

TELMA	Band 24	Seite 173 – 179	4 Abb.	Hannover, November 1994
-------	---------	-----------------	--------	-------------------------

## Wie können physiologische Wirkungen von Huminstoffen ausgelöst werden?

How can humic substances set off physiological effects?

WOLFGANG ZIECHMANN\*)

### ZUSAMMENFASSUNG

Eine gewöhnlich hilfreiche Ursache-Wirkung-Beziehung als heuristisches Prinzip zur Interpretation biochemischer Wirkungen wird bei Huminstoffen seltener zur Anwendung kommen, da diese keine reproduzierbare chemische Konstitution haben, von der sich a priori derartige Effekte ableiten lassen.

Dennoch gehen von diesen Naturstoffen dezidierte wie auch recht unspezifische biochemische Wirkungen aus.

### SUMMARY

In the field of humic substances there is no good use of the common heuristic principle of biochemical cause/impact interpretation, because it is impossible to reproduce their chemical constitution which could be made responsible for such effects.

There is, on the other hand, no doubt that these natural substances are able to bring about as well specific as quite unspecific biochemical effects.

---

\*) Anschrift des Verfassers: Prof.Dr.W.ZIECHMANN, Arbeitsgruppe Bodenchemie, Georg-August-Universität, Von-Siebold-Str. 2, 37075 Göttingen

Die im Bereiche der Biochemie übliche Ursache-Wirkung-Beziehung wird bei Huminstoffen in Frage gestellt, weil Huminstoffe keine reproduzierte chemische Konstitution besitzen und für nachweisbare Wirkungen daher keine erkennbaren, d.h. konstitutionell bedingten Ursachen auszumachen sind. Die Frage lautet daher hier: Wie können dezidierte Wirkungen von einem Substrat ausgehen, wenn dieses keine reproduzierbare chemische Struktur hat?

Nun steht zweifelsfrei fest, daß die verschiedensten Arten der Huminstoffe recht unterschiedliche und signifikante physiologische Wirkungen auszulösen vermögen.

Aber sind es

- (1) spezifische Wirkungen, also solche, die typisch für die Stoffklasse "Huminstoffe" und nur von dieser ausgelöst werden, oder
- (2) Wirkungen allgemeiner Natur, welche daher mehr zufällig mit dem Status der Huminstoffe verknüpft sind?

Sind sie damit also auch von anderen Stoffen zu realisieren ?

Für eine allgemeine Diskussion der von Huminstoffen ausgelösten Wirkungen kann von folgendem Schema ausgegangen werden (Abb. 1)

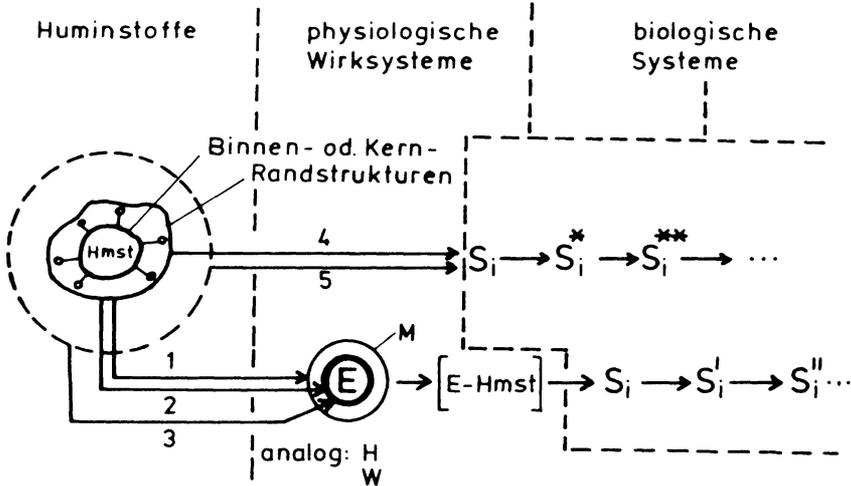


Abb. 1:

Wirkungsmöglichkeiten der Huminstoffe auf biologische Systeme

Possibilities on impacts of humic substances within biological systems

1, 2, 3 Spezifische Wirkungsmöglichkeiten via Enzyme

4, 5 Unspezifische Wirkungsmöglichkeiten

Hmst Huminstoffe H Hormone

E-Hmst Enzym-Huminstoff-Komplex W Wirkstoffe

E Enzyme

S biologisches System

Spezifische Wirkungen auf ein System S setzen eine spezifische Struktur der auslösenden Komponente voraus (4, 5 in Abb.1). Hier werden diese Wirkungsmöglichkeiten durch bestimmte, aber letztlich zufällig angeordnete Strukturmerkmale der Huminstoffe bedingt:

- Funktionelle Gruppen,
- signifikante Verteilung bestimmter Molekülteile; etwa
  - alipathische,
  - aromatische,
  - chinoide,
  - heterocyclische,
- signifikante Verteilung von  $\xi$ -Überschuß- und  $\xi$ -Defizit-Bereichen im Molekül.

Unspezifische Wirkungen werden in der Regel durch zwischenmolekulare Kräfte involviert:

VAN DER WAALS-Kräfte	H-Brücken,
Entropie-Kräfte	hydrophobe Wechselwirkungen,
elektrostatische Kräfte	$\xi$ -Donator-Acceptor-Wechselwirkungen

Nun eröffnen sich trotz der ungünstigen Voraussetzungen für Huminstoffe doch Möglichkeiten spezifische Wirkungen hervorzurufen wenn diese nämlich mit Enzymen in Wechselwirkungen zu treten vermögen (1, 2 und 3 in Abb. 1), um so indirekt signifikante Veränderungen an einem biologischen System einleiten zu können:



In vielen Fällen stellt sich diese Wechselbeziehung in der ersten Phase als Bildung eines Enzym-Huminstoff-Komplexes (E-Hmst) dar.

Nachdem an mehr als 40 Enzymen Wechselwirkungen mit Huminstoffen festgestellt wurden, sei an einigen Beispielen dieser komplexe Tatbestand erläutert (ZIECHMANN, 1980).

#### A m i n o p e p t i d a s e K

Dieses peptidolytische Enzym aus dem Pilz *Tritirachium album* wird durch Huminstoffe irreversibel blockiert, dabei wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{m \text{ a x}}$  herabgesetzt.

Als Ursache für die Blockierung konnte neben einer direkten Enzym-Inhibitor-Beziehung auch die Möglichkeit eines Zinkaus-tausches nachgewiesen werden. Zink stabilisiert das Enzymprote-in (PFLUG 1979).

#### M a l a t d e h y d r o g e n a s e

Die Inhibierung der Malatdehydrogenase (aus Schweineherz-Mitochondrien) durch Huminstoffe ist sehr ausgeprägt; die  $K_1$ -Werte liegen bei maximal ca. 30 $\mu$ g/ml. Die Bindung zwischen beiden Komponenten ist reversibel.

Aus diesem Befund ließ sich eine Lokalisierung der Huminstoffe am Bindungsort herleiten. Die Huminstoffe werden offenbar außer-

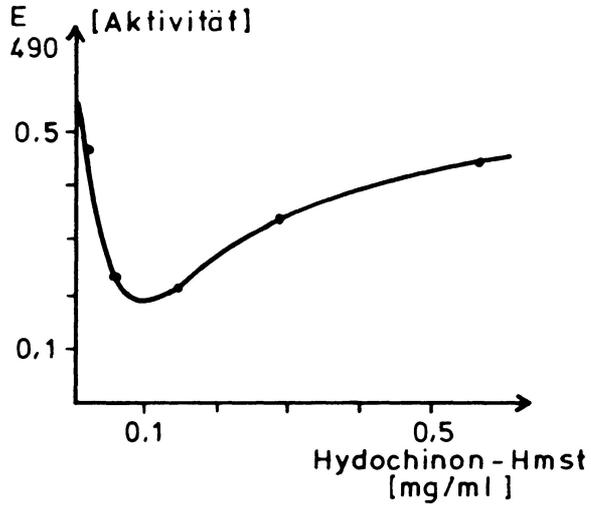


Abb. 2  
 Verlauf der Cellulaseaktivität in Gegenwart steigender Huminstoffkonzentrationen  
 Curve of the activity of cellulase in the presence of increasing concentrations of humic substance

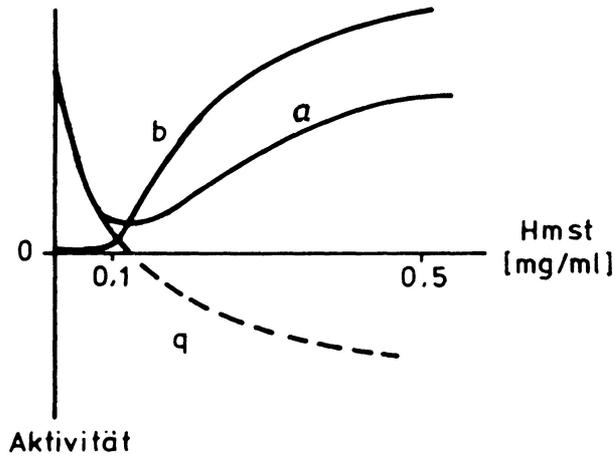


Abb. 3  
 Zur bifunktionellen Wirkungsweise eines Huminstoffs  
 The bi-functionally kind of impact of a humic substance

halb, jedoch in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle, für das Substrat reversibel gebunden.

Da die Bindung des Inhibitors in der Rückreaktion mit NADH/H<sup>+</sup> als Substrat zunehmend irreversibel wird, waren Wechselwirkungen zwischen den Huminstoffen und einem der beiden Coenzyme mögliche Ursachen dieses unterschiedlichen Effektes.

### C e l l u l a s e n

Eine Cellulase aus *Oxyporus spec.* ( $K_1 = 0,11$  mg/ml) weist für den Verlauf der Dosis-Wirkungskurve eine interessante Besonderheit auf (Abb. 2).

Oberhalb einer Huminstoffkonzentration von 0,15 mg/ml nimmt die Exzymaktivität wieder deutlich zu, die Hemmung wird also geringer. Dieser bimodale Verlauf der Wirkung wurde bisher für Huminstoffe noch nicht beschrieben und zeigt möglicherweise einen Sachverhalt, welcher durch eine bifunktionelle Wirkung des fraglichen Huminstoffs bestimmt wird (Abb. 3).

Kurve a entspricht der üblichen konzentrationsabhängigen Inhibitorwirkung der Huminstoffe. Diese Kurve wird überlagert durch eine die Förderung der Enzymaktivität anzeigende Kurve b, die bei geringen Huminstoffkonzentrationen noch nicht wirksam wird. Die dargestellte Kurve ist mithin die Resultierende dieser gegenläufigen Effekte.

Nach diesem Modell muß angenommen werden, daß der Hydrochinon-Huminstoff in der Lage ist, an zwei verschiedenen Positionen im Enzym-Wirkungsgefüge anzugreifen.

Für ein Enzym der Peroxidase-Gruppe aus Meerrettich (EC 1.11.1.7) konnten die schon mehrfach beschriebene Inhibierung durch Huminstoffe, aber auch die Bildung eines Huminstoff-Enzym-Komplexes nachgewiesen werden.

Gerade bei diesem Enzym wurden mehrere Ansatzmöglichkeiten für eine solche Wechselwirkung erkannt (Abb. 4).

Verschiedene Amylasen werden von Huminstoffen gehemmt, wobei die Michaelis- wie die Inhibitor-Konstante verändert werden. Die Hemmung ist sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv. Die Harnstoff-Amidohydrolase (Urease) wird durch Huminstoffe nicht-kompetitiv gehemmt.

### DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die Erkenntnisse über die vielfältigen von Huminstoffen indizierten Wirkungen haben nur dann eine weiterführende Qualität, wenn sie mit deren strukturellen Merkmalen (s.o.) in irgendeinen Zusammenhang gebracht werden können. Gerade weil Huminstoffe keine für alle Partikel geltende und reproduzierbare Struktur besitzen, muß diese Forderung mit Nachdruck erhoben werden.

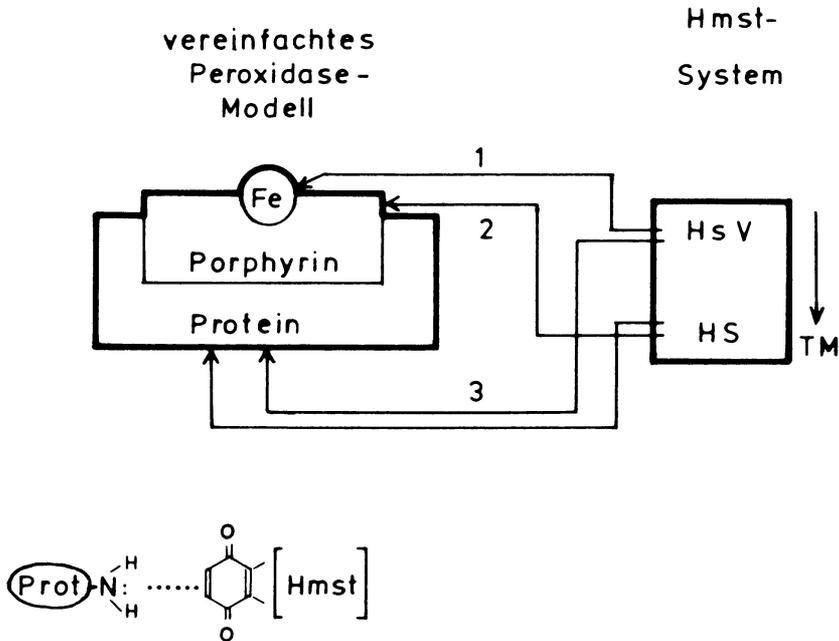


Abb. 4

Zur Wechselwirkung Peroxidase-Huminstoff

Interaction between peroxydase and humic substance

- |   |                 |   |
|---|-----------------|---|
| 1 | Komplexierung   | UV-vis-Spektren                                 |
| 2 | -DAK            | . Porphyrine sind -Donatoren<br>. Hs: -Acc. HsV |
| 3 | Tertiärstruktur |   |

Die hier aufgeführten Beispiele lassen solche Beziehungen erkennen und können damit einen Beitrag zur Erklärung des allgemeinen Verhaltens der Huminstoffe leisten.

Huminstoffe vermögen einen Austausch von Metallen im Enzym zu induzieren. Dies' gilt für die  $Zn^{2+}$ -Ionen der Aminopeptidase K wie für die  $Fe^{3+}$ -Ionen der Peroxidase.

So kann der Zusatz von  $Zn^{2+}$ -Ionen eine durch Huminstoffe realisierte Hemmung weitgehend eliminieren.

Im UV-Spektrum der Peroxidase (bzw. von deren Porphyrinsystem) werden 2 Maxima um 500 und 650 nm beobachtet, die entsprechend der Ligandenfeldtheorie auf die Anregung von d-Elektronen des Eisens zurückgehen. Wechselwirkungen treten hier mit den Huminsäure-Vorstufen-Fractionen auf.

Das im gleichen Spektrum bei 400 nm liegende sehr intensive Maximum (Soret- oder  $\pi$ -Bande) ist auf einen n-n\*-Übergang der Elektronen des Porphyrinsystems zurückzuführen. Auch hier ist

eine Veränderung und damit Wechselwirkung mit Huminstoffen zu erkennen. Auffallend ist hier wieder, daß recht abweichende Wirkungen von den einzelnen Huminstoff-Fraktionen ausgehen.

Insgesamt ergeben sich für die Veränderungen der genannten Peroxidase durch ein natürliches Huminstoffsystem folgende Ansätze (Abb. 4):

Die mögliche Veränderung der Tertiärstrukturen von (Enzym-) Proteinen durch chinoide Strukturelemente der Huminstoffe ist offenbar eine Schlüsselreaktion für deren Einwirkungsmöglichkeiten. Eine reproduzierbare Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten  $K_m$  einer  $\beta$ -Amylase von den phenolischen OH-Gruppen verschiedener Huminstoffe läßt einen weiteren spezifischen Eingriff derselben erkennen.

Am umfassendsten stellt sich dieser Effekt bei solchen Enzymen dar, die das  $NAD^+$ - bzw.  $NAD/H^+$ -System als Coenzym enthalten, da hier von einer Wechselwirkung zwischen diesen und Huminstoffen auszugehen ist (ZIECHMANN, 1980).

#### LITERATUR

- GRIESER, K. (1988): Wechselwirkungen zwischen Huminstoffen und Peroxidase.- Unveröff.Diplomarbeit, Univ. Göttingen: 66 S., 37 Abb.; Göttingen.
- GRIESER, K. & ZIECHMANN, W. (1988): Wechselwirkungen zwischen Huminstoffen und Peroxidase.- Mitt.dt.bodenkd.Ges. 56: 153-159; Göttingen.
- PFLUG, W. (1979): Über die Hemmung der Aminopeptidase K (aus *Triticachium album* Limber) durch Huminstoffe.- Z.Pflanzenern., Düng. u. Bodenkd., 142: 290-298; Berlin u. Hamburg.
- ZIECHMANN, W. (1980): Huminstoffe.- 408 S.; Weinheim (Verlag Chemie).

Manuskript eingegangen am 6.April 1994