

85. Curt Enders und Sigurdur Sigurdsson: Über den Chemismus der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen, V. Mitteil.*): Die einleitende Phase der Huminsäurebildung: Eine Aldolkondensation von Methylglyoxal.

[Aus d. Techn. Hochschule u. d. Wissenschaftl. Station für Brauerei in München.]

(Eingegangen am 10. März 1943.)

In früheren Arbeiten dieser Reihe wurde gezeigt, daß der in der Natur äußerst wichtige Vorgang der Humifizierung, der unter normalen Bedingungen bei den Huminsäuren endet, soweit er von den Kohlenhydraten ausgeht, über Methylglyoxal als zentral gestelltes Zwischenprodukt verläuft. Von diesem außerordentlich vielseitig reaktionsfähigen Ketaldehyd ausgehend, der als Endprodukt einer besonderen Form des mikrobiellen Kohlenhydratabbaus im Boden entsteht, wird unter dem Einfluß der Aminoverbindungen des Bodens die Huminsäurebildung durch eine Melanoidinreaktion eingeleitet. Diese findet ganz allgemein zwischen Stoffen mit freier Carbonylgruppe und Aminoverbindungen statt unter Bildung von amorphen braunen Farbstoffen¹⁾. Über die Rolle der Aminokomponenten bei dieser Reaktion besteht keine Klarheit; daß sie aber einerseits beschleunigend wirken, und daß andererseits Stickstoff in die Endprodukte eingebaut ist, darf jedoch als feststehend betrachtet werden²⁾.

Da die Verknüpfung zweier C-Atome durch Kondensation von Carbonylverbindungen im Sinne der Aldolkondensation, die, wie mehrfach erwiesen, ebenfalls durch Aminoverbindungen (Aminosäuren, Amine, Peptone, Proteine, Piperidin usw.) beschleunigt wird³⁾, als eines der wichtigsten Prinzipien bei der biochemischen Synthese verschiedener Naturstoffe, wie z. B. der Polyene, Terpene usw., schon allgemein anerkannt wird⁴⁾, lag es nahe, bei der Huminsäurebildung ebenfalls eine Aldolkondensation anzunehmen. Diese schon früher⁵⁾ ausgesprochene Ansicht bedurfte jedoch eines experimentellen Nachweises.

Von F. G. Fischer und A. Marschall⁶⁾ wurde schon der beschleunigende Einfluß der Aminosäuren auf die Kondensation des Acetaldehyds gezeigt, jedoch können die hierbei entstehenden dunklen Kondensationsprodukte nicht als Vorstufen der Huminsäurebildung in Betracht gezogen werden, sondern lediglich diejenigen, die aus bzw. über das Methylglyoxal gebildet werden⁷⁾.

* I. Mitteil.: Enders, Biochem. Ztschr. **312**, 339 [1942]; II. Mitteil.: Enders u. Sigurdsson, Biochem. Ztschr. **313**, 174 [1942]; III. Mitteil.: Enders, Biochem. Ztschr. **313**, 352 [1942]; IV. Mitteil.: Enders, Biochem. Ztschr. im Druck.

¹⁾ Vergl. Enders, Kolloid-Ztschr. **85**, 76 [1938]; vergl. auch I. Mitteil., 1. c.

²⁾ Enders u. Theiß, Brennstoff-Chem. **19**, 360, 402, 439 [1938].

³⁾ Dilthey u. Steinborn, Journ. prakt. Chem. [2] **133**, 219 [1930]; Dakin, Journ. biol. Chem. **7**, 49 [1909]; Blanchard, Klein u. McDonald, Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 2809 [1931]; Kuhn u. Hoffer, B. **63**, 2160 [1930], **64**, 1977 [1931].

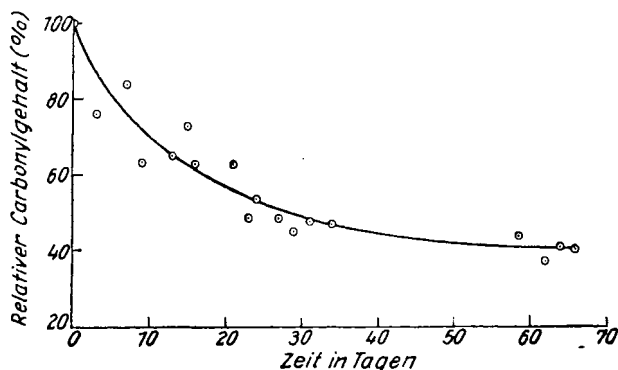
⁴⁾ Raper, Journ. chem. Soc. London **1907**, 1831; Leathers, Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. **1909**, 356; Diels, Ztschr. angew. Chem. **42**, 911 [1929]. Dirscherl, Ztschr. physiol. Chem. **188**, 225 [1930]; Bernhauer u. Irrgang, Biochem. Ztschr. **254**, 434 [1932]; Bernhauer u. Woldan, Biochem. Ztschr. **249**, 199 [1932].

⁵⁾ S. Fußn. *). I. Mitteilung dieser Reihe.

⁶⁾ B. **64**, 2825 [1931].

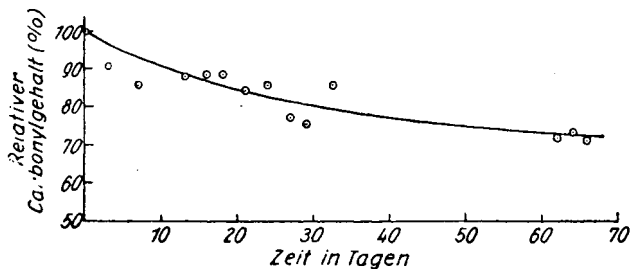
⁷⁾ S. Fußn. *). III. Mitteilung dieser Reihe.

Um die Richtigkeit unserer Vorstellung, daß die einleitende Phase der Huminsäurebildung eine Aldolkondensation ist, zu beweisen, haben wir an zwei Ansätzen von je 5 g Methylglyoxal und 5 g Glykokoll (Abbild. 1) und 5 g Methylglyoxal und 1.25 g Glykokoll (Abbild. 2) in 100 ccm Wasser mit dem allmählichen Fortschreiten der Melanoidinreaktion über 2 Monate die



Abbild. 1. 5 g Methylglyoxal + 5 g Glykokoll/100 ccm.

Abnahme der Carbonylgruppen verfolgt. Der sofort nach der Herstellung der Ansätze gefundene Gehalt an Carbonylgruppen wurde bei der Aufstellung der folgenden Kurven als 100% gesetzt; die später gefundenen Werte in hierauf bezogenen Prozentzahlen ausgedrückt. Wie man sieht, hat während



Abbild. 2. 5 g Methylglyoxal + 1.25 g Glykokoll/100 ccm.

einer Zeit von 66 Tagen der Carbonylgehalt bei 1 um 59% und bei 2 um 28% abgenommen. Ein Kontrollversuch mit Methylglyoxallösung ohne Glykokollzusatz war nicht notwendig, da solche Lösungen auch bei sehr langem Stehen unter den Versuchsbedingungen keine Abnahme der Carbonylgruppen zeigen.

Um die Versuche möglichst unter ähnlichen Bedingungen wie in der Natur durchzuführen, wurden die Reaktionsansätze nicht bei konstanter Temperatur, sondern in sorgfältig verschlossenen Kölbchen im Zimmer stehen gelassen. Durch die hierdurch auftretenden, zum Teil starken Temperaturschwankungen (Winter), sowie die nicht sehr große Genauigkeit der angewandten Bestimmungsmethode nach Strache und

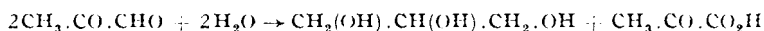
Brandl⁸⁾ (bei Methylglyoxal versagt die Methode nach Ripper⁹⁾) erklären sich die Streupunkte der Kurven.

Da während der Durchführung der Messungen eine CO₂-Entwicklung nicht stattfand, und weder eine Reaktion der Carbonylgruppen mit der Aminosäure unter Bildung von Verbindungen vom Typus der Schiffschen Basen, noch eine Entstehung von Pyrrolringen im Sinne Ruckdeschels¹⁰⁾ die Carbonylgruppenabnahme in dem gefundenen Umfange erklären kann, ist man gezwungen, in der ersten Phase der Kondensation des Methylglyoxals unter Einfluß von Aminoverbindungen, die in der Natur zur Huminsäurebildung führt, eine Aldolkondensation zu sehen.

Über die Art, in welcher dieser Vorgang stattfindet, insbesondere wie der Stickstoff der Aminosäuren in das Molekül der Huminsäuren eingebaut wird, in dem er als integrierender Bestandteil vorliegt, können noch keine Aussagen gemacht werden.

Über eine Abnahme des Carbonylgehaltes von Standard-Melanoidin beim Inkohlen durch längeres Erhitzen auf Temperaturen über 100° und das analoge Verhalten von Lignin bzw. Huminsäuren wurde von Enders und Theiß²⁾ bereits berichtet. Es darf angenommen werden, daß dieser sich noch in der festen Phase vollziehende Vorgang eine Fortsetzung der in obigen Versuchen für die flüssige Phase gefundenen Kondensation darstellt.

Da die Kondensation des Acetaldehyds zu braunen Produkten in Gegenwart von Aminosäuren noch schneller verläuft als die unter gleichen Bedingungen ebenfalls sehr rasche Melanoidinbildung aus Methylglyoxal, könnte angenommen werden, daß letztgenannte Reaktion über Acetaldehyd verläuft. Zwei Mol. Methylglyoxal würden wie früher beim Ablauf der alkoholischen Gärung angenommen wurde, zu je einem Mol. Glycerin und einem Mol. Brenztraubensäure disproportionieren,



und die Brenztraubensäure sodann durch Decarboxylierung in Acetaldehyd übergehen, der somit als die aktive Muttersubstanz auch der Methylglyoxal-Melanoidine anzusehen wäre.

Gegen diesen Reaktionsverlauf ist einzuwenden, daß die aus Methylglyoxal und Aminosäuren unter Bedingungen, die in der Natur vorherrschen, gewonnenen Produkte den Huminsäuren in Eigenschaften und Bruttozusammensetzung vollkommen gleichen, während die Acetaldehydkondensationsprodukte — wie bereits erwähnt — keine Huminsäureeigenschaften besitzen. Außerdem reagiert Brenztraubensäure unter Bildung von Melanoidin viel langsamer als Methylglyoxal⁵⁾. Schließlich müßte vor bzw. gleichzeitig mit der Verfärbung des Reaktionsgemisches Kohlensäure entwickelt werden, was bei niedriger Temperatur genau so wenig der Fall ist wie das Auftreten von Glycerin.

In diesem Zusammenhang möchten wir hervorheben, daß die hier besprochenen, in Gegenwart von Aminoverbindungen aus Acetaldehyd gebildeten Kondensationsprodukte sich von den bekannten unter Einfluß von Alkali entstehenden Aldolharzen wesentlich unterscheiden. Man erhält zwar aus alkalischen Glykokoll-Acetaldehyd-

⁸⁾ Brennstoff-Chem. **7**, 341 [1926].

⁹⁾ Monatsh. Chem. **21**, 1079 [1900].

¹⁰⁾ Vergl. Enders, Fußn. 1.

Lösungen, besonders bei niedriger Alkalikonzentration (unter 0.5%), melanoidinähnliche Produkte, mit Alkali allein jedoch nur die bekannten Harze.

Zur Unterscheidung der aus Acetaldehyd bzw. Brenztraubensäure mit Aminverbindungen gewonnenen Produkte von den Kohlenhydratmelanoidinen bzw. Huminsäuren kann das verschiedenartige Verhalten im ultravioletten Licht benutzt werden. Es wurden folgende Lösungen hergestellt, auf dieselbe Farbtiefe wie eine Brandsche Farblösung¹¹⁾, die im Lange-Colorimeter eine Lichtabsorption von 84% zeigte, gebracht und im ultravioletten Licht betrachtet.

Tafel.

Lösung	Herstellung	Verhalten im auffallenden UV.	Verhalten im durchfallenden UV.
Glucosecaramel	in Wasser gekocht	grünlich	grünlich
Stärkecaramel	in Wasser gekocht	grünlich	grünlich
Methylglyoxal und Glykokoll ...	in Wasser gelöst und erwärmt	grünlich	grünlich
Furfurol und Glykokoll	in Natronlauge gekocht	grünlich	grünlich
Braunkohle	in Natronlauge gekocht	grünlich	grünlich
Torf	in Natronlauge gekocht	grünlich	grünlich
Huminsäure Merck	in Natronlauge gekocht	grünlich	grünlich
Glucose und Glykokoll	in Wasser gekocht	grünlich	grünlich
Mannose und Glykokoll	in Wasser gekocht	grünlich	grünlich
Aspergillus niger	Kulturflüssigkeit *)	grünlich	grünlich
Glucose und Ammoniak	am Rückflußkühler in Wasser gekocht	grünlich	grünlich
Sulfitablauge Fichte	in Wasser gelöst	grünlich	grünlich
Sulfitablauge Buche	in Wassergelöst	grünlich	grünlich
Acetaldehyd und Glykokoll	in Wasser am Rückflußkühler gekocht	braun	grünlich
Brenztraubensäure und Glykokoll	in Wasser am Rückflußkühler gekocht	rotbraun	grünlich

*) Eine 20-proz. Zuckerlösung, die 3.6% Kaliumphosphat, 1.1% Natriumbicarbonat, 20% Pilzmycel und 5% Glykokoll enthielt, und nach Zusatz von 5% Toluol bei 36° 6 Tage gestanden hatte.

Auch das verschiedene Aussehen im auffallenden ultravioletten Licht deutet darauf hin, daß zwischen den Acetaldehyd-Kondensationsprodukten und den aus Kohlenhydraten gewonnenen Melanoidinen bzw. Huminsäuren ein struktureller Unterschied besteht, der offenbar darauf beruht, daß die letzteren von einem C-3-System als Grundbaustein, während die erstgenannten von einem C-2-System ausgehend aufgebaut sind.

¹¹⁾ Vergl. Pawlowski-Doemens, Die Brautechn. Untersuchungsmethoden. Oldenburg, München, Berlin 1938.