

SOBRE LA DISMUTACIÓ DEL METIL I FENIL-
GLIOXAL PER L'ENZIMA DE LES FULLES
VERDES. EXPERIÈNCIES AMB FULLES
DE TIL·LER

per

C. PI-SUÑER I BAYO

La dismutació de substàncies de naturalesa alhídica per materials del regne vegetal es demostrà primerament amb llevats. El seu procés bàsic d'oxidoreducció ha adquirit una importància especial per a la comprensió del tercer esquema fermentatiu.

Inicialment s'origina una descomposició de la molècula de sucre, en acetaldehid més anhídrid carbònic i glicerina, produint-se de seguida un segon procés d'oxidoreducció que porta a l'estabilització de l'acetaldehid, a la seva dismutació a àcid acètic i alcohol etílic (C. Neuberger i J. Hirsch).

Pertany al mateix tipus de dismutació la que té lloc, no entre dues molècules senzilles d'aldehid, sinó intramolecularment, en una sola d'aldehid cetònic. Com a substràtums per a aquestes experiències hem fet servir generalment el metil i el fenilglioxal. Pot considerar-se com a demostrat que totes les cèl·lules, de qualsevol classe que siguin, proveïdes d'un sistema desmolísic espe-

cial, anàleg a la cimasa alcohòlica o a la làctica, produeixen la dismutació del metil i fenilglioxal. I com que un complex d'aquesta naturalesa es troba generalment en totes les cèl·lules, s'ha observat aquest procés d'òxido-reducció — que en molts de casos representa el final de la glucolisi (1) — en totes aquelles cèl·lules animals o vegetals amb què s'ha experimentat.

És digne d'ésser notat el fet que les plantes que ocupen llocs elevats en l'escala vegetal presenten, a llur torn, aquest enzima de la dismutació, en diferents parts de llur organisme. Fou comprovat d'una manera segura, en primer lloc, en les llavors (pèsols, mongetes, altramuços i cereals diversos) (2); observant-se després en les fulles verdes (tabac de Corrientes i de Latakia) (3).

Ara bé, no sempre s'observa una acumulació de lactat en les parts verdes dels vegetals, però sí la capacitat de produir àcid làctic a partir del metilglioxal, capacitat que sembla concedida a tots els éssers vivents. No devem, per tant, considerar aquest fenomen com un fet casual; la circumstància que l'àcid làctic tan sols s'acumuli rarament, pot ésser degut a causes molt diverses, com, per exemple, el seu consum ulterior, la síntesi de les resines, i moltes d'altres. De la mateixa manera, les relacions i analogies de metabolisme, en distintes cèl·lules, ens presenten en totes un mecanisme idèntic en la descomposició dels glúcids (4).

L'aïllament del metilglioxal, aconseguit inclús en els vegetals superiors, és una prova més d'aquesta afirmació.

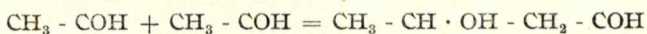
Les experiències de C. Neuberg i M. Kobel (5) han indicat que la dismutació dels aldehids simples i la dels cetònics no presenta solament analogies de forma, sinó també cinètiques; sense que, malgrat tot, pugui pretendre's avui en dia considerar ambdós processos totalment idèntics.

A més, l'observació de la dismutació en els aldehids cetònics presenta un avantatge sobre la feta en els aldehids senzills (sense àtom de carbon asimètric), avantatge consistent en què en els primers la dismutació és *dirigida estereoquímicament*, originant un *procés asimètric unilateral*. Aquest fet fou ja observat per Neuberg el 1913, en veure que amb el llevat obtenia un àcid làctic inactiu, i, en canvi, amb el teixit muscular, una barreja de racèmic i de levògir. Data també d'aleshores l'observació de com s'afavoria la formació de l'àcid làctic amb un lleuger augment d'hidroxilions, fosfats, per exemple, que neutralitzaven després l'àcid format (6).

Amb l'hidrat de fenilglioxal s'ha observat, sense excepció, la formació d'àcid amigdàlic òpticament actiu (7).

L'angle de desviació de la llum polaritzada depèn de la naturalesa del material diastàsic, i sense esforç podem atribuir a l'acció de factors biològics específics el pas, quasi en un 100 per 100, d'una substància inactiva a una altra òpticament activa.

Tot això és avui en dia més interessant des que recentment J. Bodnar i C. Bernauer (8) sostenen que la desaparició de l'aldehid acètic en les diferents parts de les plantes no ha d'atribuir-se necessàriament a un procés diastàsic, sinó que pot ésser deguda a una aldol-condensació de causes purament químiques, sense que aquesta reacció sigui influïda per cap catalitzador biològic. (Aquests investigadors han observat que en el puré de pèsols, que actua molt activament sobre l'acetaldehid, no era possible demostrar després la presència de l'àcid acètic i de l'alcohol etílic, a què devia donar lloc, segons la reacció de Cannizzaro. En canvi, es formava acetaldol, segons la condensació:



no essent aquesta reacció de naturalesa diastàsica, ja que es presentava igualment si es tractava abans el puré de pèsols pel calor.)

No anem a discutir ara en quina mesura pot acceptar-se aquest fet per altres materials vegetals en què s'observa també un consum d'aldehid (9), sense veure's, en canvi, la producció de les quantitats equivalents d'alcohol i àcid.

C. Neuberg i M. Kobel (10) ja han indicat que en la dismutació del metilglioxal per la diastasa de les fulles verdes es produeix àcid làctic racèmic, la qual cosa coincideix en absolut amb el fet que fins ara l'àcid làctic preformat i aïllat de les parts verdes dels vegetals ha estat sempre de la forma d-1.

En el que es refereix a l'acció de la cimasa dels vegetals superiors sobre l'hidrat de fenilglioxal, els mateixos autors han observat el pas d'aldehid cetònic aromàtic a àcid amigdàlic levògir; podent-se obtenir, amb bacteries, dextrògir o levògir a voluntat. En els meus experiments amb les fulles verdes de til·ler (*Tillia grandifolia*) he aconseguit el pas, en un 83 per 100 aproximadament a d (—) àcid amigdàlic, d'un poder rotatori de $-146'5^{\circ}$, estant format, per tant, en un 96 per 100 de component levògir.

De tot això deduïm, doncs, que en el cas del fenilglioxal no pot quedar-nos cap dubte sobre el caràcter diastàsic de la reacció. Quant al metilglioxal, n'hi haurà prou d'indicar que amb el líquid resultant de coure l'extracte de fulles de til·ler no vaig aconseguir cap dismutació, la qual cosa demostra que és també una acció biològica, malgrat l'haver-se produït lactat inactiu a la llum polaritzada.

PART EXPERIMENTAL

I. *Experiències amb metilglioaxal*

Per a aquesta investigació prepararem les següents barreges:

- 1.^a 250 gr. de fulles verdes i fresques de til·ler trinxades.
740 cc. d'aigua.
10 cc. de solució de metilglioaxal al 10 per 100.
10 gr. de carbonat càlcic.
10 cc. de toluèn.
- 2.^a 250 gr. de fulles de til·ler trinxades.
640 cc. d'aigua.
100 cc. de suc de llevat cuit (com a *coferment*).
10 cc. de solució de metilglioaxal al 10 per 100.
10 gr. de carbonat càlcic.
10 cc. de toluèn.
- 3.^a 250 gr. de fulles de til·ler trinxades.
750 cc. d'aigua.
10 gr. de carbonat càlcic.
10 cc. de toluèn.

Totes aquestes barreges, col·locades en sengles botelles, foren enèrgicament agitades durant sis hores, a una temperatura de 40°, i després, posades a l'estufa de cultius a 37°. Com que les fulles trinxades, en contacte amb l'aigua, s'havien inflat i l'havien absorbit en gran quantitat, afegírem, al cap de vint-i-quatre hores, 750 cc. d'aigua a cada barreja. Al principi de l'experiència, a les vint-i-quatre i a les quaranta-vuit hores, prenguérem de cada una 15 cc. de líquid, en els quals procedírem a la determinació del metilglioaxal. Per a això centrifugàrem aquests líquids, i com que no dipositaven bé, els afegírem el mateix volum d'alcohol, filtràrem el precipitat obtingut, i el líquid clar que filtrava el tractàrem amb solució alcohòlica de paranitrofenilhidrazina; després, l'evaporàrem en part.

D'aquesta manera observàrem que a les quaranta-vuit hores havia desaparegut en absolut l'aldehid cetònic. Aleshores prenguérem les barreges de les botelles, guardàrem la part líquida i tractàrem dues vegades consecutives el residu sòlid amb aigua, a la centrífuga. Els líquids resultants d'aquests rentats els vaig ajuntar als primitivament separats i els vaig evaporar fins a petit volum, precipitant després amb la mateixa quantitat d'alcohol metílic i filtrant. Els residus separats d'aquesta filtració foren dissolts en 125 cc. d'aigua bullint, i novament precipitats amb la mateixa quantitat d'alcohol.

Vaig ajuntar tots els líquids resultants que contenien el lactat i els vaig afegir àcid oxàlic en excés, per a separar el Ca; vaig filtrar el precipitat, i el filtrat el vaig fer bullir amb quantitat suficient de carbonat de plom, fins que no donés reacció àcida al paper de tornasol. Un cop refredat, vaig filtrar els líquids i vaig rentar el precipitat, i el líquid amb aigua freda. Aleshores separàrem el plom amb un corrent d'àcid sulfhídric i la part d'aquest que pogués haver-se dissolt en el líquid fou tret per un corrent d'aire. Vaig afegir ZnO en excés, vaig fer bullir fins a completa neutralització, vaig filtrar en calent per a separar el ZnO no dissolt i vaig concentrar la solució de lactat fins a petit volum.

Com que al cap d'uns dies no es va produir cap cristallització, acidulàrem cada un dels líquids amb àcid fosfòric, el barrejàrem íntimament, en un morter, amb sulfat sòdic recentment calcinat, fins a obtenir un pols farinós, i l'extraguérem amb èter, fins a esgotament, en aparells de Soxhlet. Un cop evaporat l'èter, vaig dissoldre el residu resultant en aigua i vaig sotmetre la solució, amb carbonat de plom, etc., a un tractament en tot idèntic al ja descrit.

Finalment, en la solució de lactat de zinc obtinguda, després de concentrada i de guardar-la durant força temps, es presentà una cristal·lització. Vaig tractar la sal amb argila, li vaig afegir un xic de carbó animal i la vaig recristal·litzar dos cops en aigua.

Residu obtingut en l'experiència primera..... 0'8 gr.
Residu obtingut en l'experiència segona..... 0'65 gr.

Com pot veure's, en comparar els resultats anteriors, l'addició del coferment no ha millorat per res la reacció. Amb tot, hem de considerar que en els líquids extractius de les fulles es troben moltes substàncies que dificulten la cristal·lització; per això és satisfactòria la quantitat final obtinguda.

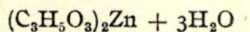
L'observació polarimètrica ens indicà que es tractava d'una sal òpticament inactiva, ço que fou comprovat per la determinació de l'aigua de cristal·lització.

Anàlisis

Amb 0'1007 gr. de la substància obtinguda de la primera barreja, dessecada, obtinguérem : en deshidratar, 0'0184 gr. d'aigua i, en incinerar, 0'0275 gr. de ZnO.

Amb 0'1001 gr. de la substància obtinguda de la barreja segona, dessecada, obtinguérem : en deshidratar, 0'0183 gr. d'aigua i, en incinerar, 0'0276 de ZnO.

Les quantitats expressades en tant per 100, que produeix una molècula de lactat de zinc, i les obtingudes en les nostres experiències, són:



Calculat:

Aigua = 18'18 per 100; ZnO = 27'35 per 100

Trobat : barreja primera:

Aigua = 18'27 per 100; ZnO = 27'35 per 100

Trobat : barreja segona:

Aigua = 18'28 per 100; ZnO = 27'42 per 100

No ens fou possible trobar àcid làctic preformat en el líquid de la barreja tercera, que tractàrem, en tots els detalls, d'una manera anàloga a les altres dues (ni tan sols amb la reacció colorejada del tiofè). Per tant, les fulles, almenys en el període de vegetació en què foren collides, no contenien ni indicis d'àcid làctic.

II. *Experiències amb fenilglioxal*

De la mateixa manera que amb el metilglioxal, prepararem les barreges següents:

- 1.^a 250 gr. de fulles verdes i fresques de til·ler trinxades.
1,500 cc. d'aigua.
1 gr. d'hidrat de fenilglioxal.
10 gr. de carbonat càlcic.
10 cc. de toluèn.
- 2.^a 250 gr. de fulles de til·ler trinxades.
1,500 cc. d'aigua.
10 gr. de carbonat càlcic.
10 cc. de toluèn.

Les experiències foren fetes a una temperatura de 37°, i s'observà la presència del fenilglioxal, al començ de l'experiència, a les vint-i-quatre hores i als dos dies, en una part alíquota de líquid, per la precipitació amb solució acètica de paranitrofenilhidrazina. En la primera barreja havia desaparegut l'aldehid cetònic als dos dies. Aleshores centrifugàrem i rentàrem el residu, a la centrífuga, dues vegades consecutives, amb 450 cc. d'aigua

cada vegada. Un cop reunits tots els líquids obtinguts i concentrats per evaporació, els vaig precipitar amb acetona, els vaig filtrar i els precipitats obtinguts els vaig dissoldre amb 125 cc. d'aigua bullent, tornant-ho a precipitar amb 125 cc. d'acetona i filtrant altre cop. Aquest tractament fou repetit una altra volta.

Reunits en un sol aquests diversos líquids acetònics, separarem l'acetona per evaporació, filtrarem i acidularem amb àcid fosfòric.

Les solucions àcides resultants les agitarem amb èter en un embut de decantació, sis cops seguits; i els líquids eteris obtinguts els tractarem amb sulfat sòdic, recentment calcinat, per a dessecar-los. L'èter fou totalment destil·lat; el residu fou dissolt en una petita quantitat d'aigua bullent, bullit amb carbó animal, i filtrat.

Un cop evaporada, en part, l'aigua de la solució, no s'observava encara cap cristallització d'àcid amigdàlic. Aleshores neutralitzarem exactament aquesta solució amb una altra de sosa, filtrarem i precipitarem amb sulfat càdmic.

En el líquid provinent de la barreja primera es formà un abundant precipitat d'amigdalat de cadmi, molt insoluble (II); en el corresponent a la segona, cap precipitat.

Aquest amigdalat càdmic, que al principi semblava encara obscurament colorejat, fou filtrat al buit, rentat amb aigua, posat en suspensió en aigua i atacat per un corrent d'àcid sulfhídric. A les tres hores d'aquest tractament pesarem novament el precipitat en suspensió en aigua i el tractarem amb sulfhídric. Per últim, passades dues hores més, tornarem a filtrar, i la solució obtinguda, d'una claredat quasi d'aigua, fou evaporada a sequedat.

Quantitat d'àcid amigdàlic, en brut, trobat..... 0'834 gr.

Després de recristal·litzar-lo en benzèn, es presentava sota forma de bonics cristalls blancs. El seu punt de fusió era 130°.

Per a portar a cap la determinació del poder rotatori, vaig dissoldre 0'2338 gr. d'àcid en 10 cc. d'aigua, i vaig obtenir el següent resultat:

$$[\alpha]_D = -146'5^\circ \quad (\alpha = -6'85^\circ; l = 2; c = -2'338)$$

A més, 8 cc. d'aquesta solució necessitaren, per a neutralitzar-se, 12'2 cc. de solució n/10 de KOH; la quantitat calculada per l'àcid amigdàlic era de 12'3 cc.

D'això, i de l'elevat poder de rotació que assoleix el de la forma òpticament pura, es veu que l'àcid que hem obtingut, per l'acció diastàsica, és el levògir. I com, a més, la quantitat d'àcid amigdàlic obtinguda és major del 80 per 100 de la total que podia formar-se a partir del fenilgloxal estructuralment inactiu, *tenim en aquesta experiència un exemple més de l'interessantíssim procés de formació, per la dismutació, d'una substància asimètrica a partir d'una altra que no ho era.*

*Kaiser Wilhelm Institut für Biochemie
Berlin - Dahlem*

BIBLIOGRAFIA

1. C. Neuberg, Der Zuckerumsatz der Zelle. Jena, 1913. — Handb. d. Biochem. de Oppenheimer, segona edició, 2, 442.
2. C. Neuberg i G. Gorr., Biochem. Zeit., 171-475, 192; 173-358, 1926. — G. Binder-Kotrba, íd., 174-443; 1926. — L. Klar, íd., 186-327; 1927.
3. C. Neuberg i M. Kobel, Biochem. Zeit., 179-459; 1926. — Stoklasa-Festschrift, 269; 1928.
4. W. Benecke i L. Jost, Pflanzenphysiol., quarta edició, 263; 1924.
5. C. Neuberg i M. Kobel, Zeit. f. phys. chem., parte A, Haber-band, 139, 631; 1928.
6. C. Neuberg, Biochem. Zeit., 51, 484; 1913. — C. Neuberg i M. Kobel, Biochem. Zeit., 182, 470; 1927.
7. P. Mayer, Biochem. Zeit., 174, 420; 1926. — G. Binder-Kotrba, loc. cit. — L. Klar, loc. cit. — C. Neuberg i E. Simon, Biochem. Zeit., 186, 331; 1927. — A. Gualdi, Biochem. Zeit., 205, 318; 1929.
8. J. Bodnar i C. Bernauer, Biochem. Zeit., 209, 458; 1929.
9. W. Zalewski i E. Schatalowa-Zaleskaja, Biochem. Zeit., 201, 190; 1928. — Hans v. Euler i E. Grabe, Chem. Centralbl., II, 2410; 1928. — Z. J. Kertesz, H., 176, 144; 1928.
10. C. Neuberg i M. Kobel, loc. cit. Stoklasa-Festschrift.
11. A. Mc. Kenzie, Chem. Centralbl., II, 1048; 1899. — H. Thierfelder i K. Daiber, H., 130-138; 1923.