Redukcja błękitu metylenowego przez drożdże.

I. Wpływ koncentracji jonów wodorowych i temperatury.

(On the reduction of methylene blue by yeast. — I. The influence of hydrogen ion concentration and of temperature).

Napisał

ANTONI KOZŁOWSKI.

Wstęp.

Redukcja i utlenianie, zachodzące w komórce żywej, przedstawiają misternie utkaną sieć reakcyj, które stanowią zasadnicze tło biologicznej przemiany materji. Tlen, wchodzący tu w grę, pobierany bywa z powietrza lub też odczepiany zostaje od odpowiednich związków, wodór natomiast przenoszony zostaje z jednego związku na drugi. Reakcje uwarunkowane wolnym tlenem określono jako oddychanie tlenowe, aerobijne, dwa zaś pozostałe przypadki, jako oddychanie beztlenowe, anaerobijne, śródcząsteczkowe. To ostatnie może wprawdzie zachodzić także w obecności wolnego tlenu, występuje jednak wyraźniej, jakkolwiek w kierunku mniej lub więcej odmiennym, w nieobecności tlenu, jak n. p. w anaerobijnych kulturach bakteryj i drożdży, w kiełkujących nasionach, w owocach, liściach i innych organach roślin lub też w rozmaitych tkankach zwierzęcych pozbawionych wolnego tlenu.

Przenoszenie wodoru pociąga za sobą równocześnie redukcję i utlenianie; związek bowiem odczepiający wodór staje się przez to sam weń uboższy czyli utleniony, związek zaś przyłączający ów wodór staje się przez to samo zredukowany. Proces odczepiania wodoru od pewnych składników treści komórki da się śledzić, po uprzednim wyeliminowaniu wolnego tlenu, przy pomocy rozmaitych odczynników, których produkt redukcji da się łatwo obserwować

przez stratę lub nabycie barwy (jak np. błękit metylenowy, *m*-dwunitrobenzol, nitroantrachinon) lub też da się oznaczyć metodami pośrednimi (jak np. azotyn oznaczony ilościowo metodą Illosvay-Lunge'go przy redukcji azotanu). Związki takie, łatwo przyłączające wodór, nazwano ogólnie odbieraczami, akceptorami wodoru, podczas gdy składniki treści komórki łatwo odczepiające wodór, oznaczono ogólnie jako wodorodawce, donatory wodoru, kofermenty redukcyjne.

Wodorodawce są często niezbyt trwałe i skłonne są do utleniania, izomeryzacji i rozkładu. Dadzą się one z komórki wyciągnąć i zastąpić przez związki chemicznie określone jak n. p. w pewnych przypadkach przez: 1) aldehydy (aldehyd mrówkowy, octowy, salicylowy, benzoesowy, izowalerjanowy i inne; 2) aldozy (glukoza); 3) ketony (dwuhydroksyaceton); 4) ketozy (fruktoza); 5) kwasy (mlekowy, tiomlekowy, bursztynowy, tioglykolowy); 6) aminokwasy (alanina, glikokol, cysteina); 7) zasady purynowe (ksantyna, hypokszantyna) 8) peptony; 9) białka (globulina, albumina).

W niektórych przypadkach odbieracze wodoru reagują z wodorodawcami wprost bardzo łatwo i dostrzegalnie; w pewnych zaś razach jest niezbędnem przytem pośrednictwo katalizatorów mających wszystkie cechy enzymów, które nazywano rozmaicie, jak np. redukaza, reduktaza, aksydo-reduktaza, dehidraza, dehydrogenaza, perhydraz, perhydridaza i t. p.

Dodać jednak tu należy, że mimo nawet obecności enzymów redukcyjnych, reakcja nie zawsze da się przeprowadzić, gdyż przy zastosowaniu pewnych odbieraczy wodoru niezbędnem jest także dobranie odpowiednich wodorodawców; reakcja więc ta jest często specyficzną t. j. ściśle zależną od natury chemicznej poszczególnych składników systemu redukcyjnego, a więc od wodorodawcy, odbieracza wodoru i enzymu redukcyjnego. Da się to wywnioskować choćby z następującego przykładu: enzym Schardingera, wyizolowany z mleka, redukuje błękit metylenowy w obecności aldehydów i azotany w obecności aldehydów lub zasad purynowych; redukaza zaś ziemniaka może wprowadzić redukować azotany w obecności aldehydów, lecz wcale nie w obecności tylko zasad purynowych i nie ma zdolności odbarwiania błękitu metylenowego. Zauważono też niejednokrotnie, że pewne związki, użyte jako wodorodawce, mogą być czynne w obecności enzymów redukcyjnych drożdży lub wątroby, lecz wcale nie przy zastosowaniu enzymów redukcyjnych bakterji — i odwrotnie. Co więcej, nawet izomeryczna budowa związku może tu odgrywać bardzo ważną rolę. I tak np. kwas

winowy lewoskrętny może służyć jako wodorodawca, lecz wcale nie prawoskrętny; kwas α -tiomlekowy jest bardziej czynny niż β -tiomlekowy: bioglukoza, związana z kwasem fosforowym, jest aktywniejsza niż czysta glukoza, (podobnie ma się z fruktozą).

Jak przy wielu innych procesach biochemicznych, tak samo tu obecność pewnych związków może redukcję przyspieszać lub też utrudniać.

W celu wglądnięcia w mechanizm systemu redukcyjnego drożdży, autor podjął się próby wyizolowania ko-enzymu i enzymu redukcyjnego; uprzednio jednak, dla porównania aktywności preparatów, chemicznie mniej lub więcej oczyszczonych, przeprowadzono poniżej opisane orientacyjne badania redukcji błękitu metylenowego przez drożdże całkowite.

Doświadczenia nad wpływem koncentracji jonów wodorowych i temperatury na redukcję błękitu metylenowego przez drożdże.

Roztwór błękitu metylenowego sporządzono w sposób następujący: 0.6 gm barwnika wyciągnięto przy pomocy 10 gm letniego alkoholu absolutnego: odcentryfugowany ekstrakt rozcieńczono obliczoną ilością (39.5 cm^3) wody, tak by otrzymać 1%-owy roztwór; płyn ten przechowywano w ciemności w kolbkach szczelnie zatka-nych, przed użyciem sporządzano świeży roztwór 0.05%-owy przez dodanie 19 cm^3 wody do 1 cm^3 roztworu barwnika.

Rurki próżniowe były rozwidlone pod takim kątem, że dno ramion mogło być osiągnięte pipetą. Doszlifowane zatyczki rurek uszczelniano mieszaniną parafiny, gumy i wazeliny, stopionych razem w stosunku 1 : 1 : 2.

W celu utrzymania warunków możliwie jednostajnych, 5 rurek próżniowych (zawierających badany materiał) dołączano do rurki mosiężnej o 5-ciu odgałęzieniach bocznych i uwalniano je od gazów równocześnie.

Powietrze z rurek usuwane było stopniowo; najpierw przy pomocy słabej pompy a następnie (po upływie 2 minut) przy pomocy pompy olejowej; z początku rurki były energicznie potrząsane i tylko częściowo otwierane, by uniknąć przerzucania płynu z jednego ramienia w drugie. Usuwanie gazów trwało w każdym razie 10 minut z przerwami kilkoma co 2 minuty dla przywrócenia płynowi temperatury pokojowej. Lekkie podgrzewanie i potrząsanie przyspieszało wydalenie gazów.

Zrezygnowano tu z usunięcia śladów tlenu. gdyż chodziło tu głównie o orientację, a nie o ilościowy pomiar redukcji.

Do badania użyto świeżych drożdży piekarskich, zawierających nieco skrobi i około 70% wody.

A) Wpływ koncentracji jonów wodorowych w rozmaitych temperaturach.

Doświadczenie: w jedno ramię rurki próżniowej włożono 30 mgm świeżych drożdży i 1 cm³ roztworu fosforanów (I. II.) o oznaczonej koncentracji jonów wodorowych (*pH*); w drugie ramię rurki wpuszczono 1 cm³ tego samego roztworu fosforanów i 0.4 cm³ 0.05% roztworu błękitu metylenowego.

Serję rurek z powyżej opisaną zawartością uwolniono od gazów i wstawiono do kąpeli wodnej o ściśle oznaczonej temperaturze; po upływie 3 minut, skoro płyn w rurekach przybrał temperaturę kąpeli wodnej, zmieszano zawartość obu ramion przez ukośne przechylenie rurek i notowano okresy czasu, w jakich błękit metylenowy uległ zupełnemu odbarwieniu.

Tabela I.

Wpływ koncentracji jonów wodorowych i temperatury na redukcję błękitu metylenowego przez świeże drożdże piekarskie.

<i>pH</i> roztworów fosforanów:	Czas redukcji barwnika w temperaturach podanych:			
	40°	50°	55°	60°
5.0	60'	10' 40"	7' 10"	13' 15"
6.0	26'	4' 5"	3' 15"	6' 7"
7.0	12' 30"	2' 55"	2' 12"	3' 15"
8.0	7' 15"	2' 2"	1' 32"	2' 17"
9.0	4' 5"	1' 28"	1' 30"	1' 40"
10.0	1' 55"	1' 6"	0' 57"	1' 20"

W tabeli I podane są przeciętne okresów czasu otrzymane z kilku pomiarów; okresy czasu mogą być nieco wyższe lub niższe od podanych w tabeli I; zależą one, oczywista, od warunków eksperymentalnych, jak np. od stopnia usunięcia tlenu, od ilości i świeżości drożdży, od ilości barwnika. W każdym razie wykazują one bardzo wyraźnie wpływ czynników na wstępie tego rozdziału zaznaczonych a mianowicie pozwalają one wnioskować, że w temperaturze 40°—55° redukcja błękitu metylenowego przez komórki drożdży przebiega tem szybciej im mniejszą jest koncentracja jonów

wodorowych; w temperaturze 60° zaznacza się już pewne zahamowanie procesu, jakkolwiek jeszcze nieznaczne, w każdym razie już dostrzegalne zwłaszcza przy bardziej kwaśnej i zasadowej reakcji płynu.

W celu ściślejszego określenia, jaka temperatura przyspiesza a jaka hamuje proces redukcji, przeprowadzono jeszcze następujące doświadczenia:

B) Wpływ temperatury.

Serję doświadczeń przeprowadzono z taką samą ilością materiału i w taki sam sposób, jak w doświadczeniu A. Koncentracja jonów wodorowych była jedna i ta sama a mianowicie $pH=7.0$. Rezultaty są podane w tabeli II.

Tabela II.

Wpływ temperatury na redukcję błękitu metylenowego przez drożdże świeże przy $pH=7.0$.

Temp.	1°	10°	20°	30°	40°	50°	60°	65°	70°	80°	90°
Czasred.	0	0	180'	100'	10'	3'	2' 40''	4'	0	0	0

0 = bez zmiany w ciągu 8 godzin.

W doświadczeniach tych zauważono, że w temperaturze niskiej, 1°—10°, błękit metylenowy nie uległ odbarwieniu w ciągu 8 godzin, nawet gdy użyto bardzo mało barwnika (0.1 cm³ 0.008% roztworu na 80 mgm drożdży). Dopiero przy 20° błękit metylenowy zaczął ulegać bardzo powolnemu odbarwianiu, które występowało ze zwrastającą szybkością w miarę dalszego podwyższania temperatury od 30°—60°; przy 70° i wyżej redukcja barwnika była zahamowana zupełnie. Jeśli jednak nie stosowano ogrzewania przez 3 minuty przed zmieszaniem zawartości rurek, odbarwienie błękitu następowało przy 70° w ciągu 2½ minuty. Widocznie więc nawet krótkie ogrzanie drożdży do 70° niszczy ich system redukcyjny. Ów szkodliwy wpływ wyższej temperatury (70°—90°) nie da się zauważyć, jeśli użyto bardzo małej ilości błękitu. W celu ściślejszego określenia, jaka temperatura jest szkodliwa dla systemu redukcyjnego drożdży przeprowadzono jeszcze następujące doświadczenie:

Próbki 30 mgm drożdży zawieszono w 1 cm³ roztworu fosforanów o koncentracji jonów wodorowych $pH=5.0$ — 10.0 i ogrzewano w otwartych rurkach próżniowych w ciągu jednej godziny do tem-

peratury *a)* 50°, *b)* 55°, *c)* 60° i *d)* 65°; inne takie same serie ogrzewano: *a)* przez 15 minut w temperaturze 60°, *b)* przez 30 minut przy 60°, *c)* przez 30 minut przy 65°; poczem wprowadzono w drugie ramię rurek próżniowych 0·4 cm³ 0·05% roztworu błękitu oraz 1 cm³ roztworów fosforanów (*pH* = 5·0—10·0). Rurki uwolnione od gazów wstawiono do kąpieli wodnej o temperaturze 55°; po upływie 3 minut zawartość obu ramion rurek zmieszano i notowano czas odbarwienia; wyniki zestawione są w tabeli III.

Tabela III.

Czas redukcji błękitu metylenowego w 55° przy *pH* = 7·0 przez drożdże uprzednio ogrzewane w podanych czasach, temperaturach i *pH*.

pH roztworów fosforanów	T e m p e r a t u r y						
	50 ⁰	55 ⁰	60 ⁰		65 ⁰		
	C z a s o g r z e w a n i a						
	60'	60'	15'	30'	60'	30'	60'
5·0	10'	33'	45'	60'	90'	0	0
6·0	6' 20''	9'	13' 30''	17'	25'	0	0
7·0	3' 10''	5'	6'	9'	300'	0	0
8·0	3'	3'	10'	0	0	0	0
9·0	1' 50''	2' 30''	36'	0	0	0	0
10·0	2' 30''	4'	0	0	0	0	0

0 = bez zmiany w ciągu 8 godzin.

Porównanie szybkości reakcji przy 55° dokonanej przez drożdże świeże (t. I.) i przez drożdże uprzednio ogrzewane wykazało bardzo wyraźnie, że szkodliwy wpływ temperatury wyższej spotęgowany zostaje przez kwasy a zwłaszcza przez zasady. Na uwagę też zasługuje fakt, że alkaliczne roztwory, które przyspieszają redukcję błękitu metylenowego poniżej 60°, potęgują destruktywny wpływ wyższej temperatury (ponad 60°) o wiele energiczniej niż kwaśne roztwory.

Wnioski.

Szybkość redukcji błękitu metylenowego przez drożdże wzrasta w miarę podwyższania temperatury od 20°—55° oraz w miarę obniżania koncentracji jonów wodorowych od *pH* = 5·0 do *pH* = 10·0. Optymalna temperatura owej redukcji jest w pobliżu 50° przy reakcji

obojętnej. System redukcyjny drożdży ulega destrukcji, jakkolwiek jeszcze nieznacznej, już przy 55° , a już bardzo wyraźnej przy 70° .

W temperaturze niskiej, 1° – 10° , reakcja przebiega bardzo powoli i jest trudno dostrzegalną.

Conclusions.

The reduction of methylene blue by fresh yeast is accelerated by raising the temperature up to 55° C and by decreasing the hydrogen ion concentration from $pH = 5.0$ to 10.0 . The optimal temperature of that reduction is near 50° C in a neutral solution. The reducing system of yeast is affected, although not yet so markedly at 55° C, but very distinctly at 70° C.

The reduction progresses very slowly and is almost indiscernible at temperatures between 1 and 10° C.