

# Nachweis und Isolierung des biochemisch gebildeten Methylglyoxals als Dioxim

Von

Carl Neuberg und Max Scheuer

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie Berlin-Dahlem

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. Oktober 1929)

In dem Gärungsschema<sup>1</sup>, das die Vorgänge bei der alkoholischen Zuckerspaltung erläutert und mit gewissen Abänderungen auch für die Erklärung bestimmter bakterieller Vergärungen von Kohlenhydraten gute Dienste leistet, nimmt das Methylglyoxal eine zentrale Stellung ein. Über die Bildung und den Zerfall der übrigen von der Theorie geforderten Zwischenprodukte des Zuckerabbaues sind wir seit längerer Zeit unterrichtet. Der Nachweis von Azetaldehyd, von Glycerin, in gewissem Umfange auch von Brenztraubensäure ist geführt worden. Wir besitzen Einsicht in die Erscheinungen, die sich bei den verschiedenen Vergärungsformen abspielen<sup>2</sup>. Ferner sind die Teilenzyme (Glykolase, Ketaldehydmutase, Karboxylase) aufgefunden, welche als Komponenten der komplexen Zymase Kohlenstoffkettensprengung, Oxydoreduktion und terminale Dekarboxylierung zuwege bringen.

Außer chemischen Analogien konnte für die Entstehung des Methylglyoxals nur der gewichtige Umstand ins Feld geführt werden, daß in nahezu allen Zellen ein Enzym zugegen ist, das Methylglyoxal weiter verarbeitet, die Ketaldehydmutase<sup>3</sup>.

Die heiß ersehnte Isolierung des Methylglyoxals selber ist nun vor einem Jahre in einwandfreier Weise geglückt. Zuerst zeigten C. Neuberg und M. Kobel<sup>4</sup>, daß bei der Einwirkung von Hefe auf Zucker jener Ketaldehyd der 3-Kohlenstoffreihe gefaßt werden kann, und ein gleiches war dann möglich bei der glykolytischen, zur Milchsäure führenden Zuckerzersetzung durch das Bakterium *Delbrücki*<sup>5</sup> wie durch die tierischen Gewebe<sup>6</sup>. Da die glykolysierenden Organe höherer Pflanzen sowie verschiedene andere Mikroorganismen ebenfalls zur Bildung

<sup>1</sup> C. Neuberg, Monographie, Jena 1913.

<sup>2</sup> C. Neuberg, Zusammenfassung in C. Oppenheimers Handbuch der Biochemie, II. Auflage, Bd. 2, 1924, S. 442.

<sup>3</sup> C. Neuberg und E. Simon, Zusammenfassung in Oppenheimer-Pineussen, Method. d. Fermente, 1929, S. 1311.

<sup>4</sup> C. Neuberg und M. Kobel, Biochem. Ztschr. 203, 1928, S. 463; 210, 1929, S. 466.

<sup>5</sup> C. Neuberg und M. Kobel, Biochem. Ztschr. 207, 1929, S. 232.

<sup>6</sup> M. Vogt, Klin. Wochenschr. 8, 1929, S. 793; Biochem. Ztschr. 211, 1929, S. 17.

des Methylglyoxals befähigt sind, so kann kein Zweifel mehr darüber obwalten, daß Methylglyoxal die lange gesuchte Durchgangsstufe beim biochemischen Abbau der Kohlenhydrate darstellt.

Für den Erfolg maßgebend ist die Wahl des Substrats. Die Reaktion gelingt nicht mit unverändertem Zucker, sondern man muß aus leicht ersichtlichen Gründen von seinem Phosphorsäure-ester ausgehen. Das Prinzip der Isolierung von Methylglyoxal beruht nämlich auf einer Art spektralen Zerlegung der Gesamtzymase. Außer in abbauende Teilenzyme läßt sie sich auf physikalischem Wege in zwei Hauptkomponenten aufteilen, in die hochmolekulare *Apozymase* und die diffusible sowie beschränkt kochbeständige *Kozymase*. Es hat sich nun herausgestellt, daß für die Isolierung von Methylglyoxal als Zwischenprodukt eine möglichst kozymasefreie Apozymase verwendet werden muß. Dieser Ergänzungsstoff wirkt normaliter an der Weiterverarbeitung des Methylglyoxals, sei es zu Weingeist und Kohlendioxyd, sei es zu Milchsäure, mit. Zugleich aber erfüllt die Kozymase (oder das Gemisch von Agentien, das wir als *Koferment* bezeichnen) die weitere wichtige Aufgabe, den Zucker durch Bindung an Phosphorsäure labil zu machen und für den Abbau vorzubereiten. Wenn man also Methylglyoxal ansammeln will, darf man nur ein Fermentsystem verwenden, das frei von Kozymase oder arm daran ist. Da Apozymase ihrerseits Zucker erst nach der Herrichtung, d. h. als bereits phosphoryliertes Kohlenhydrat, angreift, muß man behufs Methylglyoxalanhäufung als Substrat phosphorylierten Zucker, Hexosediphosphat, benutzen.

Bisher ist die Isolierung des Methylglyoxals von Neuberger und Kobel in der Weise vorgenommen worden, daß der aus dem Ausgangsmaterial gebildete Ketonaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin abgeschieden wurde. Dieses Reagens fällt in der Kälte augenblicklich die Di-karbonylverbindung, jedoch erst nach vielen Stunden den Zucker bzw. Zuckerphosphorsäure-ester. Das Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon des Methylglyoxals ist ein leicht umkristallisierbares und sehr charakteristisches Derivat des Ketonaldehyds der 3-Kohlenstoffreihe.

Angesichts der außerordentlichen Bedeutung, die man der Auffindung und dem einwandfreien Nachweise des Methylglyoxals für die Erkenntnis der biochemischen Zuckerumsetzungen beizumessen hat, war es eine nicht gleichgültige Aufgabe, auf einem zweiten Wege die Entstehung des Methylglyoxals sicherzustellen. Neuberger und Kobel haben (l. c.) bereits kurz angegeben, daß für diesen Zweck auch die Isolierung des Ketonaldehyds in Form seines Di-oxims möglich ist.

An einem neuen Beispiele, nämlich der Zuckerspaltung durch das Bakterium *lactis aerogenes*, haben wir die Di-oxim-methode geprüft und bewährt gefunden. An

anderer Stelle wird über die Bilanz der Zuckerspaltung durch jenen, den Milchsäurebakterien nahestehenden Erreger berichtet und zugleich beschrieben werden, daß auch in diesem Falle die Methode zum Ziele führt, die sich auf Heranziehung des erwähnten dinitrierten Phenylhydrazins stützt.

Im folgenden sei die Isolierung des Methylglyoxals als Di-oxim aus solchen Gäransätzen geschildert.

Das Bakterium *lactis aerogenes* wurde auf Fleischextraktbouillon bzw. auf Fleischextraktagar plus Bierwürze gezüchtet, in bekannter Weise unter Wahrung der Sterilität abgeschwemmt, abzentrifugiert sowie mit physiologischer Kochsalzlösung und dann mit Wasser bis zur Zuckerfreiheit gewaschen. Die geerntete Bakterienmasse, deren Trockengewicht 15 g ausmachte, wurde mit 250 cm<sup>3</sup> reinem Azeton 15 Minuten in der Reibschale verrieben, abgesaugt, von neuem mit 300 cm<sup>3</sup> wasserfreiem Azeton 10 Minuten lang durchgearbeitet, abgenutscht und nunmehr wiederum in einer Reibschale mit 200 cm<sup>3</sup> über Natrium entwässerten Äthers verrührt. Nach dem Absaugen und Auswaschen mit Äther erhält man ein staubfeines, hellgraues Pulver. In diesem so zubereiteten Bakterienmaterial ist die Kozymase, sofern solche in extrahierbarer Form überhaupt in der Mikrobe vorhanden ist und die gewöhnlichen Eigenschaften besitzt, hinreichend geschwächt; das Material verhält sich jedenfalls in bezug auf die Methylglyoxalbildung aus Hexosediphosphat wie ein Apozymasepräparat, wenn man nicht zuviel des Bakterienpulvers anwendet. Gute Resultate erzielt man folgendermaßen:

1000 cm<sup>3</sup> 2.91%ige Magnesium-hexose-di-phosphatlösung wurden mit 10 g der Azeton-Trocken-Bakterien sowie mit 10 cm<sup>3</sup> Toluol 48 Stunden im Brutschrank bei 37° unter häufigem Umschütteln digeriert. Nach dieser Zeit wurde das Gemisch zentrifugiert, 660 cm<sup>3</sup> klares Zentrifugat wurden ohne weiteres, d. h. ohne vorhergehende Enteiweißung, mit 5 g festem neutralem Hydroxylamin-sulfat versetzt und einen Tag im Thermostaten belassen. Es folgt Bindung des Ketonaldehyds an das Hydroxylamin, von dem vielleicht auch ein Teil von dem nebenher vorhandenen Zucker mit in Beschlag belegt wird. Die Flüssigkeit wurde alsdann mit Natriumsulfat gesättigt und erschöpfend mit Äther extrahiert.

Die Hauptmenge der Di-oxims findet sich bereits in den ersten beiden Auszügen vor, die über frisch geglühtem Glaubersalz zu trocknen sind, unter gleichzeitiger Zugabe von Kalziumkarbonat, das Entsäuerung veranlaßt, ohne daß es zur Bildung von Kalziumsalz des Di-oxims kommt.

Der erste Auszug wurde am Bi-rektifikator vom Lösungsmittel befreit, worauf der abgetriebene Äther übrigens für die späteren Ausschüttelungen gebraucht wurde.

Da zur Beseitigung von Emulsionen bei der Ausätherung etwas Äthylalkohol zugesetzt gewesen war, hinterblieb das Me-

thylglyoxal-di-oxim zunächst in einer alkoholischen Lösung. Verdunstete man diese im Exsikkator über Phosphorpentoxyd, so erstarrte der Rückstand bald zu einem hellgelb gefärbten Kristallbrei, der im wesentlichen aus der erwarteten Verbindung bestand.

Die so gewonnene feste Substanz wurde aus möglich wenig heißem Wasser unter Zugabe von Knochenkohle umkristallisiert, wobei sich das Di-oxim rein weiß abschied und bereits den richtigen Schmelzpunkt 157° (unkorr.) aufwies.

Für die Analyse wurde die Substanz noch einmal in gleicher Weise umkristallisiert.

4·235 mg Substanz gaben 5·500 mg CO<sub>2</sub> und 2·280 mg H<sub>2</sub>O  
 2·310 mg " " 0·547 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (757 mm, 24°, 50% KOH).  
 C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 35·29, H 5·92, N 27·44%.  
 (102). Gef. C 35·42, H 6·00, N 27·60%.

Die Rohausbeute an Methylglyoxal-di-oxim belief sich, unter Hinzurechnung auch des Ertrages von den späteren Extraktionen, auf 0·87 g. Durch einmalige Umkristallisation wurden daraus 0·53 g analysenreine Substanz gewonnen. Wie aus den Arbeiten von Neuberger und Kobel hervorgeht und auch für die Umsetzung mit Enzym von *B. lactis aerogenes* in der oben angekündigten späteren Mitteilung über die Bilanz näher dargelegt werden soll, wird das Ausgangsmaterial nur unvollkommen dephosphoryliert. Lediglich die dabei primär in Freiheit gesetzte und abgebaute Menge Kohlenhydrat kommt als Muttersubstanz des Methylglyoxals in Betracht.

Es zeigt sich damit, daß auch die Di-oxim-methode annehmbare Resultate liefert.

Hinzuzufügen ist folgendes: Beim Umkristallisieren des rohen Di-oxims fällt die reine Verbindung nicht vollständig aus; ihren in Lösung gebliebenen Anteil kann man sehr weitgehend in Gehalt des inner-komplexen Nickelsalzes abscheiden. Diesem kommt die Formel Ni(C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>)<sub>2</sub> zu<sup>7</sup>, und die Analysen haben ergeben, daß in ihm analysenreine Substanz vorlag.

0·1160 g Substanz lieferten 0·0334 g NiO.  
 NiC<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>. Ber. 22·52% Ni.  
 (260, 7). Gef. 22·62% Ni.

Dabei ist zu bemerken, daß die Fällung des aus dem Gäransatz gewonnenen Methylglyoxal-di-oxims durch Nickelazetat (*m*-NiSO + 3 *m*-Na-azetat) in ganz typischer Weise erfolgt.

Zunächst entsteht ein rot-violetter Niederschlag, der beim Erwärmen auf dem Wasserbade gelb-rot wird, infolge des Überganges der Substanz in eine stabilere isomere Modifikation.

Somit haben wir auf eine neue Weise und auf einem von dem bisherigen Vorgehen abweichenden

<sup>7</sup> L. Tschugajew, Chem. Centr. 1911, I, S. 871; G. Ponzio, Chem. Centr. 1922, I, S. 256.

den Weg den Beweis erbracht, daß bei der Spaltung des Zuckers durch das Bakterium lactis aerogenes Methylglyoxal in reichlicher Menge gebildet wird. Dieser Ketonaldehyd wird nicht durch ein Abfangmittel fixiert, sondern lediglich durch Ausschaltung eines Ergänzungsstoffes für die komplexe Zymase, des Kofermentes, vor der weiteren Umwandlung bewahrt. Von diesem Methylglyoxal leiten sich bei Benutzung unvorbehandelter Erreger die bekannten Zuckerspaltungsprodukte Milchsäure, Essigsäure und Äthylalkohol ab, die in der Norm durch den Bazillus erzeugt werden.

---