ANTONI KOZŁOWSKI.

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Chemji Rolnej
Uniwersytetu Poznańskiego.

ROLA GLUTATIONU W FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ.

**I. Katalityczne utlenianie siarkowodoru przy pomocy drucika platynowego
w obecności alkoholu.**

(On the part the glutathione plays in the alcoholic fermentation).

**I. (A catalytic oxidation of sulfurhydrogen by means of a platinum wire
in the presence of alcohols).**

(wpłynęło 16.III 1935)

W S T Ę P.

Stosunkowo najobfitsze występowanie glutationu w komórkach, w których zachodzi intensywny metabolizm cukrów zapasowych (skrobi i glukogenu), jak np. w drożdżach, w nasionach bogatych w skrobię i białka, w tkankach merystematycznych (1), w wątrobie i w mięśniach, wskazuje na czynny udział owego trójpeptydu w przeróbce cukrów.

Jednym z najobszerniej rozpatrywanych cykli przemiany cukrów, zależnej od współdziałania glutationu, jest fermentacja alkoholowa, w której glutation odgrywa rolę jednego z koenzymów. Zauważono nadto, że wodny ekstrakt z nasion, z drożdży lub z mięśni, zawierający obok innych także glutation, aktywuje nie tylko zymazę drożdży i nasion lecz także oddychanie tkanek zwierzęcych (2). Mechanizm jednak owego działania glutationu nie jest jeszcze wyświetlony. Prawdopodobnie polega on na aktywowaniu względnie hamowaniu pewnych enzymów zymazy oraz niektórych produktów rozkładu cukrów i wynika przede wszystkim z obecności grupy wodorosiarkowej ($-SH$) w drobinie glutationu, jak o tem można wnioskować z faktu, że także niektóre inne związki, posiadające grupę tiolową, jak np. kwas tioglukolowy i kwas α — tiomlekowy, mogą działać jako kozyzymaza. Dzięki owej grupie glutation może działać jako przenosiciel czynnego wodoru ($2\text{ GSH} \rightleftharpoons \text{GSSG} + 2\text{ H}^+$) i może wchodzić w połączenia z niektórymi składnikami treści komórki. Wodór,

uwalniany z grupy tiolowej glutationu, może być przyłączany do wolnego tlenu a w braku tego do pewnych produktów rozkładu cukrów i na odwrót, wodór, odczepiany od pewnych innych związków, może być spowrotem przyłączany do odwodornionego glutationu (GSSG).

Przemiana jednak cukrów w oddychaniu anaerobijnem zależy nie tylko od obecności przenosieli czynnego wodoru lecz także od aktywowania drobiny cukru, które zachodzi na drodze wiązania cukrów w estry kwasu fosforowego (3). Powstawanie takich estrów jest niezbędne zarówno w procesach fermentacji alkoholowej drożdży i nasion, jak też w oddychaniu tkanek zwierzęcych (4). Heksoza bowiem w postaci monofosforanu może łatwo ulegać w komórce rozkładowi na związki o mniejszej ilości atomów węgla a mianowicie na triozę (aldehyd glicerynowy czy też dwuoksyaceton) i kwas glicerynofosforowy względnie kwas fosforoglicerynowy. Jak wiadomo fosforany heksozy powstają pod działaniem enzymu fosfatezy a ulegają hydrolizie pod wpływem fosfotazy. Czynność tej ostatniej jest prawdopodobnie regulowana w komórce przez glutation; na taką możliwość wskazują spostrzeżenia poczynione przez Waldschmidt-Leitza (5), według których działanie fosfatazy, w przeciwstawieniu do tegoż fosfatezy, jest hamowane przez siarkowodór i cysteinę (lecz nie przez cystynę). Prawdopodobnie więc także glutation, dzięki zawartości w nim cysteiny, utrudnia w pewnych warunkach hydrolizę fosforanu heksozy i w ten sposób kontroluje szybkość rozkładu cukrów.

Prócz tego glutation może, dzięki grupie tiolowej, aktywować bezpośrednio przemianę pewnych produktów rozkładu cukrów; przede wszystkim karbonyle, jako najbardziej podatne reakcjom, mogą tworzyć z glutationem odwracalne produkty dodania i w tej postaci ulegać dalszym przemianom. Zdaniem Auha-gena (6) takie związki, czyli półmerkaptale, stanowią stąd pośrednie w przemianie ketoaldehydów w oksykwasy pod działaniem ketoaldehydmutazy; na tej drodze metylglyksal zostaje przeprowadzony w kwas mlekowy:

Taka wieloraka rola glutationu jest prawdopodobnie skupiona w preparacie ko-zymazy wyizolowanej z drożdży przez

Eulera i jego współpracowników (7), który zawierał obok organicznie związanej siarki także ester kwasu fosforowego.

Powyżej wspomniane badania przedstawiają pierwsze wycieczne kroki w próbie wyświetlenia roli glutationu. Autor zajął się w tym zakresie kwestją występowania glutationu w postaci uwodornionej w nasionach poddanych kiełkowaniu w warunkach anaerobijnych. Chodzi tu przede wszystkim o wyjaśnienie, jakie warunki wpływają na utrzymanie się glutationu w postaci uwodornionej. W zjawisku owym są dwie możliwości a mianowicie: glutation uwodorniony utrzymuje się w komórce jako taki dzięki temu, że w miarę odstępowania wodoru pewnym akceptorom wodoru pokrywa swe straty kosztem wodoru odczepionego od innych składników treści komórki, lub też wskutek tego, że pewne produkty rozkładu cukrów hamują jego odwodornienie. W tym ostatnim przypadku rola glutationu, jako przenosiela czynnego wodoru, byłaby ograniczoną. Takim hamującym produktem przemiany cukrów w fermentacji alkoholowej byłby, między innymi, także alkohol. Przypuszczenie to poparte jest faktem zauważonym przez autora, że alkohol dodany do wodnego roztworu glutationu utrudnia jego odwodornienie tlenem powietrza.

W celu więc zorientowania się w tem zagadnieniu, mającem pierwszorzędne znaczenie w studjach procesu oddychania anaerobijnego wogóle a w procesie fermentacji alkoholowej w szczególności, przeprowadził autor niżej opisane doświadczenia nad przenoszeniem czynnego wodoru z siarkowodoru gazowego (SH_2) na tlen powietrza, działający tu jako akceptor wodoru, w obecności katalizatora mineralnego a mianowicie drucika platynowego. Doświadczenie to uzasadnione jest tem, że siarkowodor zachowuje się wobec akceptorów wodoru zupełnie podobnie jak grupa tiolowa glutationu, a zagęszczenie reagujących czynników na powierzchni platyny znajduje swą analogję w zagęszczaniu tych czynników na powierzchni micel koloidów enzymatycznych.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.

M E T O D A.

Do doświadczeń używano siarkowodoru wywiązywanego z siarczku żelazawego zapomocą kwasu solnego w aparacie Kippa. Gaz przepłukiwano wodą i wprowadzano w kolbę Erlenmeyera pojemności 250 cm^3 .

Jako katalizatora, używano drucika platynowego, utwierdzonego w precyzyjnym szklanym i zagiętego w oczko, jakiego się zwykle używa w pracy bakterjologicznej.

Kolbę, napełnioną siarkowodorem i ewentualnie zawierającą odpowiednie inne substancje badane, trzymano w położeniu niemal poziomem w chwili wprowadzania w nią drucika platynowego, uprzednio nieco ogrzanego w płomieniu palnika gazowego.

I.

a) *Utlenianie siarkowodoru.*

Po wprowadzeniu do kolby napełnionej siarkowodorem drucika platynowego, uprzednio rozżarzonego do czerwoności, nastąpiło natychmiast zapalenie się wybuchowe gazu z równoczesnym ogrzaniem się ścian kolby, na której utworzył się wkrótce nalot siarki spływającej wraz z kropelkami wody na dno kolby. Po następnej dodaniu nieco wody otrzymano mleczno-białą zawiesinę wraz z żółtym kwiatem siarczanym.

b) *Utlenianie siarkowodoru w obecności wody.*

Utlenianie katalityczne siarkowodoru w obecności 10 cm³ wody, uprzednio nasyconej siarkowodorem, przebiegało z eksplozją nieco słabszą, niż reakcja samego gazu. Proces, zapoczątkowany w fazie gazowej, przenosił się szybko na fazę płyną; woda mętniała w ciągu kilkunastu sekund i tworzyła płyn mleczno-biały. Ten, odsączony od nieznacznej zresztą ilości żółtego kwiatu siarczanego, zadano kilku kropkami kwasu solnego i ogrzano w celu odpędzenia śladów siarkowodoru i strącenia siarki koloidalnej, która osadziła się w płynie zostawionym przez pewien czas w spokoju. Filtrat klarowny i bezbarwny zadano kilku kropkami 10% roztworu chlorku baru. Otrzymano nieco siarczanu baru, co dowodzi, że działanie tlenu nie ograniczało się tu tylko do odwodornienia siarkowodoru lecz częściowo także prowadziło do jego utlenienia na kwas siarkowy.

II.

Po ogólnym zorientowaniu się nad reakcją czystego siarkowodoru, poddano badaniu najpierw czyste substancje, których wpływ na katalityczne utlenianie siarkowodoru miano rozpatrywać.

a) *Metanol*.

10 cm³ metanolu, uprzednio przedestylowanego z nad wapna palonego, umieszczono na dnie kolby. Drucik platynowy ogrzano do czerwoności a skoro zaczął gasnąć, wprowadzono go do wnętrza kolby poziomo trzymanej. Drucik zaczął się spowrotem rozżarzać aż do białości, poczem nastąpiło zapalenie się pary metanolu z silną eksplozją.

Podczas spontanicznego rozżarzania się drucika zachodziło rozgrzewanie się ściany kolby w miejscu najbliższym drucika położonem. Po eksplozji pary metanolu, płynna jego część nie ulegała zapaleniu. Kiedy niezwłocznie włożono ponownie drucik, nawet bardzo silnie rozżarzony, zapalenie się pary nie nastąpiło, a drucik bardzo słabo lub nawet wcale się nie rozżarzył. Jeśli jednak pozostawiono kolbę otwartą przez pewien czas w spokoju w położeniu pionowem, można było ponownie wywołać eksplozję. W ten sposób, używając pięcio- lub dziesięciominutowych przerw, można było powtarzać wielokrotnie wybuchowe zapalenie się gazu na tej samej próbce metanolu. Przerwy spoczynkowe były niezbędne w celu umożliwienia ulotnienia się produktów spalania, które hamowały dalszą reakcję. Jeśli kolbę zatknano natychmiast po eksplozji, zahamowanie dalszej reakcji trwało bez zmiany całemi godzinami. Prawdopodobnie tlenek węgla był owym produktem reakcji, który uniemożliwiał dalsze eksplozywne utlenianie pary metanolu. Aldehyd mrówkowy i ślady wody, jakie również w owej reakcji, powstawały, nie hamowały zbyt eksplozji, jeśli je oczywiście dodano w niedużej ilości.

Spontaniczne rozżarzanie się drucika ciepłem reakcji wewnątrz kolby, zawierającej nieco metanolu, nie następowało we wszystkich dowolnych lecz tylko w pewnych miejscach. Gorący drucik, wprowadzony tuż nad powierzchnię metanolu, rozżarzał się bardzo powoli i gasł w chwili dotknięcia nim płynu; w miarę zaś podnoszenia go w górę, zaczynał się spowrotem coraz to silniej rozżarzać. Miejsce, w którem owe spontaniczne rozżarzanie się było najenergiczniejsze i prowadziło do eksplozji, było w odległości około 1,5 cm od dna i od górnej części kolby trzymanej poziomo. Punkt ten nazwano tu, dla krótkości, *katalitycznem ogniskiem fazy gazowej*. Położenie tego ogniska zależy od optymalnej koncentracji pary metanolu i tlenu powietrza wchodzących w reakcję na powierzchni drucika platynowego. W dalszych próbach katalitycznego utlenienia pary metanolu wchodzą w grę także produkty uprzedniego spalania, które hamują reakcję i powodują przesunięcie położenia owego ogniska w kierunku wylotu

kolby. Rozmiary katalitycznego ogniska są stosunkowo nieduże; świadczy o tem przesuwanie się żarzącego się pola na druciku od końca ku jego nasadzie lub w kierunku odwrotnym podczas powolnego posuwania drucika wewnątrz kolby poziomo trzymanej. W pewnym miejscu można było wówczas spowodować rozżarzenie się drucika tylko na odcinku około 2 mm długim i to pośrodku lub też bliżej końca drucika; można też było następnie przesunąć owo świecenie drucika na jego oczko i przy znalezieniu ogniska wywołać rozżarzenie się do białego żaru większej części drucika i spowodować eksplozję. Owo fluktuacja w położeniu ogniska katalitycznego, silnie się zaznaczająca po wielokrotnie powtórzonych spaleniach tej samej próbki metanolu, świadczy o tem, że faza gazowa nie jest jednolita lecz utworzona z kilku warstw, w których poszczególne składniki są w rozmaitej koncentracji. Ciągła dyfuzja gazów do wnętrza i nazewnątrz kolby powoduje zaburzenia w owych koncentracjach i przez to samo zmianę w położeniu ogniska. Warstwa o optymalnej mieszaninie gazów ma postać spłaszczonego stożka, którego szczyt skierowany jest ku szyjce kolby. Ognisko leży w pobliżu podstawy owego stożka, która przy pierwszej eksplozji leży w pobliżu dna i górnej części kolby poziomo trzymanej, a w następnych próbach przesuwa się ku jej wylotowi. (Nie zdołano zauważyć podobnego ogniska w kolbie napełnionej siarkowodorem ani też nie można było uchwycić w nim stopniowego rozżarzania się drucika, gdyż do wybuchowego utleniania tego gazu trzeba było wewnątrz wprowadzić drucik już silnie uprzednio rozżarzony).

b) *Etanol*.

Pary etanolu absolutnego, świeżo przedestylowanego z nadwapna palonego i umieszczonego w kolbie, ulegały tylko jeden raz eksplozji. Ponowne próby zapalenia nawet po dłuższych przerwach początkowych nie udawały się.

c) *Amylól i propylól*, badane w takich samych warunkach, co powyższe alkohole, nie nadawały się zapalenia ich pary.

III.

WPLYW ALKOHOLI NA UTLENIANIE SIARKOWODORU.

1) 10 cm³ *metanolu* nasycono siarkowodorem w kolbie pojemności 250 cm³. Drucik, rozżarzony do czerwoności, wywołał łagodne zapalenie w pobliżu wylotu kolby lecz nie w głębi naczynia.

nia. Po 10-ciu minutowej przerwie spoczynkowej zdołano ponownie wywołać spalanie się płomienne pozostałej reszty siarkowodoru. W pierwszych kilku takich reakcjach zachodziło łagodne spalanie się i to przeważnie samego siarkowodoru. Nalot siarki tworzył się słabo. Po wyczerpaniu większości siarkowodoru zaczęło występować w następnych próbach katalizy coraz to energiczniejsze wybuchowe spalanie się metanolu tak, iż ostatecznie po każdej przerwie spoczynkowej występowało eksplozywne zapalenie się pary metanolu, poprzedzane przez charakterystyczne samorozżarzanie się drucika, jakiego nie obserwowano w pierwszych kilku próbach.

2) *Etanol* hamował zapalenie się siarkowodoru o wiele silniej, niż metanol. Wprawdzie przy pierwszym wprowadzeniu rozżarzonego drucika nastąpiło, bardzo słabe zresztą, zapalenie się siarkowodoru u wylotu kolby, następne jednak próby dały wyniki ujemne nawet po długich przerwach.

3) *Alkohol amyłowy* nie hamował zapalenia się siarkowodoru w fazie gazowej.

Katalityczne utlenienie siarkowodoru było bardzo silnie hamowane przez aldehyd mrówkowy i octowy oraz przez aceton. Reakcje te będą rozpatrywane później.

DYSKUSJA I WNIOSKI.

Wyżej opisane doświadczenia wykazały, że utlenianie siarkowodoru jest hamowane przez pary alkoholi i vice versa. Z tego można wnioskować, że obok innych produktów rozkładu cukrów także alkohol może utrudniać przenoszenie wodoru z grupy tiolowej glutationu na odpowiednie akceptory wodoru, powstające w procesie fermentacji alkoholowej cukru i że na odwrót alkohol może być chroniony przed swem utlenianiem się przez glutation uwodorniony.

Mamy w tym przypadku t. zw. konkurencję substratu, zauważoną też w niektórych innych doświadczeniach. Pewną analogję znajdujemy pod tym względem w przemijającym hamowaniu działania oksydazy ziemniaka na α -naftol i p-fenylendwuamin przez glutation uwodorniony, jak to zauważył B e r s i n (8) oraz w utrudnianiu samoutleniania się adrenaliny w obecności glutationu, opisanem przez W e l c h a (9). W obu tych razach utlenianie badanych substancyj następuje dopiero po zupełnem uprzednim utlenieniu glutationu.

SUMMARY.

A hot platinum wire, put into an open flask containing sulfurhydrogen, caused immediately an explosive combustion of the gas.

A warm platinum wire, put into an open 250 cc. Erlenmeyerflask containing ca. 10 cc. of methanol, was spontaneously heated to a white glow by the heat of the reaction which was followed by an explosive combustion of methanol vapors. A further explosive oxidation of methanol vapors could be produced first after a 5 to 10 minutes pause. An optimal concentration of the gaseous reagents inside the flask which facilitated an explosion was called a *catalytic focus*. It was localized at a certain point inside the flask and was afterwards displaced towards the outlet of the flask in the further series of the combustions.

A catalytic oxidation of sulfurhydrogen in an open 250 cc. Erlenmeyer flask, containing ca. 10 cc. of methanol, was markedly retarded, and the catalytic focus was at first displaced towards the neck of the flask. First after a several times repeated combustion of sulfurhydrogen a catalytic combustion of the vapors of methanol could be continued.

The catalytic oxidation of sulfurhydrogen was much more inhibited by the vapors of ethanol than by those of methanol.

Since the thiol-groupe of glutathione and the sulfurhydrogen behave similarly towards the acceptors of hydrogen it can be from the above observations concluded that a dehydrogenation of glutathione in the process of an alcoholic fermentation can be inhibited by ethanol and, vice versa, the oxidation of alcohol can be retarded in the presence of glutathione.

LITERATURA.

1. Kozłowski: Biochem. J. **20**, 1346, (1926).
2. Meyerhof: Pflügers Arch. **170**, 267 i 428, (1918); Ztschr. physiol. Chem. **101**, 165, (1918); **102**, 1, (1918).
3. Harden and Young: Proc. Roy. Soc. London, **77**, 405, (1906); **80**, 229, (1908); **82**, 321, (1910). Robinson: Biochem. J. **16**, 809, (1922).
4. Embden: Ztschr. physiol. Chem. **93**, str. 24, 94, 124, (1914); **98**, 181, (1916).
5. Waldschmidt-Leitz u. Schöffner: Naturwissensch. **20**, 122, (1932).
6. Auhagen: Biochem. Ztschr. **263**, 247, (1934).
7. Euler i współpracownicy: Ztschr. physiol. Chem. **139**, 15, (1924); **169**, 102, (1927); **178**, 238, (1928).
8. Bersin: Ergbn. d. Enzymforschg. **4**, 95, (1935).
9. Welch: Am. J. Physiol. **198**, 369, (1934).