

SOBRE L'OBTENCIÓ DEL METILGLIOXAL EN LA DESCOMPOSICIÓ DEL SUCRE MITJAN- ÇANT EL SUC DE LA MACERACIÓ DEL LLEVAT

per

C. PI-SUÑER I BAYO

Com s'ha demostrat repetidament, el metilglixal és una etapa de la desmolisi en molts processos glucolísics. Així s'ha vist en la descomposició del sucre produïda pel llevat (1), pels bacils làctics pròpiament dits (2) i pel «*Bacterium lactis aerogenes*» (3). Amb el mateix èxit s'ha observat la seva formació en els processos de desmolisi produïts per cèl·lules animals (4).

Gràcies a un mètode de gran senzillesa, pot aïllar-se el metil-glixal produït amb gran quantitat, arribant fins i tot al 100 per 100 de les possibilitats teòriques. D'aquesta manera s'ha aconseguit una demostració pràctica de com aquest aldehid cetònic de tres àtoms de carbon representa, en efecte (en la descomposició del sucre), el paper importantíssim que solament d'una manera teòrica i indirecta (partint del seu atac fàcil i producció consegüent d'àcid làctic), se li havia atribuït.

Com ja hem indicat, s'ha investigat el sistema glucolísic existent en els llevats alts i baixos, en el llevat baix dessecat i en el preparat obtingut tractant-lo amb alcohol-èter.

Essent la fermentació alcohòlica un prototipus del procés de descomposició del sucre, era molt interessant, per a completar les experiències descrites, observar si el suc que resulta de la maceració del llevat dóna lloc, també, a la producció de metilglixal.

En el preparat amb llevat baix, seguint les indicacions d'A. v. Lebedew, es troba encara tot el complex ci-màssic de la cèl·lula, i és possible de produir, amb aquesta solució de ferment, una veritable fermentació alcohòlica. Ens interessava d'investigar si els resultats obtinguts amb cèl·lules actives, alterades o mortes, s'observaven també, en la *fermentació sense cèl·lules*; ja que en el cas afirmatiu, es tenia una clara demostració de l'absolut paral·lelisme dels processos de fermentació amb cèl·lules i sense.¹

Des de fa molt temps Neuberg i Kobel sostenen que s'ha de considerar la formació de metilglixal com a resum i principal reacció del procés de glucolisi. Mentre no disposem d'una base experimental on recolzar la suposada aparició d'un cos intermedi entre l'exosafosfat que es descomposa i el metilglixal, primer dels compostos de tres àtoms de carbon formats, podem anomenar aquest enzima, que causa el pas de cossos de la sèrie C₆ a la C₃, *glucolasa*.

El mecanisme de producció de metilglixal, en la fermentació acèl·lular o en la fermentació amb cèl·lules és idèntic, siguin aquestes actives o atenuades.

En els experiments que anem a descriure, portats

1. Com es desprèn de tot el que segueix, aquestes esperances han estat absolutament confirmades. Del resultat satisfactori, ben típic i important, podem deduir la injustícia dels atacs que, recentment, s'han intentat contra la teoria d'E. Buchner, tan completa i fonamentada en totes les seves parts. La deficiència dels arguments adduïts contra l'existència d'una veritable fermentació sense cèl·lules ha estat també demostrada per camins diversos i d'una manera convincent per A. J. Klyuyver i A. P. Struyk (*H.*, 170; 102; 1927), A. v. Lebedew (*H.*, 173, 89; 1927), i K. Iwasaki i O. Meyerhof (*Biochem. Zeits.*, 203, 252; 1928).

a cap amb el suc resultant de macerar el llevat, vàrem obtenir la formació del metilglixal d'una manera senzilla i sense dificultats, arribant, segons s'ha dit, les quantitats obtingudes, a un 100 per 100 del que era teòricament possible. El llevat, fou sempre baix (de la casa Patzenhofer).

Dels treballs de Neuberg i Kobel sobre el mecanisme d'aquesta reacció, es dedueix el següent:

Per a la producció dels metilglixal n'hi ha prou amb l'anomenada apocimassa, o sigui aquella part del complex cimàssic que ha estat totalment o parcialment privada del coferment. Aquesta substància encara conté enzima glucolísic; li falta, en canvi, la comutasa, o sigui el ferment necessari per a l'evolució ulterior de l'aldehid cetònic. Però, per a l'atac de la primitiva molècula de sucre, cal, també, el concurs d'una cocimassa (productora del compost fosfòric del sucre). Per tant, en les nostres experiències, haguérem de partir d'aquest compost fosfòric ja format prèviament, car l'apocimassa sola no és capaç de portar a cap la fosforització del sucre; però sí la descomposició del difosfat d'exosa format prèviament.

Amb tot, els mateixos investigadors han vist que no és indispensable la separació del coferment mitjançant determinats mètodes, sinó que n'hi ha prou en alterar la relació existent entre les quantitats d'apo i cocimassa, per mitjà d'una dilució suficient, amb la qual aquella s'inutilitza en major o menor grau.

No anirem a entretenir-nos discutint si tot això es deu a factors purament físics¹ (variació de la disper-

1. Aquesta hipòtesi concorda amb el fet, demostrat experimentalment ja fa temps per A. v. Lebedew (*Ann. Institut Pasteur*, 25, 689; 1911), de què la dilució altera d'una manera essencial la part col·loidal de la cimassa, igualment que la cocimassa que existeix, en no molt grans quantitats, en el llevat, i que representa l'agent que limita la glucolisi final.

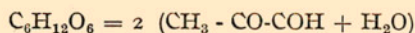
sió), o a què la cocimassa canvia el substràtum que l'absorbeix, o a un procés bioquímic (un xic com afavorint l'acció dels enzimes acompanyants (5) que ataquen més fàcilment i ràpida la cocimassa que l'apocimassa), o simplement a la disminució de concentració d'aquella, la conseqüència immediata de la qual seria que la cocimassa, més fàcilment difusible, no es trobaria (almenys en el focus de la reacció), en quantitat suficient, mentre l'apocimassa, no dialitzable, existiria en gran quantitat.

Poden emetre's encara moltes hipòtesis sobre l'alteració de les relacions existents entre les diferents parts del complex cimàssic productor de la glucolisi, però no és tampoc aquest el lloc indicat per a discutir si la cocimassa necessària per a la formació del compost fosfòric de l'exosa, i la de la dismutació, són distintes, homòlogues o idèntiques.

El suc emprat en les meves experiències ha estat diluït amb gran quantitat d'aigua, lliure de gèrmens, i a la que s'afegia toluol com antisèptic. També he experimentat, amb el líquid obtingut, després de separar el coferment per una diàlisi estèril. El resultat fou pràcticament el mateix en ambdós líquids, aconseguint-se en els dos la separació del metilglioxal.

N'hi havia prou, per tant, fent la investigació definitiva, amb una sola de les dues varietats. Gràcies a la seva major senzillesa, escollirem el suc de maceració molt diluït i no dialitzat.

El metilglioxal, acumulat per la descomposició del difosfat d'exosa, fou precipitat en forma de 2-4-dinitrofenilbishidrazona, i s'obtingué una quantitat d'aldehid cetònic que s'acosta molt al màxim teòricament possible. Hem d'indicar que, per destrucció d'una molècula de sucre, se'n formen dues d'hidrat de metilglioxal



PART EXPERIMENTAL

Abans d'entrar de ple en la descripció de la part pràctica de les nostres recerques, exposarem, en línies generals, el procediment que seguirem i que el lector pot trobar, amb tot detall, en els treballs esmentats de Neuberg i Kobel.

L'experiència completa determina : l'àcid fosfòric alliberat, la quantitat d'exosafosfat que encara queda en el líquid de l'experiment, el metilglioxal format i la possible producció d'altres hidrats de carbon.

Àcid fosfòric. — Al principi i a la fi de l'experiència es pren una mostra del líquid (un cop precipitades les albúmines amb àcid tricloracètic) i s'hi determina el fòsfor colorimètricament, segons el mètode de K. Lohmann i L. Jendrassik (6).

Com que en la solució de cimassa sola també té lloc, encara que d'una manera limitada, una certa descomposició de fosfats inorgànics, es determina igualment el seu contingut en fòsfor, i resta el resultat del de l'experiència principal.

Exosafosfats existents encara en interrompre l'experiència. — L'hidrolisi de l'exosadifosfat pot donar lloc, o bé a un exosamonofosfat, o bé a productes lliures de fòsfor.

Per a aïllar els exosafosfats totals (di i mono) es tracta, de seguida d'acabada l'experiència, una part alíquota del líquid amb alcohol absolut, que precipita quantitativament els exosafosfats junt amb els fosfats inorgànics.

Com, a més, precipiten parts constituents dels ferments, es fa la mateixa precipitació en l'experiència control (sense exosadifosfat) i es resta d'aquella la quantitat obtinguda.

El precipitat, es dissol en poca aigua, i en una part al·lquota de la solució es determina el fòsfor inorgànic i orgànic. La quantitat gran de solució restant es tracta amb acetat de bari en excés, i s'alcalinitza amb unes gotes d'aigua de barita; després es fa circular un corrent d'àcid carbònic fins a decolorar la fenoftaleïna. A les divuit hores es centrifuga el precipitat, es calenta i es torna a precipitar, i es filtra en calent. En el líquid queda el monofosfat d'exosa, en el precipitat el difosfat i els fosfats inorgànics. Per tant, el contingut en fòsfor que s'obté, després d'incinerar el líquid amb perhidrol i àcid nítric, procedeix de l'exosamonofosfat.

Altres hidrats de carbon. — Es determinen en el filtrat de la precipitació amb alcohol dels exosafosfats.

S'evapora fins a dessecació, es renta tres cops amb aigua i s'evapora de nou fins a petit volum. En aquesta solució es determina el poder reductor segons Lehmann, i el contingut en fòsfor orgànic i inorgànic. De la mateixa manera es tracta el filtrat alcohol·lic de les experiències control, i les quantitats obtingudes (més petites que en la principal) es resten d'aquella, i s'obté així la quantitat de substàncies reductores i d'esters alcohol·lics de l'àcid fosfòric que provenen de l'exosadifosfat.

Com que seria possible que una part del metilglioxal format passés a productes reductors, cal observar, en experiències anàlogues a la descrita, si el poder reductor és el mateix en els controls amb ferment sol i en els del metilglioxal (sense exosadifosfat).

Si ho és, vol dir que el poder reductor obtingut s'ha d'atribuir al sucre.

Metilglioxal. — La precipitació es fa, després de separar les albúmines pel tractament amb àcid tricloracètic, amb solució clorhídrica de 2-4-dinitrofenilhidrazina.

La bis-hidrazona produïda diposita bé, i després

d'abandonar-la durant dues o tres hores a la temperatura de l'habitació, es centrifuga i es renta el residu, successivament, amb àcid clorhídric diluït, aigua i dues vegades amb alcohol. Per al seu anàlisi, es cristal·litza, primer, en piridina i, després, en nitrobenzèn.

Les solucions control (solament amb ferment) han de tractar-se de la mateixa manera, per veure si donen també precipitat.

A més, l'obtingut en les solucions a les quals al principi se'ls ha afegit metilglioxal pur, és molt interessant, per a donar-nos la quantitat d'aquest que ha sofert el procés de la dismutació en el transcurs de l'experiència. I, per tant, aquest metilglioxal dismutat haurem d'afegir-lo a la quantitat de bishidrazona dipositada, per a tenir el seu volum total.

Aquesta determinació es fa amb paranitrofenilhidrazina en solució acètica, dessecant el precipitat obtingut a 120°.

Resum de les experiències portades a cap

Experiències amb suc frescos (resultants de macerar el llevat). Prepararem els líquids següents:

1. 40 cc. de suc.
200 cc. d'una solució d'exosadifosfat magnèsic al 7'013 per 100.
960 cc. d'aigua.
12 cc. de toluol.
2. 10 cc. de suc.
290 cc. d'aigua.
3 cc. de toluol.
3. 5 cc. de suc.
50 cc. de solució de metilglioxal al 0'3 per 100.
95 cc. d'aigua.
1'5 cc. de toluol.

4. 50 cc. de solució de metilglixal al 0'3 per 100.
100 d'aigua.
1'5 de toluol.

Durada de l'experiència : 24 h. Temperatura : 37 graus.

En 1 cc. del líquid primer s'havien separat, a les vint-i-quatre hores, 0'3494 mgr. de fòsfor, i en un del segon, durant el mateix temps, 0'0134 mgr. Per tant, el fòsfor alliberat per hidrolisi, a partir de l'exosadifosfat, en 1 cc. era:

$$\begin{array}{r} 0'3494 \\ - 0'0134 \\ \hline 0'3360 \text{ mgr.} \end{array}$$

Una part alíquota de la barreja de fosfats obtinguda a la fi de l'experiència, que constava d'exosadifosfat, exosamonofosfat i fosfat inorgànic, fou precipitada amb alcohol, com hem exposat anteriorment, i després hi investigarem quantitativament la quantitat present de cada una de les diferents classes de fosfats.

Veiérem que en 1 cc. hi havien 0'0833 mgr. de fòsfor en forma de monofosfat; restant aquesta quantitat de la total separada, trobarem la de fòsfor procedent de la completa descomposició dels exosadifosfats.

$$\begin{array}{r} 0'3360 \\ - 0'0833 \\ \hline 0'2527 \text{ mgr.} \end{array}$$

La quantitat de sucre que correspon a aquesta de fòsfor posat en llibertat és de 0'7337 mgr. per centímetre cúbic.

Aquest sucre, procedent de la descomposició de l'exosadifosfat, ha passat, en la seva major part, a metilglixal; en interrompre l'experiència, en queda encara una petita proporció dissolta en el líquid com a sucre.

La determinació d'aquest l'efectuarem en el líquid alcohòlic resultant de la filtració dels fosfats, un cop concentrat per evaporació. Evaporat l'alcohol, tractarem el residu amb poca aigua, i en aquesta solució aquosa determinarem el sucre segons el mètode de Lehmann-Maquenne. En 10 cc. del líquid primer trobarem 2'05 mil·ligrams de sucre, i en el mateix volum del segon, 0'95 mgr. Restant aquest d'aquell, tindrem la quantitat produïda per descomposició de l'exosadifosfat.

$$\begin{array}{r} 2'06 \\ - 0'95 \\ \hline 1'11 \text{ mgr. per cc.} \end{array}$$

I restant del produït per la descomposició total del compost fosfòric, tindrem la quantitat d'hidrat de carbon que ha passat a metilglioxal, per centímetre cúbic.

$$\begin{array}{r} 0'7337 \\ - 0'1110 \\ \hline 0'6227 \text{ mgr.} \end{array}$$

Per a l'aïllament d'aquest metilglioxal, prenguérem 860 cc. de la solució primera, en la que havíem separat les albúmines amb àcid tricloracètic, i els tractarem amb 2-4-dinitrofenilhidrazina. Al cap d'un cert temps es diposità bé el precipitat; a les dues hores el centrifugàrem, el rentàrem amb àcid clorhídric diluït, aigua i alcohol, i l'abandonàrem en un dessecador.

En aquests 860 cc. de líquid obtinguérem un precipitat de 1'71 gr. de bishidrazona, corresponents a 0'3563 gr. d'hidrat de metilglioxal, o sigui, per tant, 0'414 mgr. per centímetre cúbic.

Precipitant el metilglioxal, que hi havia encara, al cap de vint-i-quatre hores, en els líquids tercer i quart (als quals l'havíem afegit al principi de l'experiència),

veiérem que durant aquest temps havien desaparegut per dismutació 0'212 mgr. d'hidrat de metilglixal per centímetre cúbic. (La solució sola d'aldehid cetònic del líquid quart no s'havia alterat.)

Si sumem aquesta quantitat dismutada a la precipitada en forma de bishidrazona, tindrem que el metilglixal total format és 0'626 mgr. per centímetre cúbic. I com que, segons l'anàlisi dels fosfats, la de sucre que estava a disposició de passar a aldehid era 0'6227 mgr., tenim que la quantitat veritablement formada és

$$\frac{626,100}{623} = 100'5 \text{ per } 100$$

de la teòricament possible.

Anàlisi de la dinitrofenilbishidrazona obtinguda

Aquesta bishidrazona fou cristal·litzada un cop en piridina, i un altre en nitrobenzè, i s'obtingué aleshores pura i d'un punt de fusió de 298°.

En el seu anàlisi obtinguérem el resultat següent:

4'679 mgr. de substància donaren 7'200 mgr. de CO₂ i 1,220 mgr. de H₂O 2'887 mgr. de substància donaren 0'658 cc. de N₂ (a la pressió de 754 mm. a 24° i amb solució de KOH al 50 per 100).

Anàlisi elemental

(C₁₅H₁₂N₈O₈) Calculat : C = 41'66 %; H = 2'80 %; N = 25'93 %
P. m. = 432 Trobat : C = 41'96 %; H = 2'91 %; N = 25'75 %

Una altra experiència feta de manera anàloga ens donà el mateix resultat.

Durant les vint-i-quatre hores se separaren de l'exo-

sadifosfat 0'3387 mgr. de fòsfor per centímetre cúbic. La barreja precipitada amb alcohol contenia, per centímetre cúbic, 0'0875 mgr. de fòsfor sota forma de monofosfat d'exosa.

Per tant, el fòsfor lliure resultant de la completa destrucció del compost fosfòric de l'exosa seria, per centímetre cúbic,

$$\begin{array}{r} 0'3387 \\ - 0'0875 \\ \hline 0'2512 \text{ mgr.} \end{array}$$

La quantitat equivalent de sucre és 0'7293 mgr. Com que en el filtrat alcohòlic de la precipitació dels fosfats trobarem 0'1160 mgr. de sucre, tindrem que existien en la solució 0'6133 a punt de passar a metilglioxal.

D'una manera anàloga a la de l'anterior experiència, aïllarem 0'0422 mgr. d'hidrat de metilglioxal per centímetre cúbic, i la quantitat d'aquest dismutada fou 0'0207 mil·ligrams. Doncs s'havien format en aquesta experiència 0'0629 mgr. de $\text{CH}_3\text{-CO-COH} + \text{H}_2\text{O}$ per centímetre cúbic, o sigui

$$\frac{629,100}{613} = 102 \text{ per } 100$$

del teòricament possible.

Es feren també experiències amb el suc de la maccació de la llevadura dialitzat i fortament diluït (en la relació 1 : 36), que ens donaren, en línies generals, el mateix resultat.

La descomposició dels fosfats assolí, aproximadament, la meitat de l'obtinguda en les experiències anteriorment descrites, i la quantitat de metilglioxal aïllat fou, igualment, un 50 per 100 del corresponent a les experiències fetes amb suc sense dialitzat.

Anàlisi de la bishidrazona recristal·litzada

4,909 mgr. de substància, donaren 7,530 mgr. de CO₂ i 1,390 mgr. de H₂O.

2,831 mgr. de substància, donaren 0'639 cc. de N₂ (a la pressió de 754 mm. a 24° i amb solució de KOH al 50 per 100).

Anàlisi elemental

(C₁₅H₁₂N₈O₈) Calculat : C = 41'66 %; H = 2'80 %; N = 25'93 %
P. m. = 432 Trobat : C = 41'82 %; H = 3'14 %; N = 25'66 %

*Kaiser Wilhelm Institut für Biochemie.
Berlin-Dahlem.*

BIBLIOGRAFIA

1. C. Neuberg i M. Kobel, *Biochem. Zeit.*, 203, 463, 1928; 210, 466, 1929.
2. C. Neuberg i M. Kobel, *Biochem. Zeit.*, 207, 232, 1929.
3. C. Neuberg i M. Scheuer, *Sitzungsber. d. Wiener Akademie d. Wissenschaften, Wegscheider-Festschrift*, 1929.
4. M. Vogt, *Klin. Wochenschr.*, 8, 793; 1929. — *Biochem. Zeit.*, 211, 17; 1929.
5. A. Harden i W. J. Young, *Chem. Centralbl.*, I, 1853, 1906; E. Buchner i F. Klätte, *Biochem. Zeit.*, 8, 523; 1900. — H. v. Euler i K. Myrbach, *Naturwissensch.*, 17, 291; 1929.
6. K. Lohmann i L. Jendrassik, *Biochem. Zeit.*, 178, 418; 1926.