.a.H.J.Atkinson	Soil Sci. 68(1949)433-440
74.	Springer,U.	Bodenk.u.Pfl.ern.18(1940)129-167
75.	Springer, U.	Forsch.Dienst Sonderheft 17(1941) 21-23
76.	Springer,U.	ibid. 26-28
77.	Springer,U.	Bodenk.u.Pfl.ern. 32(1943)129-146
78.	Springer,U.a.A.Lehner	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.58(1952)193-231
79.	Springer,U. u. A.Wagner	Z.Pfl.Bau u.Pfl.Schutz 3(1952) 145-172
80.	Swaby,R.J.	J.Soil Sci. 1(1950)182-194
81.	Tenney,F.G.a.Waksman,S.A.	Soil Sci. 30(1930)154 (Ref.31)
82.	Waksman,S.A.	Proc.Intern.soc.Soil Sci.(1926 II) 309-321
83.	Waksman,S.A.	Z.Pfl.ern.u.Düng.A 19(1931)1-31
84.	Waksman,S.A.	"Humus"(Baltimore 1936)
85.	Welte,E.	Z.Pfl.ern.Düng.Bodenk.56(1952)105
86.	Wolfrom,M.L.a.o.	J.Am.Chem.Soc.68(1946)2022-2025; 69(1947)2411-2413; 70(1948)514-522; 71(1949)3518-3523.

25-11-8-'54