

M. CHORAŻY

## BILANS AZOTOWY U SZCZURÓW OBARCZONYCH MIĘSAKIEM

*Z Instytutu Onkologii — Oddział w Gliwicach*

*Dyrektor: Dr med. Jeremi Święcki*

*Zakład Biologii Nowotworów*

*Kierownik: Prof. dr K. Dux*

Nowotwór w czasie swego wzrostu, stawia nowe — nie istniejące w organizmie zdrowym — wymagania wobec przemiany materii gospodarza. Nie wiemy dokładnie, w jaki sposób ustrój gospodarza zaspokaja zapotrzebowanie białkowe rozwijającej się tkanki nowotworowej.

W literaturze panuje na ogół przekonanie, że nowotwór rośnie na koszt tkanek gospodarza, z których czerpie zarówno materiał budulcowy, jak i energetyczny [18], [20], [24], [29], [30]. Następstwem takiej gospodarki ma być stopniowe wyniszczenie prowadzące w końcu do śmierci nosiciela guza.

Istnieją również nieliczne prace doświadczalne, które wskazują na możliwość zaopatrywania guza nowotworowego w białko przez oszczędniejszą przemianę azotową [4], [8].

Sądziłyśmy, że badania bilansu azotowego w czasie wzrostu nowotworu u doświadczalnych szczurów pozwolą naświetlić przebieg zmian w gospodarce azotowej nosiciela.

Treść niniejszej pracy stanowią następujące badania doświadczalne:

1. określenie bilansu azotowego i przyrostu wagi ciała zwierząt karmionych dietami, o różnych, znanych zawartościach azotu,
2. zbadanie wpływu wzrostu przeszczepialnego mięsaka na bilans azotowy i przyrost wagi ciała gospodarza,
3. określenie zależności między zatrzymywaniem azotu w ustroju a przyrostem wagi guza.

## Material i metoda

### A. ZWIERZĘTA I WARUNKI DOŚWIADCZENIA

Badania wykonano na białych szczurach, samcach własnego chowu. Początkowa waga zwierząt wahała się około 120—130 g, przy czym dla poszczególnych doświadczeń dobierano zwierzęta jednakowego wieku i zbliżonej wagi. Szczury umieszczano pojedynczo w klatkach metabolicznych [7]. W czasie doświadczenia zwierzęta przebywały w szafie-termostacie o stałej temperaturze  $+24^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ), z którego wyjmowano je jedynie na czas karmienia ( $3 \times$  dziennie na przeciąg około 3 minut). Do termostatu dochodziło światło dzienne. Szczury ważono co drugi dzień rano zaraz po karmieniu i od wagi szczura odejmowano wagę podawanego pokarmu.

### B. PRZESZCZEPY MIĘSAKA

Wycinki tkanki mięsaka wagi 80—100 mg (11 i 12 pasaż nowotworu wywołanego metylcholantrenem, Kalicińscy [20]) wszczepiano do podskórnej kieszonki okolicy łądzwiowej, a ranę zamykano klamerką.

Podobnie postępowano ze szczurami kontrolnymi, którym nie wszczepiano jednak nowotworu. Mięsak ten charakteryzuje się dość szybkim wzrostem, nie daje przerzutów, a jego przeszczepy przyjmują się blisko w 100%. Po ukończeniu doświadczeń zwierzęta zabijano przez skrwawienie w lekkiej narkozie eterowej. Wypreparowane i oczyszczone z otaczającej tkanki łącznej guzy ważono i homogenizowano z trzykrotną ilością wody. Azot oznaczano w 3 naważkach homogenizatów każdego guza.

### C. DIETA I SPOSÓB KARMIENIA

Zwierzęta karmiono płynną dietą, podawaną przy pomocy zgłębnika żołądkowego (cienki, gumowy cewnik Nelatona) i strzykawki. Podstawowa dieta stosowana w doświadczeniach miała skład wg pierwszego zestawienia na str. 133 (ilości przypadające na 1 szczura na 2 doby). Dieta poniższa określana jest dalej jako „dieta I”<sup>1</sup>. „Dieta II” zawierała 300 mg, a „dieta III” — 152 mg azotu na 1 szczura na 48 godz. Zawartość białka w diecie II i III obniżano przez zmniejszenie ilości sproszkowanego mleka. Wartość kaloryczna diet uboższych w białko (II i III) była taka jak „diety I” dzięki dodaniu odpowiednich ilości węglowodanów. Zestawienie podane na str. 133 ilustruje ilościowe różnice składników pokarmowych stosowanych diet (ilości składników podano w gramach na jednego szczura 48 godz.).

<sup>1</sup> W późniejszych doświadczeniach używano mleka w proszku nieco uboższego w białko. W ilości diety I, przypadającej na 1 szczura/48 godz. było 572 mg azotu.



Inne składniki dodawano do diety II i III w ilościach takich samych jak w diecie I.

Zawartość węglowodanów i tłuszczów oraz wartość kaloryczną obliczono z tablic [16], a ilość azotu na podstawie analizy poszczególnych składników diety. Białko obliczono z zawartości azotu używając współczynnika 6,25. Suche składniki diety przechowywano w eksykatorach.

#### Dieta I

Składniki	g	2-dobowa ilość diety zawierała:				
		azot mg	białko g	węglowodany g	tłuszcze g	kalorie g
Mleko odtłuszczone suszone	10,84	596	3,6	7,0		44
Skrobia pszenna . . . . .	6,04	4		6,0		24
Cukier buraczany . . . . .	3,00			3,0		12
Olej lniany . . . . .	2,0				2,0	18
Mieszanka soli <sup>2</sup> . . . . .	0,7					
Mieszanka witamin <sup>3</sup> ml . . . . .	1,0					
Woda destylowana ml . . . . .	26,42					
Razem . . . . .	50,00	600	3,6	16,0	2,0	98

Do diety dodawano ponadto: tran (1 kropla na 1 szczura na 2 doby), płyn Lugola (1 kp. na 1 szczura na 4 doby), roztwór chlorku kobaltu (ok. 0,4 µg na 1 szczura na 1 dobę).

#### Zestawienie diet

Składniki	Dieta I	Dieta II	Dieta III
Mleko odtłuszczone suszone . . . . .	10,84	5,34	2,60
Skrobia pszenna . . . . .	6,04	9,60	11,52
Cukier buraczany . . . . .	3,00	4,80	5,76

<sup>2</sup> używano mieszanki Osborne-Mendel Nr 2 [13].

<sup>3</sup> mieszankę witamin sporządzano z następujących składników:

a) tiamina (roztw.) — 12 mg, b) ryboflawina (subst.) — 24 mg, c) niacyna (subst.) — 150 mg, d) pirydoksyna (subst.) — 12 mg, e) pantotnian wapnia (subst.) — 75 mg, f) kwas p-aminobenzoowy (subst.) — 75 mg, g) kwas foliowy (subst.) — 3 mg, h) biotyna (subst.) — 1 mg, i) naftochinon (roztw.) — 15 mg, j) tokoferol (roztw. ol.) — 300 mg, k) alkohol etylowy 20% — 150 g. Do powyższej mieszanki dodawano: chlorowodorek choliny (subst.) — 1.500 mg, inozytol (subst.) — 300 mg. Mieszankę po przesączeniu przez bibułę zakwaszono do pH 3,4 rozcieńczonym kwasem solnym i przechowywano w chłodni o temperaturze +4°C. 0,5 ml tej mieszaniny zawierało ilość witamin równą dobowemu zapotrzebowaniu jednego rosnącego szczura [11].

Tak wzbogaconą dietę ułożono z myślą o konieczności odżywiania szczurów w ciągu długiego okresu.

Mieszaninę wymienionych składników diety homogenizowano w ciągu około 5 min. w aparacie „Cyklon” uzyskując masę o konsystencji śmietany. Przechowywano ją w chłodni (+4°C) w zakorkowanej kolbie z szklanymi perełkami, z której po dokładnym zmieszaniu odlewano ilość potrzebną każdorazowo do karmienia. Dietę przyrządzano zwykle na okres 5 dni. W ciągu doświadczeń okresowo sprawdzano zawartość azotu w diecie. Woda destylowana była udostępniona zwierzętom do woli.

Szczury karmiono 3 × dziennie w godzinach: 7<sup>30</sup>—8<sup>15</sup>, 13<sup>30</sup>—14<sup>15</sup> i 17<sup>30</sup>—18<sup>15</sup>. Przed karmieniem dietę ogrzewano na łaźni wodnej do temp. +38°C. W czasie rannego karmienia każdemu szczurowi podawano 9,0 g diety, a w następnych karmieniach po 8,0 g diety (błąd = 0,5%). Strzykawkę, którą podawano dietę cechowano okresowo (przeliczano objętość podgrzanej do +38°C diety na wagę).

Właściwe doświadczenie rozpoczynano po 5—7-dniowym okresie karmienia zgłębnikiem, w którym to czasie szczury przyzwyczajały się do nowych warunków odżywiania.

#### D. ANALIZA WYDALIN

Mocz zbierano do odbieralników zawierających 3 ml 10% roztworu kwasu cytrynowego i kryształek tymolu: kał — do dużych naczynek wagowych zawierających wodę destylowaną z dodatkiem tymolu. Do chwili oznaczeń kał i mocz przechowywano w chłodni.

Całkowity azot oznaczano w moczu i kale zbieranych co 48 godz. Mocz sączono przez bibułę i przenoszono ilościowo do kolb miarowych, których zawartość uzupełniono wodą destylowaną do 500 ml.

Z każdej kolby pobierano 3 próbki po 2 ml do oznaczeń azotu. Kał z dodatkiem niewielkiej ilości wody homogenizowano przy użyciu mieszadła mechanicznego na rzadką papkę, następnie całość ważono i pobierano 3 naważki do wykonania analizy. Azot oznaczano metodą mikro-Kjeldahla. Jako katalizatora do spalań próbek stosowano CuSO<sub>4</sub>. Spalanie kończono w 20—30 min. po wyklarowaniu się próbki.

Amoniak oddestylowywano do kwasu borowego z czerwienią metylową jako wskaźnikiem. Do miareczkowania używano 0,02 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Czułość metody oznaczona na wzorcowym roztworze siarczanu amonu wynosiła: 0,086 mg azotu z błędem 11,5%

0,172 mg azotu z błędem 1,7%

Błąd względny przy oznaczaniu azotu w moczu wynosił średnio 0,6% przy oznaczaniu kału 1,4%, oraz przy oznaczaniu homogenizatów guzów 2,9%. W próbkach kału, moczu i diety oraz homogenizatów guzów branych do spalań znajdowała się ilość azotu rzędu kilku miligramów.



Metodę sprawdzano stosując stale ślepe próby oraz okresowo przy użyciu wzorowego roztworu siarczanu amonu. Ilość azotu wyrażano w mg na ilość moczu i kału wydalonych w ciągu 48 godz. przez jednego szczura.

Wartość średniej arytmetycznej odchylenia wzorcowego oraz średniego błędu średniej obliczano według odpowiednich wzorów [15], [23].

### Doświadczenie wstępne

Przed wykonaniem doświadczenia ze szczurami obarczonymi mięsakiem nasunęła się konieczność określenia takiej najmniejszej ilości azotu, jaka podana w pokarmie szczurom normalnym utrzymywałaby szybkość ich wzrostu w tempie zbliżonym do szczurów zdrowych, karmionych standardową dietą w dowolnych ilościach. W zasadzie rosnące zwierzęta powinny otrzymywać wzrastające ilości białek w pokarmie odpowiednio do zwiększania się wagi ciała. Postulatu tego nie spełniono ze względu na krótkotrwały okres doświadczenia i łatwiejsze opracowanie bilansu azotowego przy jednakowej ilości podawanych substancji azotowych.

Sześć szczurów jednakowego wieku, samców, wagi około 135 g umieszczono pojedynczo w klatkach metabolicznych w termostacie. Zwierzęta karmiono przy pomocy zgłębnika. Dwom szczurom podawano dietę III, następnym dwom dietę II, ostatnim dwom zwierzętom dietę I. W odstępach 48-godzinnych obliczano bilans azotowy szczurów karmionych poszczególnymi dietami. Średni, 48-godzinny przyrost wagi szczurów karmionych zgłębnikiem dietami I, II, III porównano ze średnim 48-godzinnym przyrostem wagi 12 szczurów, samców, karmionych dowolną ilością standardowej diety PZH (Dajkowska i Szczygieł [9]).

Obydwie grupy zwierząt obserwowano w ciągu 24 dni.

### Wyniki badań

#### I. BILANS AZOTOWY I PRZYROST WAGI SZCZURÓW ZDROWYCH KARMIONYCH DIETAMI O RÓŻNEJ ZAWARTOŚCI AZOTU

Warunki tego doświadczenia omówiono wyżej w punkcie „Doświadczenie wstępne”. Średnią zawartość azotu w dietach, kale i moczu, średnie ilości azotu wchłoniętego, bilans azotowy oraz średni przyrost wagi szczurów karmionych zgłębnikiem i odżywiających się w sposób dowolny podaje tabela 1.

Przyrost wagi szczurów karmionych dietą ubogą w azot (dieta III) był nieznaczny. U zwierząt tych stwierdzono ujemny bilans azotowy. Szczury stawały się mało ruchliwe, apatyczne. Waga szczurów karmionych dietą zawierającą 4 razy więcej składników azotowych (dieta I) wzrastała niemal 7-krotnie szybciej. Średnia przyrostu wagi 2 szczurów karmionych

tą dietą jest zbliżona do średniej uzyskanej z obserwacji 12 szczurów, karmionych do woli standardową dietą PZH. Szczury karmione dietą I były normalnie ruchliwe, nie wykazywały cech niedożywienia. U zwierząt tych w okresie 24 dni stwierdzono stały, dodatni bilans azotowy.

Tabela 1

Ilość szczurów	Dieta	Azot pokarmu (a)	Azot kału (b)	Azot wchłon. (a-b)	Azot moczu (c)	Bilans azotowy a-(b+c)	Przyrost wagi g/48 godz.
		mg/48 godz.					
2	III	152	32	120	125	-5	0,6
2	II	300	60	240	171	+69	2,4
2	I	601	104	497	352	+146	4,1
12	dieta PZH w dowolnej ilości						5,3

Średnie wartości bilansu azotowego i przyrostu wagi szczurów karmionych zgłębnikiem dietami o różnej zawartości azotu oraz przyrost wagi szczurów karmionych dietą PZH w dowolnej ilości.

Średnie obliczono z oznaczeń azotu i przyrostu wagi ciała w odstępach 48 godz. wykonanych w ciągu 24 dni.

## 2. WPŁYW WZROSTU MIĘSAKA NA BILANS AZOTOWY I PRZYROST WAGI SZCZURÓW

Doświadczenie przeprowadzono na 9 szczurach o wadze początkowej około 120 g. W pierwszym dniu doświadczenia 6 zwierzętom wszczepiono fragmenty mięsaka, u 3 szczurów wykonano zabieg pozorny, tzn. nacinano skórę bez wszczepienia im nowotworu (grupa kontrolna). Zwierzętom podawano zgłębnikiem dietę zawierającą 572 mg azotu/48 godz.

Począwszy od następnego dnia po implantacji nowotworu wykonywano oznaczenia całkowitego azotu w kale i moczu. Czas obserwacji zwierząt z nowotworem wynosił około 32 dni, zwierząt kontrolnych 36 dni.

Tabela 2 przedstawia średni, bezwzględny przyrost wagi oraz bilans azotowy zwierząt z wszczepionym nowotworem i kontrolnych. Mniej więcej do 16 dnia obserwacji przyrost wagi obu grup szczurów jest zbliżony; później przyrost wagi szczurów nowotworowych jest szybszy.

Bilans azotowy po 16 dniu w ostatniej grupie zwierząt ma wyższe wartości w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Otrzymane — w miarę upływu czasu — różnice w przyroście wagi i bilansie azotowym umożliwiły rozdzielenie spostrzeżeń na 2 okresy: wcześniejszy i późniejszy.

Tabela 3 zawiera średnie wartości bilansu azotowego i przyrostu wagi obydwu grup szczurów obliczone dla 2 okresów doświadczenia.



Tabela 2

Dzień obserwacji	Bilans azotowy mg/48 godz. szczurów		Przyrost wagi g/48 godz. szczurów	
	kontrolnych	z nowotworem	kontrolnych	z nowotworem
4	+ 173	+ 173	4,3	4,5
6	+ 141	+ 159	2,3	4,0
8	+ 156	+ 158	7,3	6,5
10	+ 157	+ 162	3,3	4,1
12	+ 127	+ 149	4,3	4,0
14	+ 171	+ 168	3,3	4,6
16	+ 127	+ 159	3,6	4,5
18	+ 132	+ 163	1,6	4,5
20	+ 136	+ 169	1,6	6,6
22	+ 125	+ 176	5,3	8,1
24	+ 112	+ 188	3,6	9,3
26	+ 100	+ 193	3,0	10,6
28	+ 123	+ 221	2,6	7,3
30	+ 135	+ 199	5,0	10,5
32	+ 123	+ 209	4,0	10,5

Srednie wartości bilansu azotowego i przyrostu wagi szczurów z wszczepionym mięsakiem oraz kontrolnych. Przez okres całego doświadczenia zwierzęta karmiono zglębniakiem, dietą płynną zawierającą 572 mg azotu/48 godz. Wszczepienie nowotworu nastąpiło w pierwszym dniu obserwacji. Średnie uzyskano z obserwacji 6 szczurów obarczonych mięsakiem i 3 szczurów kontrolnych.

W I okresie, wcześniejszym, obejmującym 4--16 dzień doświadczenia średni przyrost wagi szczurów obarczonych nowotworem nie różni się od średniego przyrostu wagi szczurów kontrolnych. W drugim okresie, późniejszym (18--32 dzień obserwacji) różnice te są istotne. Szczury z nowotworem przybierają średnio na wadze w ciągu 48 godz. 8,0 g, szczury kontrolne tylko 3,3 g (tabela 3).

Podobnie przedstawia się bilans azotowy: w I okresie średnia retencja azotu w ciągu 48 godzin u szczurów kontrolnych wynosi 150 mg, u nowotworowych wprawdzie nieco więcej, mianowicie 162 mg, ale różnica ta nie jest jednak statystycznie istotna. Natomiast w II okresie różnica ta jest istotna ( $P < 0,01$ ): bilans azotowy szczurów nowotworowych ustala się na wyraźnie wyższych wartościach (+186 mg N/48 godz.) w porównaniu ze szczurami kontrolnymi (+ 123 mg N/48 godz.).

Należy podkreślić, że średnie wartości wyrażające bilans azotowy w II okresie nie odzwierciedlają zachowania się tego zjawiska w czasie. W miarę upływu czasu wraz ze wzrostem guza wzrasta stopniowo ilość azotu zatrzymywanego w ustroju zwierzęcia (rys. 1); — średnia obliczona dla całego okresu tego nie ilustruje. Stopniowe zwiększanie się ilości za-

Tabela 3

	I okres (4–16 dzień obs.)			II okres (18–32 dzień obs.)		
	szczury kontrolne (A)	szczury nowotw. (B)	różnica między (A) i (B)	szczury kontrolne (A)	szczury nowotw. (B)	różnica między (A) i (B)
Ilość szczurów	3	6		3	6	
Azot pokarmu mg/48 godz. (a)	572	572		572	572	
Azot kału mg/48 godz. (b)	89	86		88	86	
Azot wchłonięty mg/48 godz. (a–b)	483	486		484	486	
Bilans azotowy (retencja azotu) mg/48 godz. [a–(b+c)]	150 ± 34,3	162 ± 22,8	12 P > 0,1	123 ± 18,4	186 ± 29,3	63 P < 0,01
Przyrost wagi g/48 godz.	4,3 ± 2,0 ± 0,40	4,8 ± 1,5 ± 0,21	0,5 P > 0,9	3,3 ± 1,9 ± 0,42	8,0 ± 3,1 ± 0,51	4,7 P < 0,01

Srednie wartości bilansu azotowego i przyrostu wagi szczurów obarczonych mięsakiem i kontrolnych. Obydwie grupy zwierząt karmiono zgłębnikiem.

Srednie obliczono z wartości dla pojedynczego szczura w odstępach 48 godz. Poniżej średnich wartości bilansu azotowego i przyrostu wagi podano wielkość odchylenia wzorcowego (δ) oraz średni błąd średniej (ε). Różnicę uznawano za statystycznie istotną gdy  $P_2 \leq 0,05$ .

trzymywanego azotu wpływa też na wzrost wartości odchylenia wzorcowego średniej (σ).

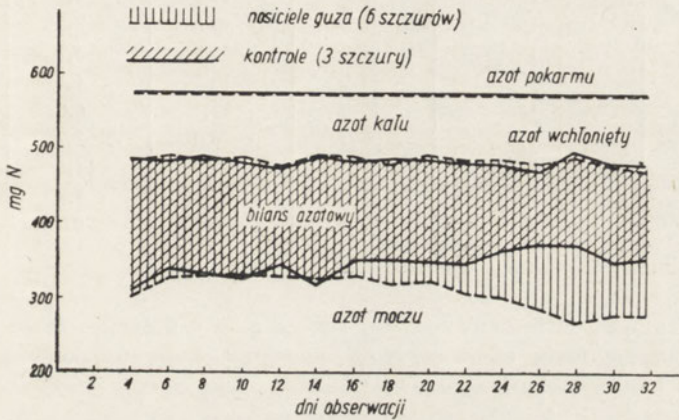
Wydalanie azotu z kałem u szczurów kontrolnych jak i nowotworowych zarówno w I jak i w II okresie utrzymuje się na jednakowym poziomie i ulega niewielkim wahaniom w ciągu 48 godz. (tabela 3, rys. 1).

Ilość azotu wchłoniętego z przewodu pokarmowego u obydwu grup zwierząt w ciągu całego okresu obserwacji przyjmuje zatem również wartości jednakowe.

Wyższe wartości bilansu azotowego u szczurów nowotworowych w porównaniu z bilansem azotowym u szczurów kontrolnych są wynikiem zmniejszonego wydalania składników azotowych w moczu szczurów obar-



czonych nowotworem (tabela 3, rys. 1). Na rys. 1, pole zakreskowane skośnie obrazuje bilans azotowy (bilans azotowy = azot wchłonięty — azot moczu) u szczurów kontrolnych, a obszar zakreskowany pionowo bilans zwierząt z nowotworem. Z wykresu tego wynika, że bilans azotowy szczurów z wszczepionym mięsakiem począwszy od 16 dnia obserwacji przybiera wyższe wartości w porównaniu ze szczurami kontrolnymi, wskutek wydalania przez szczury chore coraz to mniejszych ilości azotu z moczem.



Rys. 1. Współzależność między średnią ilością azotu pokarmu, kału, moczu, azotu wchłoniętego i średnim bilansem azotowym szczurów kontrolnych i obciążonych mięsakiem. Obydwie grupy zwierząt karmiono zgłębnikiem. Nowotwór został wszczepiony w pierwszym dniu doświadczenia

### 3. ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY RETENCJĄ AZOTU A PRZYROSTEM WAGI GUZA

Przyczyną stopniowego zwiększania się bilansu azotowego u szczurów obciążonych nowotworem jest rosnąca masa tkanki nowotworowej. Dowodu dostarcza tutaj porównanie zależności między wzrostem guza a bilansem azotowym. Na rys. 2 kropkową linią<sup>4</sup> uwidoczniło przyrost wagi ciała (bez guza) szczurów nowotworowych w II okresie obserwacji. Widzimy, że mięsak w danych warunkach doświadczenia rósł nie powodu-

<sup>4</sup> Linię tę wykreślono w sposób następujący: obliczono średni przyrost wagi ciała szczurów po usunięciu guza w końcu doświadczenia. Przyjęto, że w 12 dniu obserwacji waga guza wynosiła 0,0 g, czyli że na przyrost wagi szczura do tego okresu składał się jedynie przyrost wagi ciała bez guza (guzy w 12 dniu doświadczenia miały średnicę od 0,5 do 1,0 cm, co odpowiada wadze 0,5—0,8 g; tę wartość można bez większego błędu pominąć). Punkty odpowiadające średniemu przyrostowi wagi ciała po ukończeniu obserwacji i średniemu przyrostowi wagi w 12 dniu obserwacji połączono linią prostą.

Tabela 4

Dzień obserwacji	Bilans azotowy mg/48 godz. (a)	Waga guza <sup>5</sup> g (b)	(a) (b)	Wskaźnik tempa przyrostu w %	
				bilansu azot.	wagi guza
12	+ 149	0,0			
14	+ 168	1,0	168,0	12,8	
16	+ 159	2,0	79,8	-5,4	100
18	+ 163	3,5	46,6	2,5	75
20	+ 169	6,5	26,0	3,7	86
22	+ 176	11,5	15,3	4,1	77
24	+ 188	17,0	11,1	6,8	47,9
26	+ 193	24,0	8,0	2,7	41,1
28	+ 221	28,5	7,9	14,5	18,8
30	+ 199	35,5	5,6	-9,9	24,5
32	+ 209	43,0	4,9	5,0	21,1

Zależność między bilansem azotowym i wagą guza a upływem czasu oraz wskaźnikiem tempa przyrostu bilansu i wagi szczurów. Dane uzyskano z obserwacji 6 zwierząt z wszczepionym mięsakiem.

Tabela 5

Waga guza g	Stężenie azotu (mg) w 1 g guza
22	23,8
33	20,6
35	22,5
40	21,5
44	18,8
49	18,0

Wagi guzów usuniętych po ukończeniu doświadczenia oraz stężenie azotu w jednostce mokrej wagi guza

jąc spadku wagi tkanek gospodarza. Przyrost wagi ciała (bez guza) grupy zwierząt z mięsakiem ma podobne tempo jak u szczurów kontrolnych, zatem gwałtowny przyrost całkowitej wagi (szczur + guz) po 16-tym dniu obserwacji wywołany jest przede wszystkim szybkim wzrostem guza.

Współzależność między przyrostem wagi guza a bilansem azotowym przedstawia tabela 4. Bilans azotowy wzrasta wraz ze wzrostem wagi guza, ale wolniej niżby to należało oczekiwać śledząc tempo wzrostu nowotworu. W II okresie doświadczenia iloraz: „bilans azotowy/waga guza“ maleje w miarę upływu czasu. Szybkość przyrostu bilansu azotowego jest mniejsza niż wzrastanie wagi

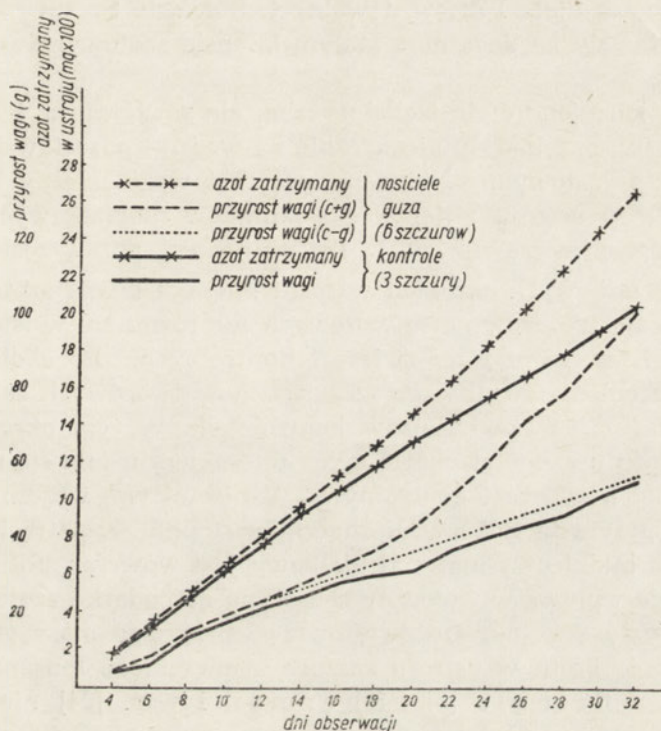
guza — ilustrują to wskaźniki tempa przyrostu obu zmiennych (tabela 4). Powyższe zjawisko nasunęło nam przypuszczenie, że w miarę upływu cza-

<sup>5</sup> Obliczono z wykresu (rys. 3) jako różnicę między przyrostem wagi ciała wraz z guzem a przyrostem wagi ciała bez guza.



su w warunkach karmienia stałą ilością diety spada stężenie azotu w guzie nowotworowym lub w ciele chorego szczura.

W tabeli 5 zestawiono wagi guzów 6 szczurów użytych w naszym doświadczeniu oraz zawartość azotu w 1 g mokrej masy guza. Zestawienie wykazuje, że zawartość azotu w jednostce mokrej wagi guza stop-



Rys. 2. Zestawienie wartości zatrzymanego w ustroju azotu oraz przyrostu wagi ciała szczurów nowotworowych i kontrolnych. Obydwie grupy zwierząt karmiono zgłębnikiem. Podawana dieta zawierała 572 mg azotu na jednego szczura na 48 godzin;

symbol (c + g) oznacza: ciało + guz

„ (c - g) „ „ ciało - guz

niowo maleje w miarę zwiększania się wagi nowotworu. Należy podkreślić, że guz nie przedstawiał tkanki jednorodnej, gdyż w środkowych swych częściach składał się z bezpostaciowych mas martwiczych. W guzach o dużych rozmiarach masy martwicze były bardziej obfite niż w guzach małych.

## Omówienie wyników

1. Bilans azotowy u szczurów karmionych zgłębnikiem przedstawia różne wartości w zależności od ilości substancji azotowych podanych pokarmów. Dieta, której wartość kaloryczna równa się ok. 100 kal/48 godz. a zawartość azotu około 600 mg/48 godz. pozwala uzyskać przyrost wagi młodych szczurów zbliżony do przyrostu wagi szczurów odżywiających się standardową dietą PZH w dowolnych ilościach. Szczury karmione tą dietą pozostawały na dodatnim, stałym bilansie azotowym w ciągu 3 tygodni.

Szczury karmione dietą izokaloryczną, ale zawierającą 4 razy mniejszą ilość azotu, przybierały nieznacznie na wadze i pozostawały na ujemnym bilansie azotowym. Niewielki przyrost wagi zależny był albo od gromadzenia w ustroju zwierzęcia składników niebiałkowych, albo był wynikiem ograniczenia zużycia białka na procesy pozawzrostowe.

2. W początkowych okresach wzrostu mięsaka bilans azotowy i przyrost wagi ciała szczurów nowotworowych nie różnił się w istotny sposób od bilansu i przyrostu wagi zwierząt kontrolnych. Po około 2 tyg. od chwili wszczęcia guza, waga szczurów nowotworowych zaczyna szybciej wzrastać niż waga szczurów kontrolnych. W tym okresie również retencja azotu u zwierząt obarczonych mięsakiem ustala się na wyższym poziomie, niż u zwierząt kontrolnych. W pierwszym, wczesnym okresie, masa guza przyrasta tylko w nieznacznym stopniu. Zapotrzebowanie nowotworu na budulcowy materiał białkowy jest wówczas stosunkowo niewielkie, i nie wpływa w widoczny sposób na gospodarkę azotową ustroju, natomiast wzrasta w okresie gwałtownego przyrostu masy guza. Zwiększoną retencję azotu w ustroju szczura z mięsakiem Jensena zauważyli Cramer i Pringle [8]. Sherman i wsp. [24] nie stwierdzili natomiast różnic w wydalaniu azotu w moczu szczurów z rakiem Walkera i kontrolnych.

Szybki przyrost wagi szczurów z mięsakiem wiąże się z postępującym rozrostem guza. Szybkość przyrostu wagi gospodarza bez guza jest podobna do przyrostu wagi szczurów kontrolnych (rys. 2). W warunkach karmienia zgłębnikiem, dietą wysokokaloryczną, nie obserwowano spadku wagi ciała szczurów nowotworowych. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy [4]. [25]. Spadek wagi ciała zwierząt w okresie rozrostu nowotworu zachodzi wskutek stopniowej utraty łaknienia, gdy zwierzę pobiera karmę w sposób dowolny ([1], cyt. wg Mider'a [18] oraz spostrzeżenia własne).

Wchłanianie się azotu z przewodu pokarmowego przez cały okres obserwacji utrzymywało się na jednakowym poziomie. Mięsak nie wpływa zatem na zmianę ilości wchłoniętego białka. Podobne dane uzyskali Cramer i Pringle [8].



Begg i Dickinson [4] tłumaczą zjawisko zwiększonej retencji azotu u zwierząt z guzem karmionych stałą ilością diety syntetyzowaniem dodatkowej ilości protoplazmy w komórkach nowotworowych. Takie stanowisko określa jednak tylko formalny związek między nowotworem a przemianą azotową. Zmniejszona ilość azotu wydalanego w moczu szczurów nowotworowych jest zapewne przejawem mechanizmów regulujących przemianę białkową w taki sposób, że ustroj zużytkowuje część składników azotowych na syntezę dodatkowych ilości białka.

Wykazywany w procesie rozwoju nowotworu spadek białek surowicy krwi [3], [14], [17], [19], [20], [21], [22], [30], zmniejszona ilość hemoglobiny [4], [5], przeciwciała [28], oraz zwiększenie wysokości fali polarograficznej surowicy [12], wskazują, że w składnikach białkowych krwi i tkanek ustroju obarczonego nowotworem zachodzą ilościowe i jakościowe przesunięcia. Jaka jest kolejność zużytkowania ciał białkowych i jak przebiega przemiana azotowa w ustroju w warunkach narzucenia mu konieczności syntetyzowania dodatkowych ilości białka, nie można wnioskować na podstawie wyników uzyskanych za pomocą metody ujmującej zbiorczo tylko niektóre, końcowe ogniwa przemiany białkowej.

Wyniki nielicznych badań bilansu azotowego w samorzutnych nowotworach u ludzi są sprzeczne; obserwowano zarówno dodatni jak i ujemny bilans azotowy [6], [10], [27] oraz cyt. wg [6] i [27]. Tę rozbieżność wyników można objaśnić znikomą ilością obserwowanych przypadków i różnorodnymi warunkami poszczególnych badań (wiek chorych, zaawansowanie choroby, stan odżywiania i sposób odżywiania chorych, wpływ zastosowanego leczenia itd.).

3. Zmniejszone tempo przyrostu bilansu azotowego w porównaniu z przyrostem wagi guza (tablica 4) jest — być może — wynikiem niedostatecznego pokrycia zwiększającego się zapotrzebowania na białko w miarę wzrostu szczura i guza. To zjawisko może mieć źródło w karmieniu zwierząt niezmienną ilością diety. Można przypuszczać że bilans azotowy ustabiliby się na wyższym poziomie przy wzbogaceniu diety w białko [26]. Jednak — wnioskując z przyrostu wagi guzów szczurów karmionych dietą wysokobiałkową w dowolnych ilościach można przypuszczać, że także waga guza zwiększa się wówczas znacznie wyraźniej.

Guz nowotworowy przybiera na wadze nieproporcjonalnie więcej, niż by to wynikało ze wzrostu ilości bilansu azotowego. Przyrostu wagi guza nie można więc rozpatrywać jako prostego, wyłącznego skutku zwiększonej retencji azotu. W warunkach naszego doświadczenia im cięższy jest

guz nowotworowy tym mniej zawiera azotu w jednostce mokrej wagi guza (tabela 5) <sup>6</sup>.

Nieznaczny spadek stężenia azotu w jednostce wagi guza w miarę wzrostu jego masy stwierdza się również w zestawieniu podanym w pracy Kalicińskich [20].

Zjawisko to można tłumaczyć w różny sposób. Szybki przyrost wagi guza może być spowodowany zwiększonym uwodnieniem jego tkanek. Możliwe, że ustrój gospodarza potrafi w pewnym stopniu zabezpieczyć się przed utratą podstawowego materiału budulcowego, jakim jest białko, i wówczas guz nowotworowy zwiększa swoją masę kosztem materiałów ubogich w azot. Na uwagę zasługuje jeszcze następująca hipoteza: guz w czasie swego wzrostu nie wiąże na stałe składników azotowych: możliwe, że między tkanką nowotworową a tkankami gospodarza istnieje stała wzajemna wymiana aminokwasów i ich połączeń. Przejście składników azotowych nie byłoby więc tylko jednokierunkowe tzn. z koryta krwi i limfy do guza jak to postulował Mider (cyt. wg. [2]), ale mogłyby mieć również kierunek odwrotny. Obumierające komórki nowotworowe mogłyby więc stanowić źródło azotu, którym dysponuje następnie ustrój. Przeciw koncepcji jednokierunkowego przejścia azotu świadczą wyniki badań Babsona i Winnicka [2].

W naszym doświadczeniu przyrost wagi ciała (bez guza) szczurów nowotworowych jest podobny do przyrostu wagi szczurów kontrolnych. U szczurów z mięsakiem nie stwierdzono spadku stężenia azotu w zhomogenizowanych tkankach w porównaniu do tkanek zwierząt kontrolnych <sup>7</sup>, mimo że różnica taka wynika z przeliczenia ilości zatrzymanego w ustroju azotu przypadającego na jednostkę przybranej wagi ciała. Spadek stężenia azotu w tkankach szczura obciążonego nowotworem obserwował Mider [18] i Sherman [24] w warunkach odżywiania dietą w dowolnej ilości. Wyniki badań Kalicińskich [20] nie dają odpowiedzi na pytanie, czy nowotwór czerpie azot z tkanek gospodarza. Autorzy ci tylko sugerują, że taki proces może mieć miejsce. Za pobieraniem azotu przez nowotwór z tkanek gospodarza przemawia uzyskanie wzrostu przeszczepialnego gruczolako-raka, gruczolu mlekowego u myszy z ujemnym bilansem azotowym [29], [30]. Jednak tempo wzrostu nowotworów w tych warunkach było wolniejsze niż u zwierząt z dodatnim bilansem azotowym. Prawdopodobnie zasadniczy wpływ na omawiane tu zagadnienia ma stan odżywienia i sposób odżywiania nosiciela guza, jak również wartość stosunku masy guza do masy ciała.

<sup>6</sup> Fakt ten potwierdzono później na materiale kilkudziesięciu mięsaków (dane niepublikowane).

<sup>7</sup> Dane te będą przedmiotem osobnego doniesienia.



Ilościowe przesunięcia w azotowych składnikach tkanek gospodarza mogą być maskowane zmianą w zawartości wody tłuszczów i węglowodanów. Bardziej uzasadnionym wydaje się badanie stężenia azotu w tkankach suchych i odtłuszczonych.

### Wnioski

1. Płynna dieta o wartości około 100 Kal/48 godz. zawierająca około 600 mg azotu/48 godz. zapewniała normalny przyrost wagi szczurom, które na początku doświadczenia ważyły około 120 g. U zwierząt tych w ciągu 3 tyg. utrzymywał się dodatni bilans azotowy.  
Szczury karmione dietą izokaloryczną, ale zawierającą 4 razy mniej składników azotowych nie przybierały na wadze i wykazywały ujemny bilans azotowy.
2. a) Przeszczepialny mięsak powodował u szczurów karmionych stałą ilością diety zmiany w przemianie azotowej, które przejawiały się stopniowo zwiększaniem ilości azotu zatrzymywanego w ustroju zwierzęcia przy zmniejszeniu ilości azotu wydalanego z moczem.  
b) W czasie wzrostu nowotworu nie zmieniała się ilość ciał azotowych wchłanianych z przewodu pokarmowego zwierzęcia.  
c) W warunkach przymusowego karmienia zgłębnikiem wzrost mięsaka nie powodował spadku wagi ciała gospodarza.
3. Przyrost wagi guzów nowotworowych w warunkach naszego doświadczenia był szybszy niż to wynika z ilości azotu zatrzymanego w ustroju zwierzęcia. Stwierdzono spadek stężenia azotu w jednostce wagi guza w miarę wzrostu masy nowotworu. Zjawisko to może być wynikiem stopniowego ubożenia w azot martwiczo zmiennych części guza.

---

Panu Profesorowi K. Duxowi za udzielenie cennych wskazówek oraz żonie mojej Kazimierze — lab. med. za pomoc techniczną w przeprowadzonych doświadczeniach składam serdeczne podziękowanie.

### Streszczenie

Zdrowe, młode szczury o wadze początkowej około 120 g karmiono za pomocą zgłębnika dietami izokalorycznymi (ok. 100 Kal./48 godz.) o różnej zawartości białka. Dieta zawierająca około 600 mg azotu/48 godz. zapewniała takim szczurom normalny przyrost wagi i dodatni bilans azo-

towy. Zwierzęta nie przybierały na wadze i wykazywały ujemny bilans azotowy, jeżeli karmione były dietą zawierającą tylko 150 mg azotu/48 godz.

Wpływ wzrostu przeszczepialnego mięsaka na bilans azotowy i przyrost wagi nosiciela guza badano na 6 szczurach, 3 zdrowe zwierzęta służyły jako kontrola. Obie grupy zwierząt karmiono przy pomocy zgłębnika żołądkowego dietą o niezmienniej zawartości azotu, zapewniającą dodatni bilans azotowy. Tę ilość azotu określono na podstawie wyników wstępnego doświadczenia. Szczury z wszczepionym mięsakiem wykazywały w stosunku do zwierząt kontrolnych:

- 1) zwiększoną retencję azotu,
- 2) zwiększony przyrost wagi.

Różnice te zaczynały występować po upływie około 2 tygodni od chwili wszczepienia nowotworu. Zwiększona retencja azotu w ustroju szczurów obarczonych nowotworem występuje w następstwie wydalania coraz to mniejszych ilości ciał azotowych w moczu. Absorpcja azotu z przewodu pokarmowego obu grup zwierząt przez okres całego doświadczenia utrzymywała się na jednakowym poziomie.

Szybkość przyrostu wagi ciała (bez guza) szczurów obarczonych nowotworem była zbliżona do przyrostu wagi szczurów kontrolnych; nowotwór nie powodował spadku wagi ciała nosiciela.

W miarę wzrostu nowotworu retencja azotu w ustroju szczurów zwiększała się, jednak wolniej niż wynosił przyrost wagi szczura. Guzy nowotworowe w miarę wzrostu stawały się uboższe w azot. Wysłunięto przypuszczenie, że — w pewnych warunkach — azot z obumarłych, środkowo położonych części guza nowotworowego może przechodzić do ogólnoustrojowej „puli metabolicznej”.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Babson A. L., *Cancer. Res.* **14**, 89, 1954.
- [2] Babson A. L., Winnick T., *Cancer. Res.* **14**, 606, 1954.
- [3] Bateman J., *Arch. Int. Med.* **83**, 355, 1950.
- [4] Begg R. W., Dickinson T. E., *Cancer Res.* **11**, 409, 1951.
- [5] Begg R. W., *Canc. Res.* **11**, 341, 1951.
- [6] Bolker N., *Am. J. Rentg. Radium Th. Nucl. Med.* **69**, 839, 1953.
- [7] Choraży M., *Acta Physiol. Pol.* **4**, 455, 1955.
- [8] Cramer W., Pringle W., *Proc. Royal Soc., Series B*, **82**, 307, 1909.
- [9] Dajkowska Z., Szczygieł A., *Med. Dośw. Mikrobiol.* **2**, 568, 1950.
- [10] Denoix P. F., Pequinot G., Bernard Ph., Trémolière S., *Mémoire Acad. Chir.* **77**, 863, 1951.
- [11] Farris R. J., Griffith J. Q., *The Rat in Laboratory Investigation*, Philadelphia, London, 1949.
- [12] Godlewski H., Chmielowski J. (doniesienie ustne).



- [13] Hawk P. B., Oser B. L., Summerson W. H., *Practical Physiological Chemistry*, London, 1949.
- [14] Huggins C., *Cancer Res.* 9, 321, 1949.
- [15] Krupiński J., Gorzelak E., *Statystyka w służbie zdrowia*, Warszawa, 1954.
- [16] Mc Cance R. A., Widdowson E. M., *The Chemical Composition of Foods*, London, 1946.
- [17] Mider G. B., Alling E. L., Morton J. J., *Cancer* 3, 56, 1950.
- [18] Mider G. B., *Cancer Res.* 11, 821, 1951.
- [19] Moszczyńska-Kalicińska Z., Kaliciński A., *Pol. Tyg. Lek.* 9, 737, 1954.
- [20] Moszczyńska-Kalicińska Z., Kaliciński A., *Nowotwory* 5, 220, 1955.
- [21] Patermann M. L., Hogness K. R., *Cancer* 1, 100, 1948.
- [22] Rhoads C. P., *J. Nat. Canc. Inst.* 7, 333, 1947.
- [23] Rydygier J., *Pol. Tyg. Lek.* 2, 739 i 775, 1947.
- [24] Sherman C. D., Morton J. J., Mider G. B., *Cancer Res.* 10, 374, 1950.
- [25] Stewart A. G., Begg R. W., *Canc. Res.* 13, 556, 1953.
- [26] Waterhouse Ch., Basset S. H., Holler J. W., *J. Clin. Inv.* 28, 245, 1949.
- [27] Waterhouse Ch., Fenninger., Keutmann E., *Cancer* 4, 300, 1951.
- [28] Wharton D. R. A., Mider G. B., *Cancer Res.* 11, 127, 1951.
- [29] White F. R., Belkin M., *J. Nat. Canc. Inst.* 5, 261, 1945.
- [30] White F. R., *J. Nat. Canc. Inst.* 5, 265, 1945.
- [31] Winzler R. „*Uspiechi w izuczenii raka*”, Moskwa, 1955, T. I, str. 388—436, (tłumaczenie z ang., tytuł oryginału: „*Advances in Cancer Research*”).

## АЗОТНЫЙ БАЛАНС У КРЫС С ПРИВИТОЙ САРКОМОЙ

### Резюме

Здоровые, молодые крысы, имеющие первоначально вес ок. 120 г., были кормлены при помощи желудочного зонда диетами, которых калорийность была постоянной и равнялась ок. 100 кал./48 час., количество же белка было разное. Такие крысы, которых диета содержала ок. 600 мг азота/48 час. нормально прибавляли в весе, а их азотный баланс был положительным. Животные не прибавляли в весе и имели отрицательный азотный баланс если получали диету содержащую лишь 150 мг. азота/48 час. Описаны состав диет и условия опытов.

Две другие группы крыс (6 крыс с имплантированной саркомой и 3 здоровые крысы) были кормлены при помощи желудочного зонда постоянным количеством диеты содержащей такое неизменное количество азота, которое гарантировало бы положительный азотный баланс. В промежутках 48 час. контролировано прирост веса животных и определялось количество азота в кале и в моче.

В отличие от здоровых крыс, крысы с привитыми саркомами проявляли повышенную задержку азота и повышенный прирост веса. Эти различия были обнаружены ок. двух недель после прививки опухоли.

Повышенная задержка азота в организме больных крыс выступает вследствие удаления уменьшающихся количеств азота в моче; это явление suggerирует изменения в процессе азотного обмена.

Скорость прироста веса тела (без опухоли) опухолевых крыс была приблизительно равна скорости прироста веса тела контрольных крыс; опухоль не вызывала понижения веса тела у больных крыс.

При увеличении роста опухоли одновременно увеличивалась задержка азота в организме крыс, но медленнее, чем прирост веса самой опухоли. Новообразования по мере их роста теряли азот. На основании этих результатов автор предполагает, что организм пораженный опухолью может, в некоторых случаях, получить азот из центрально расположенных, некротических частей опухоли.

#### NITROGEN BALANCE IN TUMOUR-BEARING RATS

##### Summary

Young male white rats weighing about 120 g. were fed (using a stomach tube) liquid-diets of a constant caloric value of about 100 Cal./48 hrs. and a different protein-level. The rats gained normal weight and showed a positive nitrogen balance when fed a diet containing 600 mg. nitrogen/48 hrs. When fed a diet containing 150 mg. nitrogen/48 hrs. only, the animals did not gain weight and showed a negative nitrogen balance. Composition of diets and conditions of experiment are described.

Two other groups of rats (6 animals with the transplantable, methylcholantrene-induced sarcoma, and 3 without neoplasm) were force-fed a stable diet containing a constant nitrogen-level, which secured a positive nitrogen balance. Every 48 hrs, the animals were weighed and 48 hrs. samples of faeces and urine were collected and analysed for total nitrogen. The tumour-bearing rats as compared with normal animals:

- 1) increased nitrogen retention,
- 2) higher rate of weight gain.

This difference became evident just at the time of two weeks after the tumour implantation. The increased nitrogen retention appeared in consequence of diminished excretion of urine-nitrogen.

The tumour-bearing rats without tumour gained at the same rate as control ones. Tumours did not cause any decrease of the host's body weight when the animals were forced-fed.

Nitrogen retention in tumour-bearing rats increased more slowly than the weight of rat. With the growth of tumour, the nitrogen control fell. It is suggested that the nitrogen of the central necrotic tissue of tumours may again become part of the metabolic pool.

Otrzymano 1.9.1955 r.



W. ZALEWSKI

**CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE CUKROWCÓW  
W KRAJOWYCH OWOCACH**

*Z Działu Technologii Owoców Instytutu Sadownictwa w Skierniewicach,  
Kierownik Działu dr K. A. Bogdański, Dyr. Instytutu prof. dr S. A. Pieniżek*

**I. Wstęp**

Chromatografię bibułową, która znajduje obecnie szerokie zastosowanie w oznaczaniu szeregu związków, wprowadzili po raz pierwszy Conden, Gordon i Martin [4]. Metodą tą oznaczano początkowo jakościowo, a później i ilościowo badane związki, jak aminokwasy, cukry itp. Badania węglowodanów przy pomocy chromatografii zapoczątkował Pettridge [10], [11], następnie Racziński [15], [16], [17] i inni.

W pracy niniejszej posługiwano się metodami podanymi w monografii Cramera [5] i Blocka [2], stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę *n*-butanolu, kwasu octowego lodowatego i wody w stosunku objętościowym 4 : 1 : 5 [10], [13], [16], [22] i inni. Chromatogramy wywoływano roztworem kwaśnego ftalanu aniliny [2], [12], [22] oraz roztworem naftorezorcyny<sup>1</sup> w kwasie trójchlorooctowym [5], [15], [19], [22].

**II. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie węglowodanów występujących w badanych owocach. Oznaczenia przeprowadzono metodą chromatograficzną, jako jedną z najprostszych, a zarazem dostatecznie czułą, pozwalającą wykryć nawet kilka  $\mu\text{g}$  cukrów w 10  $\mu\text{l}$  badanego płynu.

Szereg autorów [3], [14] i inni wymienia trzy cukry, a mianowicie: glikozę, fruktozę i cukrozę oraz pentozany, jako występujące w różnych gatunkach i odmianach owoców. Niektórzy jednak badacze donoszą o innych jeszcze cukrach, jak: maltozie, ramnozie, ksylozie, laktozie itp., któ-

<sup>1</sup> W pracy niniejszej zastąpiono naftorezorcynę — rezorcyną.

re spotykali w badanych owocach. Np. o obecności wolnej ksylozy w owocach donosi H a y [7], a o obecności maltozy S r i v a s t a v a [21] wg [6]. O obecności pentozanów w jabłkach, szczególnie arabinozy lub ksylozy oraz maltozy powstałej ze skrobi zhydrolizowanej diastazą, donosi również S m o c k [20].

Badania te przeprowadzono na innych odmianach i gatunkach owoców w odmiennych niż nasze warunkach (klimat, położenie geograficzne, gleba, nasłonecznienie itp.), dlatego też wydaje się rzeczą wskazaną przebadanie krajowych odmian owoców, celem jakościowego stwierdzenia w nich węglowodanów. Badania te miałyby wiele aspektów ogólnych i specjalnych, a mianowicie:

- 1) W sadownictwie przyczyniłyby się do dokładnego poznania właściwości poszczególnych odmian. Stwierdzono np., że odmiany winogron zawierające cukrozę są bardziej odporne na przemarzanie [3], niż odmiany, w których jej brak<sup>2</sup>.
- 2) W pewnych odmianach w stanie dojrzałym stosunek glikoza : fruktoza wynosi 1 : 1, możnaby więc tą drogą określać stopień dojrzałości tych owoców.
- 3) Przechowywaniu środków spożywczych towarzyszy między innymi nieenzymatyczne ich brunatnienie (reakcja Maillarda). Jedną z przyczyn tego zjawiska jest reakcja zachodząca pomiędzy cukrami, a aminokwasami. Badając przebieg tych reakcji można stwierdzić jakie cukry lub aminokwasy biorą udział w tym niepożądanym zjawisku.

### III. Metoda oznaczania

Z próby reprezentatywnej owoców (jabłka, gruszki, śliwki, truskawki, winogrona itp.), pobierano losowo 100 g i usuwano ewentualne nasiona czy pestki. Następnie przygotowywano 25% roztwór podstawowy i mieszano przez 2 minuty na Waring Blender'ze. Z tak otrzymanej, silnie zhomogenizowanej mieszaniny ekstrahowano cukry etanolem wg metody Raczinskij'ego [17]. Dobierano takie ilości alkoholu etylowego, aby stężenie cukrów było ca 1%, to jest, aby w 10  $\mu$ l badanego płynu nie przekraczało 100  $\mu$ g.

Następnie nanoszono na bibułę i rozwijano poszczególne chromatogramy wg zacytowanej na wstępie literatury. W celu uwidocznienia plam

<sup>2</sup> Poglądy badaczy odnośnie występowania cukrozy w winogronach są podzielone, np. B a r n e s [1] donosi o obecności cukrozy w owocach niektórych odmian całkowicie dojrzałych, w innych znów odmianach o występowaniu cukrozy w owocach niedojrzałych (w dojrzałych winogronach jej brak).



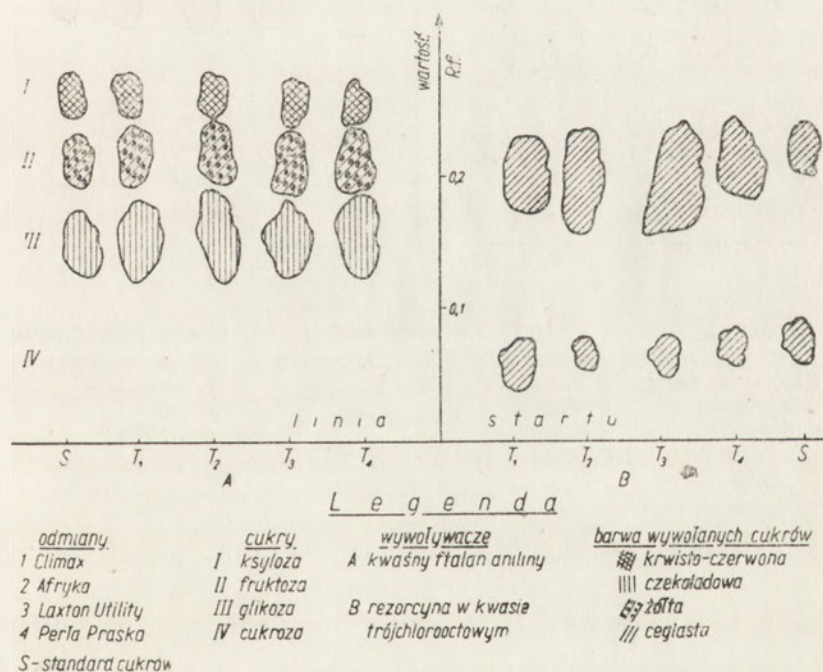
poszczególnych cukrów, spryskiwano paski bibuły następującymi odczynnikami do wywołania:

- kwaśnym ftalanem aniliny,
- roztworem rezorcyny w kwasie trójchlorooctowym i umieszczano w suszarce w temperaturze w 100—105° w czasie 5—10 minut.

Po uwidocznieniu się plamek poszczególnych cukrów obrysowywano je ostrożnie ołówkiem i porównywano ich wartości  $R_f$  z równocześnie rozwijanymi i wywołanymi standardami. Z położenia, zabarwienia i wartości  $R_f$  poszczególnych cukrów wnioskowano jakie cukrowce występowały w badanych owocach.

#### IV. Wyniki badań

Jakościowy skład węglowodanów w poszczególnych gatunkach i odmianach owoców przedstawiono graficznie na załączonych poniżej rysunkach.



Rys. 1. Chromatogramy cukrowców 4 odmian truskawek

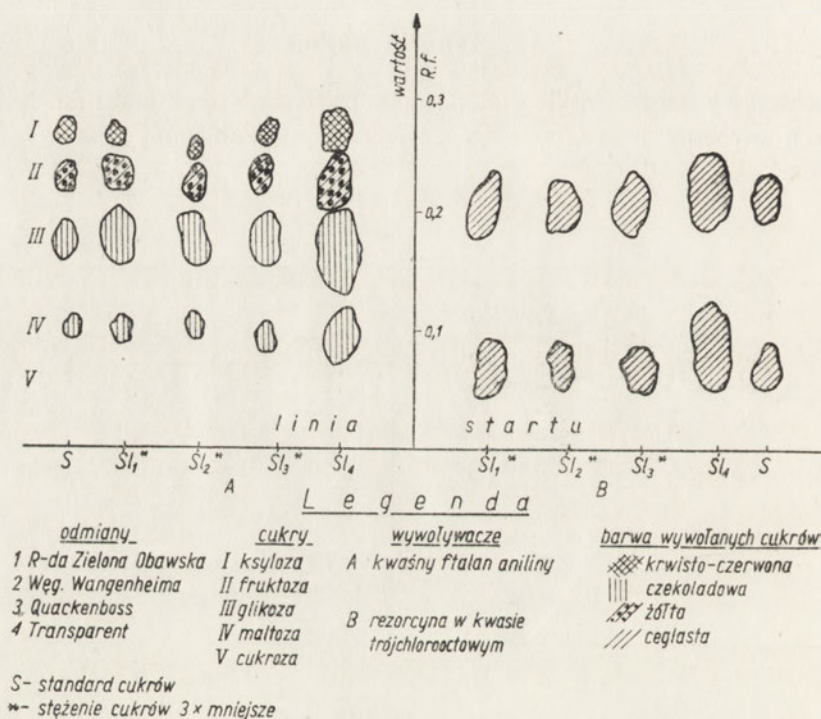
Wyniki jakościowego składu poszczególnych cukrów czterech odmian truskawek przedstawiono na rysunku 1.

Oznaczano przy pomocy chromatografii bibułowej węglowodany w następujących odmianach truskawek: „Climax”, „Afryka”, „Laxton

Utility”, „Perła Praska”, dostarczonych pracowni do analizy. Ogółem stwierdzono w badanych odmianach obecność ksylozy, fruktozy, glikozy i cukrozy.

Cukry te występowały w badanych odmianach w przybliżonym składzie jakościowym.

Na rys. 2 przedstawiono wyniki badań czterech następujących odmian śliwek: „Renkloda Zielona Obawska”, „Węgierka Wangenheima”, „Quackenboss”, „Transparent”. W przeanalizowanych odmianach śliwek zidentyfikowano następujące węglowodany, a mianowicie: ksylozę, fruktozę, glikozę, cukrozę i maltozę. Charakterystyczne jest to, że w przebadanych



Rys. 2. Chromatogramy cukrowców 4 odmian śliwek

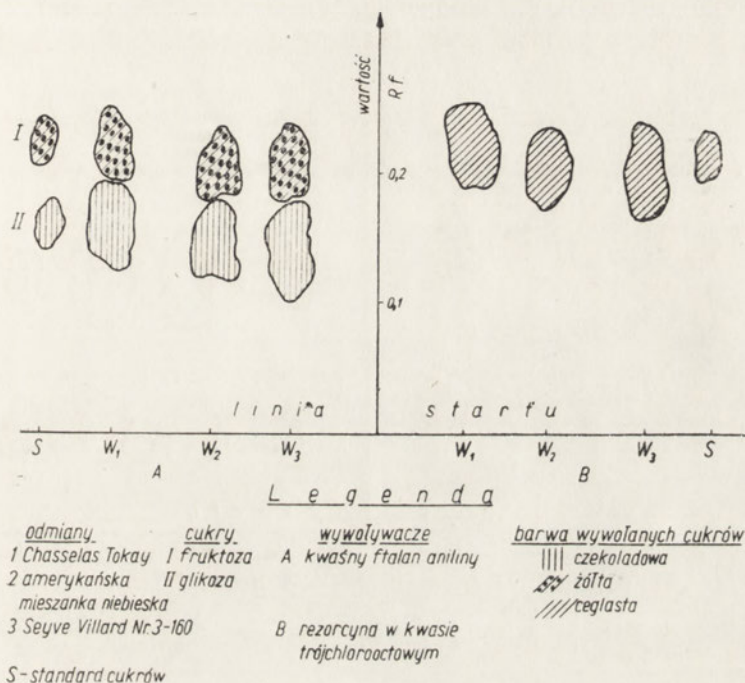
odmianach truskawek (rys. 1) nie stwierdzono obecności tego ostatniego cukru.

Jak zaznaczono na rys. 2, stężenie węglowodanów w 10  $\mu$ l nanoszonego roztworu było w przypadku odmian „Renkloda Zielona Obawska”, „Węgierka Wangenheima” i „Quackenboss” trzy razy mniejsze. Powierzchnia otrzymanych po wywołaniu plamek, charakteryzujących poszczególne cukry, odbiegała znacznie swą wielkością (była mniejsza) od powierzchni plamek cukrów odmiany „Transparent”. Metodą tą można



w przybliżeniu określać stężenie cukrów w badanym materiale. O zależności pomiędzy stężeniem cukrów a powierzchnią plamek (w pewnych granicach stężeń) donosi między innymi Cramer [5].

Jakościowy skład węglowodanów trzech odmian winogron przedstawiono na rys. 3. W przebadanych następujących odmianach winogron „Chasselas Tokay“, „Amerykańska Mieszanka Niebieska“ i „Seyve Villard” stwierdzono obecność tylko dwóch cukrów, a mianowicie fruktozy



Rys. 3. Chromatogramy cukrowców 3 odmian winogron

i glikozy. Obecności innych węglowodanów nie stwierdzono nawet w sładach.

Na rys. 4 przedstawiono graficznie jakościowy skład węglowodanów trzech odmian jabłek.

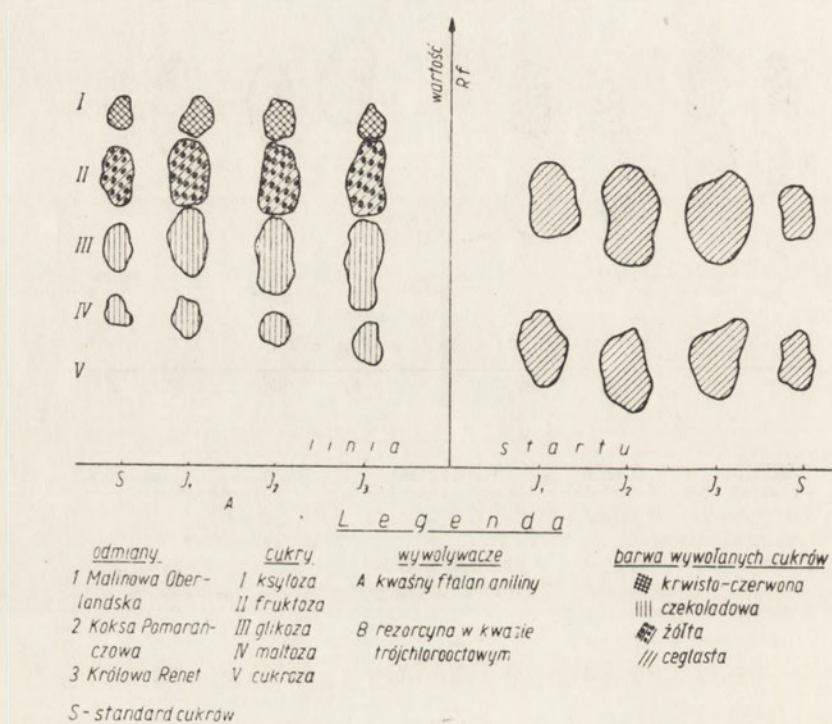
W przebadanych odmianach jabłek „Malinowa Oberlandzka”, „Koksa Pomarańczowa” i „Królowa Renet” stwierdzono obecność następujących cukrów: ksylozy, fruktozy, glikozy, maltozy i cukrozy. Węglowodany wymieniono w takiej kolejności, w jakiej adsorbowały się one na bibule. Również ich wartości  $R_f$  zmniejszały się i wynosiły dla: ksylozy 0,28, fruktozy 0,23, glikozy 0,17, maltozy 0,11 i dla cukrozy 0,07.

Jakościowy skład węglowodanów trzech odmian gruszek przedstawiono na rys. 5.

W przebadanych odmianach „Salisbury”, „Flaszkowa” i „Bera Hardego” stwierdzono obecność następujących cukrów: ksylozy, fruktozy, glikozy, maltozy i cukrozy.

Zawartość poszczególnych cukrowców w przebadanych odmianach była w przybliżeniu jednakowa i nie ulegała wyraźnym wahaniom.

Po przeanalizowaniu szeregu standardów oraz chromatogramów badanych owoców stwierdzono, że:



Rys. 4. Chromatogramy cukrowców 3 odmian jabłek

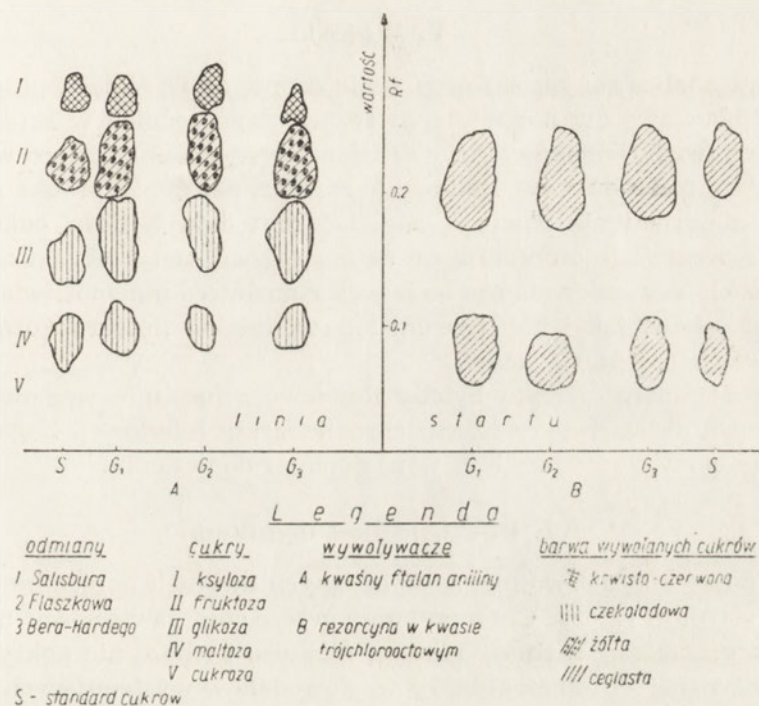
- 1) Ksyloza barwiła się pod wpływem kwaśnego ftalanu aniliny na krwisto-czerwono i posiadała największą wartość  $R_f$  spośród wszystkich przebadanych cukrów.
- 2) Fruktoza barwiła się pod wpływem kwaśnego ftalanu aniliny na żółto, a od rezorcyny w kwasie trójchlorooctowym na różowo. Jej plamki znajdowały się poniżej plamek ksylozy, a wartość  $R_f$  była mniejsza od wartości  $R_f$  ksylozy.
- 3) Glikoza barwiła się pod wpływem kwaśnego ftalanu aniliny na



czekoladowo. Adsorbowała się na arkuszu bibuły poniżej fruktozy (wartość  $R_f$  mniejsza od fruktozy).

- 4) Maltoza barwiła się pod wpływem kwaśnego ftalanu aniliny na czekoladowo, ale jako dwucukier adsorbowała się poniżej heksoz (wartość  $R_f$  mniejsza od glikozy).
- 5) Cukroza barwiła się pod wpływem rezorcyny w kwasie trójchlorooctowym na różowo. Jej wartość  $R_f$  była zbliżona do wartości  $R_f$  maltozy, jednak nieco mniejsza.

Cukry adsorbowały się na arkuszach bibuły w kolejności wyżej podanej, przy zastosowaniu parametrów omawianych w metodzie. Na ogół



Rys. 5. Chromatogramy cukrowców 3 odmian gruszek

nie stwierdzono wyraźnych różnic pomiędzy wartościami  $R_f$  standardów a badanych odmian i gatunków owoców.

Reasumując stwierdzono występowanie w różnych odmianach jabłek, gruszek i śliwek pięciu omawianych cukrów, tj. ksylozy, fruktozy, glikozy, maltozy i cukrozy.

W badanych owocach 4-ch odmian truskawek występowały: ksyloza, fruktoza, glikoza i cukroza, brak było natomiast maltozy.

Interesujących danych dostarczyły przebadane odmiany winogron, w których stwierdzono występowanie tylko fruktozy i glikozy (patrz rys. 3). Innych cukrów nie stwierdzono nawet w niewielkich ilościach śladowych, chociaż metodą chromatograficzną wykryć można w badanej próbie nawet kilka ich  $\mu\text{g}$ .

W przebadanych 4-ch odmianach śliwek (rys. 2) stężenie cukrów w trzech odmianach było trzy razy mniejsze niż w pozostałej odmianie. Nie stwierdzono jednak wyraźnych różnic w wartości  $R_f$ , w stosunku do odmiany czwartej śliwek; zauważono jedynie różnice w wielkości plamek poszczególnych węglowodanów.

## V. Wnioski

W przeanalizowanym surowcu stwierdzono, że w ramach poszczególnych odmian owoców nie występowały wyraźne różnice w składzie jakościowym węglowodanów. Pewne różnice występowały dopiero w określonych gatunkach owoców. Nadmienić również należy, że próbka analizowanego materiału nie powinna posiadać zbyt dużych ilości cukrowców w przeciwnym razie otrzymuje się chromatogram nietypowy, rozmazany, nie rozdzielający zadowalająco badanych cukrów, co uniemożliwia wyciąganie wniosków, jak i nie pozwala na ewentualne ilościowe oznaczenie analizowanych węglowodanów.

Niemniej interesującym byłoby ilościowe oznaczanie węglowodanów w badanych owocach przy użyciu chromatografii bibułowej. Zagadnienie to będzie omawiane oddzielnie w następnym doniesieniu.

## VI. Dyskusja nad wynikami

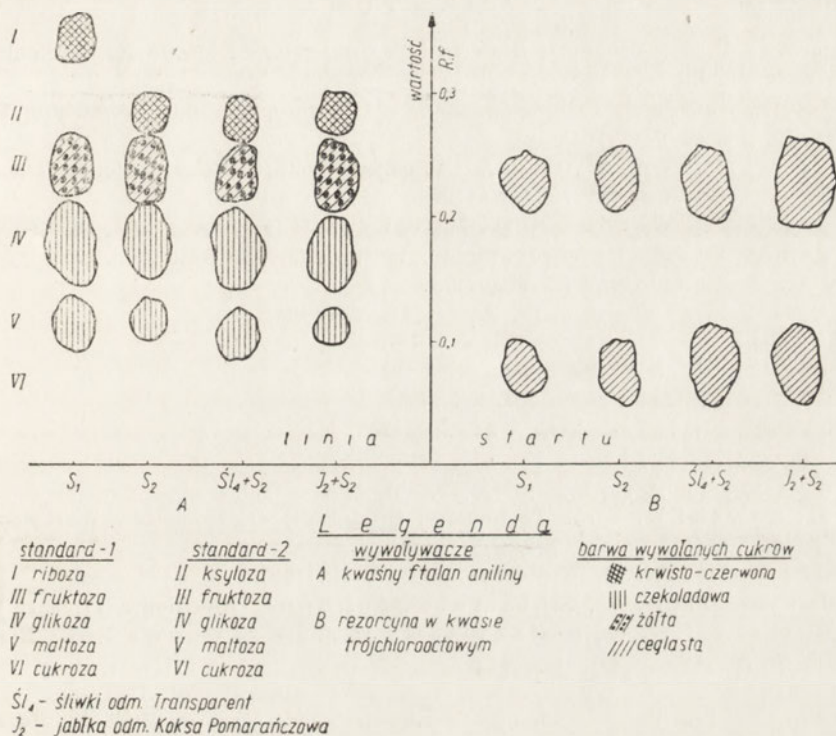
Przypuszczano pierwotnie, że w badanych owocach oprócz innych cukrów występuje riboza. Chromatogram wzorcowy, zawierający następujące cukry: cukrozę, maltozę, glikozę, fruktozę i ribozę nie pokrywał się jednak z „mapą” chromatogramów węglowodanów występujących w analizowanym materiale (patrz rys. 6 standard 1).

Również wartość  $R_f$  ribozy różniła się (była większa) od wartości  $R_f$  pentozy, znajdującej się w owocach. Dopiero przez zastąpienie ribozy ksylozą, otrzymano chromatogram standardowy, na którym rozmieszczenie poszczególnych węglowodanów pokrywało się z chromatogramem badanych owoców<sup>3</sup>. Obydwa chromatogramy (standardowy i badanych owoców), przy wywołaniu plamek poszczególnych cukrów dawały identyczne reakcje barwne, jak i wartości  $R_f$  (patrz rys. 1, 2, 3, 4, 5.).

<sup>3</sup> Zastrzega się, że nie jest wykluczona ewentualna obecność innych cukrowców w stężeniach znacznie mniejszych niż badane.



Ażeby mieć całkowitą pewność, że wyżej omawiane cukry istotnie występowały w badanych owocach, przygotowano chromatogram, na który nanoszono po 5  $\mu$ l roztworu węglowodanów z badanej odmiany owoców, a następnie w te same miejsca po 5  $\mu$ l standardu zawierającego ksylozę, fruktozę, glikozę, maltozę i cukrozę (patrz rys. 6,  $S_1 + S_2$  i  $J_2 + S_2$ ). Następnie chromatogram rozwijano i wywoływano metodą zaadoptowaną



Rys. 6. Chromatogramy standardów oraz cukrów badanych odmian ze standardami

w niniejszej pracy. Stwierdzono, że położenie, zabarwienie i wartości  $R_f$  plamek węglowodanów w tak przygotowanym chromatogramie nie różniły się niczym od chromatogramu standardowego oraz od chromatogramu badanej odmiany owoców. Wyżej opisane doświadczenie wskazywałoby raz jeszcze, że omawiane węglowodany znajdowały się rzeczywiście w badanych gatunkach i odmianach owoców.

### Streszczenie

W pracy niniejszej omawiano oznaczanie cukrowców występujących w owocach, metodą chromatografii bibułowej. Ogółem przebadano po

cztery odmiany truskawek i śliwek oraz po trzy odmiany jabłek, gruszek i winogron. W gatunkach i odmianach wyżej omawianych owoców stwierdzono występowanie następujących węglowodanów: ksylozy, fruktozy, glikozy, maltozy i cukrozy. Wyżej wymienione cukry nie występowały we wszystkich gatunkach owoców w jednakowym składzie jakościowym.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Barnes E. O., *Technical Bulletin* 143, University of Minnesota, Agricultural Experiment Station, 1940.
- [2] Block R. J., *Paper Chromatography a Laboratory Manual*, Academic Press Inc. Publ. New York 1952.
- [3] Cerewitinow F. W., *Chimija i towarowiedienije swieżich plodow i owoyszczej*, wyd. Gostorgizdat, Moskwa 1949.
- [4] Conden R., Gordon A. H., Martin A. J. O., *Biochem. J.* 38, 224, 1944.
- [5] Cramer F., *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1954.
- [6] *Food Science Abstracts* 26, 302, 1954.
- [7] Hay J. G., Pridham J. B., *Nature* 172, 207, 1954.
- [8] Horrocks R. H., *Nature* 164, 444, 1949.
- [9] Horrocks R. H., *Lancet* 256, 1042, 1949.
- [10] Patridge S. M., *Nature* 158, 270, 1946.
- [11] Patridge S. M., *Biochem J.* 42, 238, 1948.
- [12] Patridge S. M., *Nature* 164, 445, 1949.
- [13] Pawlimowa O. A., *Biochimija* 19, 364, 1954.
- [14] Pijanowski E., *Zarys Technologii Produktów Owocowych i Warzywnych*, P. W. R. i L. Warszawa 1951.
- [15] Raczinskij W. W., *Uspiechi chimi* 19, 442 1950.
- [16] Raczinskij W. W., Kniazjatowa i inni, *Biochimija* 17, 551, 1952.
- [17] Raczinskij W. W., Kniazjatowa E. J. i Krawcowa B. E., *Biochimija* 18, 19, 1953.
- [18] Rominskij I. R., Suszkowa A. S., *Biochimija* 19, 261, 1954.
- [19] Sulser H., *Mittl. a. d. Geb. d. Lebensmittel Unt. u. Hyg. in Bern.* 42, 376, 1951.
- [20] Smock R. M., Neubert A. M., *Apples and Apple Products*. wyd. Intersci. Publ. Inc., New York 1950.
- [21] Srivastawa I. H. C., *J. Sci. Industr. Res.*, India 12B 363, 1953 wg cyt. 6.
- [22] Täufel K., Reis R., *Zeitschr. f. Lebensmittel Untersuch. u. Forschung.* 94, 1, 1952.

#### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ В МЕСТНЫХ ФРУКТАХ

#### Р е з ю м е

В настоящем сообщении представлены результаты определений сахаров, находящихся в фруктах, по методу хроматографии на бумаге. Исследованию были подвержены по четыре сорта клубники и слив и по три сорта яблок, груш и винограда. У разных сортов и видов выше указанных фруктов обнаружено наличие следующих углеводов: ксилозы, фруктозы, глюкозы, мальтозы и сахарозы. Однако качественный состав перечисленных сахаров не был одинаков в плодах, исследованных сортов и видов.



## CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON ZUCKERN IM OBST

## Z u s a m m e n f a s s u n g

In dieser Mitteilung wurde die chromatographische Bestimmung von Kohlenhydraten im Obst besprochen. Insgesamt wurden je vier Sorten Erdbeeren und Pflaumen und je drei Sorten Äpfel, Birnen und Weintrauben analysiert. In obengenannten Obstgattungen und — Sorten wurde die Anwesenheit von Xylose, Fructose, Glucose, Maltose und Saccharose festgestellt. Die obigen Zucker befanden sich in den analysierten Obstgattungen nicht in der gleichen qualitativen Zusammensetzung.

Otrzymano 22.10.1955 r.





J. JANICKI, J. PAWEŁKIEWICZ, K. NOWAKOWSKA

## OTRZYMYWANIE KONCENTRATÓW ORAZ KRYSTALICZNEGO WITAMINU B<sub>12</sub> ZE ŚCIEKÓW MIEJSKICH PODDANYCH FERMENTACJI METANOWEJ

*Z Katedry Technologii Rolnej – Zakładu Biochemii Żywności W.S.R. w Poznaniu –  
Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki*

Prawie jednocześnie z odkryciem witaminu B<sub>12</sub> stwierdzono, że substancja ta działa wzrostowo na kurczęta żywione paszą roślinną [16]. Rozszerzenie badań żywieniowych na inne zwierzęta hodowlane pozwoliło ustalić, że witamin B<sub>12</sub> działa wzrostowo nie tylko na drób ale i na inne — ważne z punktu widzenia gospodarczego zwierzęta, jak prosięta, świnie oraz cielęta. W licznie przeprowadzanych doświadczeniach ustalono, że witamin B<sub>12</sub> dodawany do paszy roślinnej zwiększa zużycie zawartego w paszy białka roślinnego tak, że przy jednakowej diecie zwierzęta, którym równocześnie podawano w paszy witamin B<sub>12</sub> szybciej rosną (od 10—40%) [15], [24]. Jeszcze lepsze efekty hodowlane osiąga się przy jednoczesnym podawaniu obok witaminu B<sub>12</sub>, antybiotyków jak chlorotetracykliny (aureomycyna), hydroksytetracykliny (terramycyna), streptomycyny i innych [4], [14], [15], [22].

Z momentem stwierdzenia wzrostowego działania witaminu B<sub>12</sub> na zwierzęta hodowlane wzrosło ogromnie zapotrzebowanie na tę substancję. W związku z tym wyłoniła się potrzeba szukania nowych i tanich źródeł witaminu B<sub>12</sub>, który mógłby być wykorzystany dla celów hodowlanych. Obecnie ogromna większość paszowych koncentratów witaminu B<sub>12</sub> znajdujących się na rynkach pochodzi z odpadów przy produkcji antybiotyków, a szczególnie chlorotetracykliny. W roku 1951 Hoover i inni [10], [11] wykazali, że w ściekach miejskich oczyszczanych przy pomocy fermentacji tlenowej lub beztlenowej (metanowej) znajduje się witamin B<sub>12</sub> w ilościach do 10 µg na kg suchej masy ścieków. W Niemczech problemem wyodrębnienia i identyfikacji kobalamin zawartych w szlamach ściekowych po fermentacji metalowej zajęli się w Bernhauer i Friedrich [2], [7].

O możliwości otrzymywania ze szlamów ściekowych po fermentacji metanowej koncentratów witaminu B<sub>12</sub> nadających się dla celów hodowlanych donoszą Witmarsh i inni [23]. Scheunert i Sommer [21], otrzymali również koncentraty przy czym Scheunert i Kraack [20] stwierdzili ich wzrostowe działanie w doświadczeniach żywieniowych na świniach.

W pracy niniejszej podajemy wyniki naszych badań nad otrzymaniem koncentratów witaminu B<sub>12</sub> oraz krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> ze ścieków miejskich poddanych fermentacji metanowej. Przeprowadzaliśmy badania nad otrzymywaniem koncentratów witaminu B<sub>12</sub> zarówno w skali laboratoryjnej (próby 50—75 l ścieków) jak i ćwierć technicznej (próby do 500 l ścieków).

Pragniemy w tym miejscu podziękować mgr Świerczyńskiemu za umożliwienie nam przeprowadzenia prób technicznych. Otrzymane koncentraty przebadano w doświadczeniach żywieniowych na kurczętach. Badania te wykazujące dużą wartość preparatu przeprowadziło we własnym zakresie Laboratorium naukowo-doświadczalne Tuczarni Drobiu Poznań-Junikowo.

## Część doświadczalna

### 1. OTRZYMYWANIE KONCENTRATÓW WITAMINU B<sub>12</sub> ZE ŚCIEKÓW MIEJSKICH , PODDANYCH PROCESOWI FERMENTACJI METANOWEJ

100 l ścieków pobranych bezpośrednio ze zbiorników fermentacyjnych z Oczyszczalni Ścieków w Poznaniu, zadawano 10 g cyjanku sodowego i pozostawiono 12—24 godzin w spokoju. Następnie alkaliczny płyn doprowadzano przy pomocy 30% HCl lub bezwodnego kwasu octowego do pH 6—7 i podgrzewano do temperatury 80°. W trakcie podgrzewania stale sprawdzano wartość pH płynu i korygowano dodając kwasu wśród energicznego mieszania, w celu utrzymania pH w granicach 6—7. Po osiągnięciu temp. 80—90° płyn utrzymywano w tej temperaturze w ciągu 15 minut, po czym szybko studzono do temp. 25°—30°. Po ostudzeniu płyn rozcieńczano wodą dodając 20—40 l wody w zależności od gęstości ścieków, po czym zadawano nasyconym roztworem 1 kg alunu — glinowo-potasowego (produkt techniczny). Sól glinowa powodowała koagulację koloidalnego roztworu. Ciecz przelewano do odstojnika i po 12—24 godzinach dekantowano klarowny lub słabo opalizujący płyn znad osadu. Ze sklarowanej cieczy adsorbowano substancje czynne na węglu aktywnym „Carbopol H2“ (pH 6—7) [13]. Na każde 100 l płynu dodawano 200—300 g węgla aktywnego (zależnie od rozcieńczenia pierwotnej próby wodą) i po dalszych 12 godzinach węgiel odsączano. Następnie węgiel prze-



mywano wodą, po czym kobalaminy eluowano 75% acetonem [13]. Po odpędzeniu acetonu otrzymywano koncentrat barwy czerwono-brązowej (400—600 ml ze 100 l ścieków), który analizowano na zawartość witaminu B<sub>12</sub>. Średnio ze 100 l ścieków otrzymywano 6—14 mg witaminu B<sub>12</sub>. Roztwór wodny kobalaminy rozprowadzono w mące lub śrucie kukurydzianym w tej ilości, by po wysuszeniu produktu zawartość witaminu B<sub>12</sub> wynosiła 4 mg/kg produktu i suszono w prądzie suchego powietrza w temp. ok. 30—35°C. Tak rozcieńczony koncentrat dostarczano do badań żywieniowych, w których podawano kurczętom od 2—4 mg witaminu B<sub>12</sub> w 100 kg paszy treściwej.

Wodny koncentrat służył również do otrzymywania krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> według metody opisanej niżej, w dużej mierze opartej na doświadczeniach Pawełkiewicza i Nowakowskiej [18].

## 2. OTRZYMYWANIE KRYSZALICZNEGO WITAMINU B<sub>12</sub>

Wodny koncentrat wysycano chlorkiem sodowym, alkalizowano do pH ca 9 roztworem cyjanku sodowego, po czym kobalaminy kilkakrotnie ekstrahowano alkoholem benzylovym. Połączone ekstrakty alkoholowe wirowano celem sklarowania, następnie zadawano równą objętością chloroformu. Kobalaminy reekstrahowano kilka razy małymi porcjami wody. Połączone wodne wyciągi przemywano jednorazowo równą objętością chloroformu, zakwaszono do pH 5—6 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i kobalaminy ekstrahowano mieszaniną o-krezolu i chloroformu (1 : 1 v/v). Połączone wyciągi krezolowo-chloroformowe zadawano 1/4 objętości chloroformu i jednokrotnie przemywano wodą. Następnie do przemytego roztworu kobalaminy dodawano równą objętością mieszaniny n-butanolu i chloroformu (1 : 1 v/v) [1] i kobalaminy ekstrahowano wodą. Wodny roztwór przemywano 3 razy chloroformem celem usunięcia śladów krezolu i następnie odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem na łaźni wodnej. Suchą pozostałość rozpuszczano w bardzo małej objętości wody i roztwór nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę chromatograficzną Whatman'a Nr 3. Następnie kobalaminy rozdzielano elektroforetycznie wg metody Holdswortha [9], [18]. Po rozdzieleniu kobalaminy bibułę suszono w prądzie ciepłego powietrza, wycinano z niej pas elektroodpornych kobalaminy, po czym eluowano je wodą. Wodny roztwór sączono do kolbki próżniowej, skąd odpędzano wodę pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w metanolu i roztwór ten chromatografowano na kolumnie z tlenkiem glinu. Z oczyszczonego roztworu krystalizowano witamin wg metody uprzednio opisanej [13].

### 3. SPEKTROFOTOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA WITAMINU B<sub>12</sub> W KONCENTRATACH OTRZYMANÝCH ZE ŚCIEKÓW

Spektrofotometryczna różnicowa metoda podana po raz pierwszy przez Rudkina i Taylora [19], a zmodyfikowana w naszej pracowni [12] nie mogła znaleźć zastosowania przy oznaczaniu witaminu B<sub>12</sub> w koncentratách ze ścieków.

Metoda Rudkina i Taylora polega na pomiarze różnicy absorpcji roztworu witaminu B<sub>12</sub> i jego kompleksu dwucyjanowego. W badanych koncentratách występują różne kobalaminy (typu deznukleotydo-cyjanokobalaminy) dające w obecności cyjanków trwałe przy pH 6 kompleksy dwucyjanowe uniemożliwiające oznaczenie witaminu B<sub>12</sub> wg wyżej podanej metody. Dlatego też opracowano nową metodę oznaczania spektrofotometrycznego, polegającą na oczyszczeniu surowego koncentratu, elektroforetycznym rozdzieleniu na bibule witaminu B<sub>12</sub> (frakcji elektrobojętnych) od innych kobalaminy i oznaczaniu stężenia na podstawie pomiaru absorpcji dla fali 550 m $\mu$  w eluacie z bibuły. Sposób postępowania w opracowanej metodzie oparto na opisanej wyżej metodzie otrzymywania krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> z koncentratów (ekstrakcje alkoholem benzylovym oraz ekstrakcje krezolowo-butanolowe i elektroforeza bibułowa). Do analizy brano od 10—50 ml koncentratu, w zależności od przypuszczalnego stężenia witaminu B<sub>12</sub>, po czym postępowano, jak opisano wyżej, zwracając szczególną uwagę na ilościowe przenoszenie barwnych substancji z jednej fazy do drugiej. Osiągnano to przeprowadzając poszczególne ekstrakcje 4—6 razy. Zwracano również uwagę na ilościowe naniesienie roztworu kobalaminy na bibułę. Dodatek kilku kropel metanolu do próby w kolbce destylacyjnej ułatwia to zadanie.

Z wysuszonego elektroforogramu wycinano następnie pas witaminu B<sub>12</sub>, cięto go na drobne skrawki, zalewano 5—10 ml wody, po czym po 30—60 minutach sączono przez mały sączonek do kolbki próżniowej. Ekstrakcję bibuły powtarzano 3—5 razy. Z kolbki odpędzono wodę pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość rozpuszczano w określonej objętości (v ml) wody i w roztworze tym mierzono absorpcję dla fali = = 550 m $\mu$  (d<sub>550</sub>) wobec wody jako roztworu porównawczego. Stężenie witaminu B<sub>12</sub> w próbie obliczano wg wzoru:

$$c = \frac{d_{550} \cdot 10^4 \cdot v}{63 \cdot l} \text{ } \mu\text{g B}_{12} \text{ w próbce,}$$

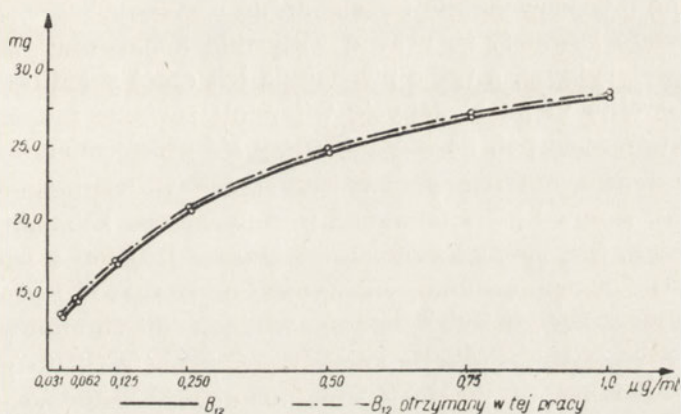
w którym l oznacza szerokość kiuwety absorpcyjnej w cm.

### 4. BADANIE TOŻSAMOŚCI WYODREBNIONEJ KRYSZALICZNEJ ELEKTROBOJĘTNEJ KOBALAMINY

Bernhauer i Friedrich pierwsi wykazali, że w szlamach pofermentacyjnych, prócz witaminu B<sub>12</sub> występują różne inne kobalami-



ny, a wśród nich również elektrobojętny czynnik nazwany przez nich witaminem B<sub>12</sub>III [2]. W witaminie B<sub>12</sub>III nie stwierdzono 5,6-dwumetylobenzimidazolu w części nukleotydowej cząsteczki. Czynnik B<sub>12</sub>III wydaje się identyczny z tzw. czynnikiem I wyodrębnionym z kału świń i krów przez Browna i innych [5]. Ostatni badacze stwierdzili również występowanie szeregu dalszych elektrobojętnych kobalaminy (tzw. czynniki G, H, F.) o niskiej aktywności mikrobiologicznej wobec *Ochromonas malhamensis*. Z tych przyczyn była konieczna bliższa identyfikacja wyodrębnionej przez nas krystalicznej kobalaminy. Poddaliśmy ją badaniom mikrobiologicznym, fizyko-chemicznym i chemicznym. Kobalamina wy-



Rys. 1. Krzywe wzrostowe *E. coli* dla witaminu B<sub>12</sub> oraz witaminu B<sub>12</sub> wyodrębnionego ze ścieków.

Krzywa osi rzędnej podaje wagę w mg wyciętych krążków z papieru fotograficznego, na którym sfotografowano plamy wzrostu

odrębniona ze ścieków poddanych fermentacji metanowej wykazywała tę samą aktywność mikrobiologiczną (*Escherichia coli* mutant — metoda płytowa) [3], [8] co witamin B<sub>12</sub> (5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina). Rysunek 1 przedstawia graficznie zależność między stężeniem witaminy a wagą wyciętych krążków z papieru fotograficznego, na którym sfotografowano plamy wzrostu [6]. Dla oryginalnego witaminu B<sub>12</sub> oraz preparatu badanego krzywe wzrostu pokrywają się. Również widmo absorpcyjne wyodrębnionej kobalaminy było identyczne z widmem absorpcyjnym witaminu B<sub>12</sub> [13].

Celem zidentyfikowania zasady nukleotydowej wyodrębnionej kobalaminy, ca 3 mg witaminu zhydrolizowano w zatopionej rurce w 6 N HCl, po czym w hydrolizacie zidentyfikowano widmowo zasadę nukleotydową. Stwierdzono występowanie substancji o charakterystycznym widmie absorpcyjnym 5,6-dwumetylobenzimidazolu [17].

Szczegóły metody indentyfikacji zasady nukleotydowej opublikowano w innym miejscu [17].

### Omówienie metody

W trakcie opracowywania metody otrzymywania koncentratów witaminu B<sub>12</sub> ze ścieków poddanych fermentacji metanowej stwierdzono, zgodnie z danymi Whitmarsh'a i innych [23], że celem uwolnienia witaminu z komórek bakteryjnych nie potrzeba próby autoklawować, jak podaje Hoover i inni [9], [10]. Ogrzewanie cieczy do temp. 80—90° wystarcza do przeprowadzenia kobalamin do roztworu.

Stwierdzono również, że prawie wszystkie kobalaminy związane są z osadem bakteryjnym, a tylko nieznaczna ich część znajduje się w roztworze. Pozwoliło to na wydobycie witaminu również z osadów zebranych z drenowanych pól, na których suszy się przefermentowane ścieki.

Ważniejszym i nie notowanym dotychczas w piśmiennictwie było spostrzeżenie wpływu pH ścieków na zachowanie się kobalamin w trakcie ogrzewania. Z grzybni *Streptomyces griseus* [13] lub z bakterii pionowych [17] można uwolnić witamin B<sub>12</sub> ogrzewając suspensję wodną drobnoustrojów przy pH 3 w temp. 60° w ciągu 10—15 minut.

W pracy niniejszej stwierdzono, że ogrzewanie ścieków przy pH 3, a nawet 4,5 w temp. 60° w ciągu 10 minut niszczy częściowo lub całkowicie, w zależności od badanej partii ścieków, elektroobojętne kobalaminy a, do koncentratu przechodzą kobalaminy zasadowe (typu deznukleotydocyjanokobalaminy). Stwierdzono również, że w tych partiach ścieków, w których elektroobojętne kobalaminy rozkładały się całkowicie w trakcie ogrzewania przy pH 3—4, nawet dodany do nich krystaliczny witamin B<sub>12</sub> ulegał w tych warunkach kompletnej destrukcji.

Trzeba tu jednak zaznaczyć, że zawsze prócz niezmiennowej elektroobojętniej kobalaminy pojawiały się w ekstraktach w mniejszych lub większych ilościach kobalaminy zasadowe (elektroforeza w 2 N kw. octowym) barwy pomarańczowo-czerwonej, przypominające swymi własnościami fizyko-chemicznymi deznukleotydocyjanokobalaminę. Ilość ich nie przekraczała na ogół 10—20% kobalamin elektroobojętnych. Wydaje się, że przynajmniej część ich powstaje w reakcji rozkładu kobalamin elektroobojętnych.

W pracy niniejszej stwierdzono, że (prócz pH) duże znaczenie dla wydajności otrzymywanego witaminu B<sub>12</sub> ma dodatek cyjanku sodowego do ścieków przed ich ogrzewaniem.

W tabelicy 1 zestawiono wyniki tych badań. Witamin B<sub>12</sub> wyodrębniono z 2-litrowych prób ścieków ogrzewając je 10 minut w temp. 80°.



Badano tu wpływ pH oraz cyjanku i siarczynu sodu na wydajność procesu.

Po uwolnieniu witaminu B<sub>12</sub> z komórek bakteryjnych, próby odbiałczano ałunem glinowym — jak w opisanej metodzie i po odwirowaniu osadu ekstrahowano witamin mieszaniną krezolu i chloroformu (1:1). Po zadaniu wyciągu krezolowo-chloroformowego nadmiarem chloroformu i butanolu, witamin B<sub>12</sub> reekstrahowano, po czym w uzyskanym wyciągu oznaczano go według metody podanej wyżej.

Ścieki poddane fermentacji metanowej zarówno przed jak i po ogrzaniu przedstawiają się jako ciemne, koloidalne roztwory z zawieszonymi w nich cząsteczkami stałymi mazistej konsystencji. Normalna przeróbka tego

Tablica 1

Wpływ pH oraz dodatku cyjanku i siarczynu sodu na wydajność witaminu B<sub>12</sub>

pH	6,5	5,5	4,5
NaCN (0,5g/l)	100*	62,6	33,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (2,5g/l)	25,5	20,0	18,0
Próba kontrolna	15,9	—	—

\* Liczby podają wartości względne

Wartość bezwzględna: 132,5 μg B<sub>12</sub>/l

materiału jest trudna. Usuwanie części stałych wymaga stosowania sprawnych wirówek o dużej pojemności. Oddzielenie węgla z otrzymanywanych roztworów koloidalnych jest również uciążliwe i wymaga np. stosowania super-centryfug. Trudności te ominięto w opracowanej metodzie koagulując koloidy solami glinu. Koagulat łatwo osadza się na dnie odstojników, co ułatwia dekantowanie klarownej lub lekko opalizującej cieczy. Dodatek soli glinu powoduje obniżenie się pH cieczy do wartości 3,5—4,5, co nie ma w tym miejscu zasadniczego znaczenia pod warunkiem, że koagulowany płyn jest już ochłodzony do temp. 25—30°.

Z surowego koncentratu witaminu B<sub>12</sub> można dosyć łatwo otrzymać preparat krystaliczny.

Na drodze mikrobiologicznej oraz chemicznej stwierdzono, że w ściekach poddanych fermentacji metanowej pochodzących z Oczyszczalni Ścieków w Poznaniu znajduje się 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina w ilościach 6—14 mg na 100 litrów ścieków.

## Streszczenie

1. Opracowano metodę otrzymywania ze ścieków miejskich oczyszczonych fermentacją metanową koncentratów witaminu B<sub>12</sub>, nadających się jako dodatek do pasz dla zwierząt gospodarskich. Ze 100 l ścieków otrzymano ok. 10 mg witaminu B<sub>12</sub>. Opracowana metoda polega na uwolnieniu witaminu B<sub>12</sub> z komórek bakteryjnych na drodze ogrzewania ścieków do temperatury 80—90° przy pH 6—7 w obecności cyjanku sodowego, koagulacji koloidów siarczanem glinowo-potasowym, absorpcji witaminu na węgiel aktywnym i elucji z węgla wodnym acetonem.

2. Ogrzewanie ścieków przy pH 3,0—5,5 powoduje częściowe lub niekiedy nawet całkowite zniszczenie witaminu B<sub>12</sub>. Dodatek cyjanku sodowego przed ogrzewaniem ścieków znacznie podnosi wydajność otrzymywanego witaminu B<sub>12</sub>. Ochronne działanie siarczynu sodu jest wiele słabsze od NaCN.

3. Podano metodę otrzymywania krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> z koncentratów witaminu B<sub>12</sub>.

4. Opracowano nową metodę spektrofotometrycznego oznaczania witaminu B<sub>12</sub> w koncentratkach.

5. Metodami mikrobiologicznymi oraz fizyko-chemicznymi zidentyfikowano wyodrębnioną krystaliczną kobalaminę jako 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminę.

6. W ściekach po fermentacji metanowej stwierdzono prócz witaminu B<sub>12</sub> występowanie elektrozasadowych kobalamin typu deznukleotydocyjanokobalamin w ilościach od 10 do 20% wszystkich kobalamin zawartych w ściekach. Wydaje się, że przynajmniej część z nich tworzy się na skutek rozkładu witaminu B<sub>12</sub> w trakcie jego uwalniania z komórek bakteryjnych.

## L I T E R A T U R A

- [1] Backer F. A., Boley A. E. i Shonk C. E., *Anal. Chem.* 26, 1146, 1954.
- [2] Bernhauer K. i Friedrich W., *Angew. Chemie* 66, 776, 1954.
- [3] Bogucka I., Iwanowska J. i Kąkol H., *Przemysł Chem.* 9, 14, 512, 1953.
- [4] Brande R., Kon S. i Porter J., *Nutrition Abstr. Rev.* 23, 473, 1953.
- [5] Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J. i Smith L. E., *Biochem. J.* 59, 82, 1955.
- [6] Fantès K. H. i O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* 59, 79, 1955.
- [7] Friedrich W. i Bernhauer K., *Angew. Chem.* 65, 627, 1953.
- [8] Harrison E., Lees K. A. i Wood F., *Analyst* 75, 696, 1951.
- [9] Holdsworth E. S., *Nature*, 171, 148, 1953.
- [10] Hoover S. R., Jasewicz L. i Porges N., *Science* 114, 213, 1951.
- [11] Hoover S. R., Jasewicz L., Pepinsky J. B. i Porges N., *Sewage and Ind. Wastes* 24, 38, 1952.



- [12] Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St. i Zodrow K., *Przemysł Chem.* 9, 509, 1953.
- [13] Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Szebiotko K. i Zodrow K., *Przemysł Chem.* 9, 385, 1953.
- [14] Krause H. i Vogel G., *Arch. Tierernährung* 5, 17, 1955.
- [15] Luecke R. W., Mc Millen W. N. i Thorp F. jr. *Arch. Biochem.* 26, 326, 1950.
- [16] Ott W. H., Rickes E. L. i Wood T. R., *J. Biol. Chem.* 174, 1047, 1948.
- [17] Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* 1, 313, 1954.
- [18] Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Pol.* 2, 259, 1955.
- [19] Rudkin G. O. jr. i Taylor R. J., *Anal. Chem.* 24, 1155, 1952.
- [20] Scheunert A. i Kraack. *Arch. Tierernährung*, Beihefte 4, 83, 1954.
- [21] Scheuert A. i Sommer H., *Mockern Festschrift* 2, cyt. Scheunert A. i Kraack E., *Arch. Tierernährung*, Beihefte 4, 83, 1954.
- [22] Stockstadt E. L. R. i Jukes T. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 73, 523, 1950.
- [23] Whitmarsh J. M., Albans J. W. i Wright R. D., *Biochem. J.* 60, XXVIII, 1955.
- [24] Wohlbier W., Orth A., Kujus W. i Hacker W., *Arch. Tierernährung*, Beihefte 4, 182, 1954.

## ПОЛУЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАТОВ И КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ВИТАМИНОВ В<sub>12</sub> ИЗ ГОРОДСКИХ СТОЧНЫХ ВОД ПОСРЕДСТВОМ МЕТАНОВОГО БРОЖЕНИЯ

### Резюме

1. Разработан метод получения из городских сточных вод, очищенных посредством метанового брожения, концентратов витамина В<sub>12</sub> пригодных для прибавления к корму сельскохозяйственных животных. Из 100 л. сточных вод получено около 10 мг. витамина В<sub>12</sub>. Разработанный метод заключается в выделении витамина В<sub>12</sub> из клеток бактерий путем подогревания сточных вод до температуры 80—90° при рН 6—7, при наличии цианистого натрия, коагуляции коллоидов посредством сульфата алюминия и калия, абсорбции витамина на активном угле и промываний из угля водным уксусом.

2. Подогревание сточных вод при рН 30 — 5,5 вызывает частичное, а иногда и полное уничтожение витамина В<sub>12</sub>. Прибавка цианистого натрия перед подогреванием сточных вод значительно усиливает эффективность получаемого витамина В<sub>12</sub>. Предохранительное действие сернистоокислого натрия значительно уступает NaCN.

3. Представлен метод получения кристаллического витамина В<sub>12</sub> из концентратов витамина В<sub>12</sub>.

4. Разработан новый метод спектрофотометрического определения витамина В<sub>12</sub> в концентратах.

5. Путем микробиологических и физико-химических методов идентифицировано выделенный кристаллический кобаламин в виде 5,6 дэтилобензимидазолцианокобаламина.

6. В сточных водах после метанового брожения обнаружено появление, кроме витамина В<sub>12</sub>, электрощелочных кобаламинов типа дезну-

клептидоцианокобаламина в количествах от 10 до 20% всех содержащихся в сточных водах кобаламинов. Предгается, что по крайней мере, часть их образуется вследствие разложения витамина B<sub>12</sub> во время его выделения из клеток бактерий.

#### OBTAINING OF VITAMIN B<sub>12</sub> IN CONCENTRATES AND CRYSTALLINE FORM FROM TOWN SEWAGE SUBJECTED TO METHANE FERMENTATION

##### Summary

1. A method was developed of obtaining vitamin B<sub>12</sub> concentrates from town sewage purified by methane fermentation; this concentrate is suitable as an addition to animal fodder. 100 litres of sewage yielded about 10 mg of vitamin B<sub>12</sub>.

The method consists in liberating vitamin B<sub>12</sub> from bacteria cells by warming sewage to 80—90°C., at a pH of 6—7, in presence of sodium cyanide, by coagulation of colloids with potassium aluminium sulphate, by absorption of the vitamin on activated carbon and subsequent elution with aqueous acetone.

2. Warming of sewage at a pH of 3.0—5.5 causes partial, occasionally even complete, destruction of vitamin B<sub>12</sub>. Additions of sodium cyanide prior to warming considerably raises the yield of vitamin B<sub>12</sub>. Sodium sulphite exerts a much weaker protective effect than sodium cyanide.

3. The paper presents a method of obtaining crystalline B<sub>12</sub> from concentrates of the vitamin.

4. A new spectrophotometric method was developed for determining vitamin B<sub>12</sub> in concentrates.

5. The crystalline cobalamin isolated was identified as 5,6-dimethylbenzimidazolecyanocobalamin by microbiological and physico-chemical methods.

6. After methane fermentation, there were found in the sewage, besides vitamin B<sub>12</sub>, also electrobasic cobalamins of the type of desnucleotidecyanocobalamin, in quantities amounting from 10 to 20 per cent of the total content of cobalamins. It appears that at least a part of them results from the decomposition of vitamin B<sub>12</sub> during the liberation of the latter from bacteria cells.

Otrzymano 2.12.1955 r.



W. OSTROWSKI, A. NIEWIAROWSKA-PAWLUS

**POŁĄCZENIA WITAMINU B<sub>12</sub> Z BIAŁKAMI  
IV. OCZYSZCZANIE I WŁASNOŚCI KOMPLEKSU WITAMIN B<sub>12</sub>-  
BIAŁKO (ERYTROGLOBULINU) W SUROWICY KRWI BYDŁĘCEJ**

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie  
Kierownik prof. dr B. Skarżyński*

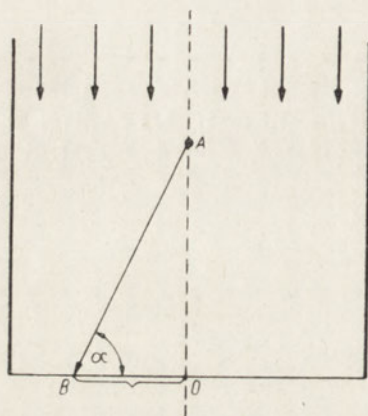
W surowicy krwi ludzkiej i zwierzęcej istnieje połączenie witaminu B<sub>12</sub> nie przechodzące przez błony dializacyjne, nie przyswajane przez drobnoustroje wymagające dla swego wzrostu dowozu witaminu B<sub>12</sub>, które nazwaliśmy erytroglobulinem. W poprzednich naszych pracach [6], [8], [10], wykazaliśmy, że erytroglobulin jest połączeniem witaminu B<sub>12</sub> z białkiem, wędrującym podczas elektroforezy z frakcją α<sub>1</sub>-globulinów [8]. Stwierdziliśmy również, że kompleks ten należy do nierozpuszczalnej w wodzie frakcji białek surowicy krwi bydłowej i ulega wysoleniu przy użyciu siarczanu amonu w stężeniu 1,46—1,95 M [6]. Przyjmując ewentualną rolę fizjologiczną tego połączenia podjęliśmy próby wyosobniania, otrzymując w małych ilościach preparat znacznie bardziej zagęszczony w porównaniu z surowicą.

### Metody

Metoda oczyszczania erytroglobulinu oparta została na następującym postępowaniu: dializowanie surowicy wobec wody, wyciąganie wytrąconych podczas dializy euglobulinów roztworem NaCl, frakcjonowanie wyciągu siarczanem amonowym i frakcjonowanie przy użyciu ciągłej elektroforezy bibułowej. Białko oznaczano metodą mikro-Kjeldahla oraz metodą taninową [4]. Witamin B<sub>12</sub> oznaczano posługując się sposobem postępowania podanym w jednej z poprzednich naszych prac [8].

Frakcjonowanie elektroforetyczne przeprowadzono przy pomocy aparatury skonstruowanej przez nas, będącej modyfikacją aparatury Grassmanna i Hanniga [2] oraz Durruma [1]. Zasada metody ciągłej elektroforezy bibułowej polega na tym, że pole elektryczne wytworzone jest na

dużym arkuszu bibuły w kierunku prostopadłym do kierunku spływającego wzdłuż arkusza buforu. Rozdzielana mieszanina doprowadzana ciągle do powierzchni arkusza podlega działaniu siły spływającego buforu w kierunku pionowym i siły pola elektrycznego w kierunku poziomym. W tych warunkach ruchliwość elektroforetyczna jest wypadkową działania tych dwóch sił, jak to obrazuje rys. 1.



Rys. 1. Graficzne przedstawienie zasady ciągłej elektroforezy bibulowej. Próbka umieszczona w miejscu A przez działanie siły spływającego buforu znalazłaby się w miejscu O. Przy równoczesnym działaniu pola elektrycznego cząsteczki wędrują wzdłuż linii AB. Odległość OB jest tym większa im wyższa jest ruchliwość elektroforetyczna danej frakcji, czyli:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\text{szybkość spływającego buforu}}{\text{ruchliwość elektroforetyczna}}$$

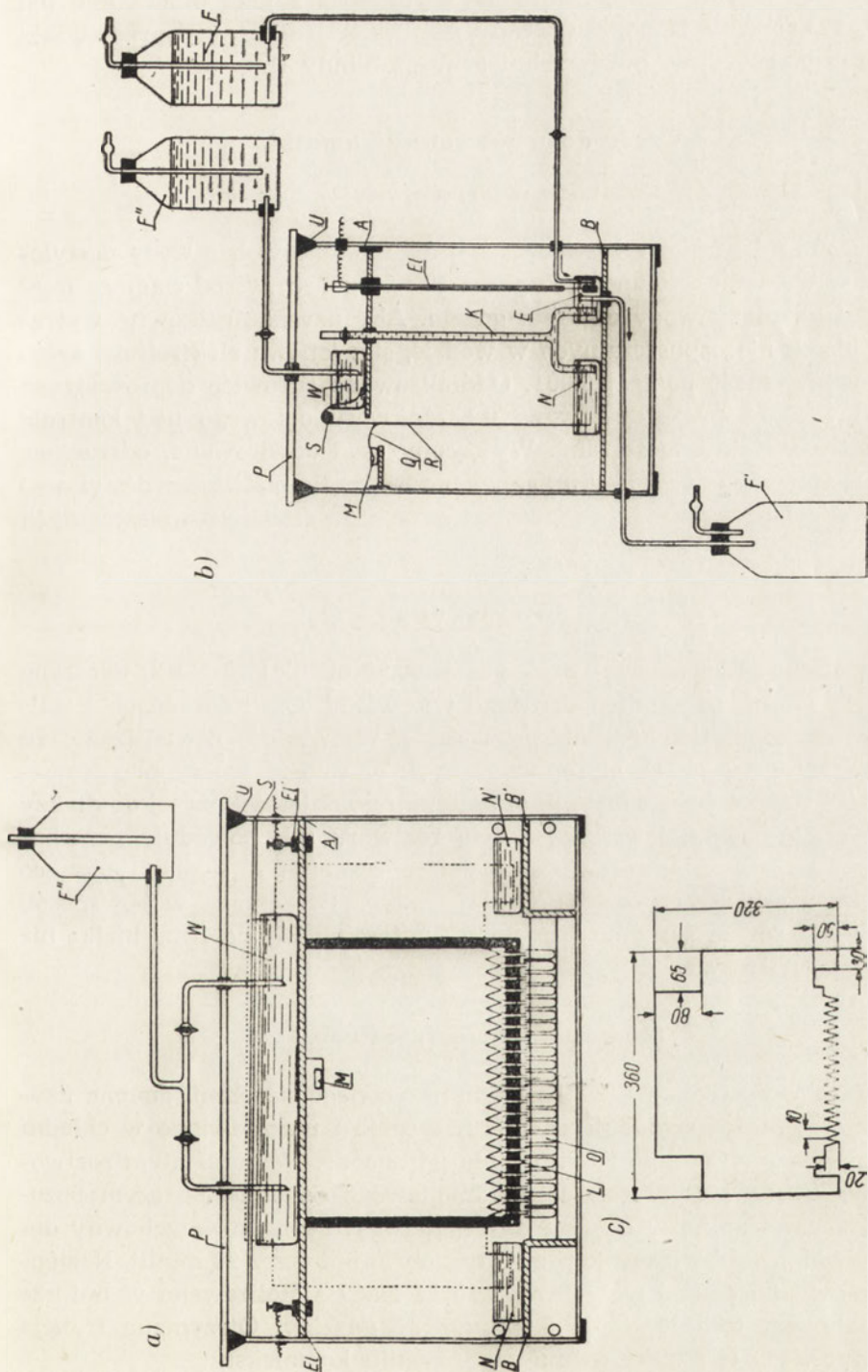
(strzałki wskazują kierunek spływania buforu)

platynowej o powierzchni  $1 \text{ cm}^2$  i utwierdzone w otworach półki A. Do tej półki przytwierdzony jest również statyw bakelitowy, w którym tkwią 23 szklane lejeczki L, umieszczone w odległości 1 cm jeden od drugiego. Na każdy lejeczek nałożony jest wężyk gumowy wprowadzony na zewnątrz aparatury, gdzie wchodzi do probówki O, stanowiącej odbieralnik.

Arkusz bibuły, mający kształt i rozmiary podane na rys. 2c, zawieszony jest na szklanym pręcie S i zanurzony w wannie W, do której ciągle

Schemat aparatury przedstawia rys. 2. Komorę aparatury stanowi akwarium o rozmiarach  $60 \times 30 \times 25 \text{ cm}$  z uszczelkami gumowymi U, na których spoczywa płyta z grubego szkła P. Wanna W z buforem, w której zanurzony jest górny brzeg arkusza bibuły, umieszczona jest na półce A, wykonanej z aluminiowej blachy. Na przygotowanych z tego samego materiału półkach B i B' znajdują się naczynka z buforem N i N' o pojemności ok. 300 ml, w których zanurzone są dolne końce odpowiednio wyciętego arkusza bibuły (por. rys. 2c). Naczynka N i N' są połączone za pomocą klucza elektrolitycznego K z naczynkami elektrodowymi E i E'. Naczynka elektrodowe o pojemności 150 ml mają kształt naczyń z przelewem, w celu ciągłej wymiany buforów i usuwania produktów elektrolizy. Bufor z butli F doprowadzony na dno naczynka E i E', odpływa do butli F' z szybkością ok. 2 l na dobę. Elektrody E1 i E1' zbudowane są z blaszki





Rys. 2. Schemat aparatury do ciągłej elektroforezy bibulkowej: a) przekrój czolowy, b) przekrój boczny, c) kształt arkusza bibuły (wymiary w mm). Objasnienia w tekście

dopływa bufor z butli F', z tą samą szybkością, z jaką bibuła ssie ten bufor. Z naczynka M doprowadzany jest materiał badany poprzez wąski paseczek bibuły Q do powierzchni arkusza bibuły R.

## Część doświadczalna i wyniki

### DIALIZOWANIE SUROWICY

Ok. 500 ml surowicy krwi bydlęcej dializowano wobec wody destylowanej w workach celofanowych przez 40—50 godzin wśród ciągłego mieszania i wymiany wody co kilka godzin. Aby uzyskać całkowite wytrącenie białek nierozpuszczalnych w wodzie, siła jonowa elektrolitów surowicy winna spaść poniżej 0,001. Oddializowaną surowicę doprowadzano do pH 5,2—5,3 przez dodawanie 0,1 M kwasu octowego pod kontrolą pH-metru z elektrodą szklaną. Wytrącony osad odwirowano, odrzucając płyn powierzchniowy. Osad przemywano 3-krotnie podwójnie destylowaną wodą celem wypłukania zaadsorbowanych na osadzie rozpuszczalnych białek.

### EKSTRAKCYJA OSADU

Do osadu dodawano w dwóch porcjach 50 ml 0'01 M NaCl, mieszano przez 10 minut, po czym poddawano wirowaniu. Osad odrzucono a dalsze oczyszczanie przeprowadzono tylko z roztworem. Stwierdzono, że ekstrakcję osadu białek nierozpuszczalnych w wodzie należy przeprowadzać 1/10 objętości roztworu soli w stosunku do objętości użytej do dializy surowicy. Wyciąganie większą ilością roztworu soli powoduje przechodzenie do roztworu dużej ilości białek z frakcji  $\beta$  i  $\gamma$ -globulinów, co utrudnia uzyskanie czystszych preparatów. Otrzymana w ten sposób frakcja F-2 zawiera średnio 5  $\times$  więcej witaminu B<sub>12</sub> na 1 mg białka niż surowica wyjściowa.

### FRACJONOWANIE SIARCZANEM AMONU

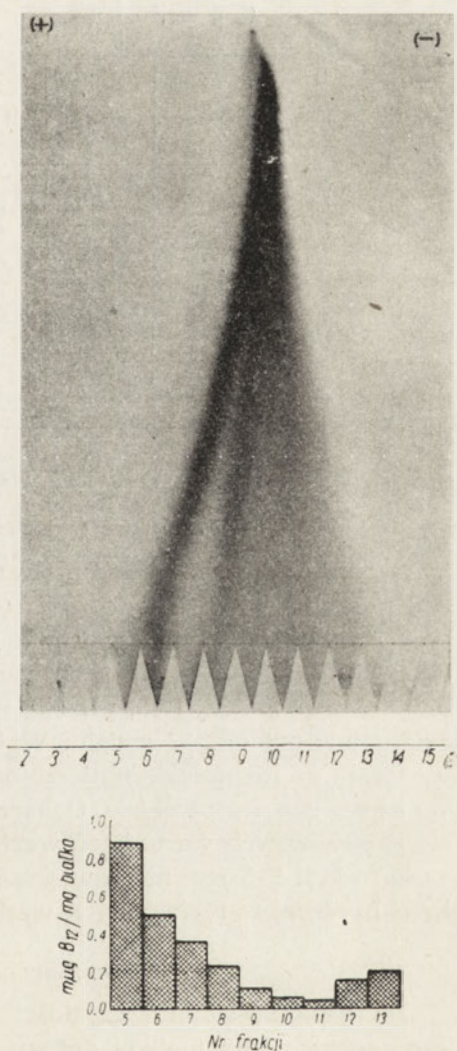
Do roztworu frakcji F-2 dodawano nasyconego siarczanu amonu, uzyskując stężenie odpowiadające 45% nasycenia i pozostawiono w chłodni na 4—5 godzin. Osad po odwirowaniu odrzucono. W pozostałym roztworze zwiększono stężenie siarczanu amonowego do 60%, po czym pozostawiono mieszaninę w chłodni na 24 godziny. Płyn powierzchniowy dekantowano, a osad wirowano przy 5 tys. obr./min. przez 20 minut. Następnie osad rozpuszczono w 1—2 ml 0,15 M NaCl i dializowano w buforze weronalowym 0,05 M o pH 8,6 przez 24 godziny. Otrzymana frakcja F-4 odpowiada ok. 22-krotnemu zagęszczeniu kompleksu.



## FRAKCJONOWANIE PRZY POMOCY CIĄGŁEJ ELEKTROFOREZY BIBUŁEWEJ

Fracjonowanie przeprowadzono posługując się powyższą aparaturą i stosując bibułę Whatmana Nr 1 o powierzchni rozdzielczej 260 × 220 mm z 23 odbieralnikami. Do rozdzielania stosowano bufor weronalowy o sile jonowej 0,05 i pH 8,6. Napięcie 360 V, natężenie 3,5 mA. Naczynko z roztworem oddializowanej frakcji F-4 łączono z powierzchnią arkusza bibuły paskiem bibuły o szerokości 1,5 mm.

Na rys. 3 przedstawiony jest elektroforogram z wybarwionymi frakcjami po rozdzieleniu frakcji F-4 oraz podany jest schematycznie stosunek witaminu B<sub>12</sub> do jednostki masy białka w poszczególnych frakcjach. Po elektroforetycznym rozdzieleniu dializowano uzyskane frakcje w 0,9% NaCl przez 24 godz. celem usunięcia buforu weronalowego, po czym autoklawowano w 105° przez 60 minut i oznaczano zawartość witaminu metodą mikrobiologiczną. Jak wynika z rys. 3, największe stężenie B<sub>12</sub> cechuje frakcję o największej ruchliwości anodowej F-5. Stadium elektroforetycznego frakcjonowania doprowadza do najdalej posuniętego zagęszczenia, gdyż przeciętnie frakcja F-5 zawiera ok. 625 razy więcej witaminu B<sub>12</sub> na jednostkę masy białka, niż surowica wyjściowa. Pokazną ilość witaminu stwierdza się prawie zawsze również we frakcjach o małej ruchliwości anodowej (frakcja Nr 11, 12, 13), ale witamin występując w tych frakcjach nie jest związany z białkiem. Odszczepia się on w czasie zabiegów związanych z oczyszczaniem, głównie skutkiem wysokiego pH buforu (3), gdyż jak wykazano [6], przy pH 8,7 następuje już częściowa dyssocjacja erytroglobulinu.



Rys. 3. Elektroforogram frakcji F-4 (barwiony czernią amidową 10B) oraz rozmieszczenie witaminu B<sub>12</sub> w poszczególnych frakcjach elektroforetycznych

Z 500 ml surowicy otrzymuje się w powyżej opisanych warunkach 1—2 mg frakcji F-5, zawierającej średnio 2,0 m  $\mu\text{g}$  B<sub>12</sub> w 1 mg białka. Tablica 1 zawiera dane odpowiadające 5 kolejno powtórzonym zabiegom oczyszczania erytroglobulinu.

Tablica 1

$\mu\text{g}$ B <sub>12</sub> na 1 mg białka				Stopień zagęszczenia w stosunku do surowicy wyjściowej		
surowica wyjściowa	F — 2	F — 4	F — 5	F — 2	F — 4	F — 5
1,03	5,7	28,5	750	5,5	27,6	727
1,22	7,5	40,8	860	6,1	33,4	705
3,81	13,7	45,0	1410	3,6	11,8	371
3,76	19,2	71,0	2790	5,1	18,9	740
4,80	21,4	93,8	2840	4,5	19,6	590
2,9	13,5	56,0	1730	5,0	22,3	625

## Własności erytroglobulinu

### RUCHLIWOŚĆ ELEKTROFORETYCZNA

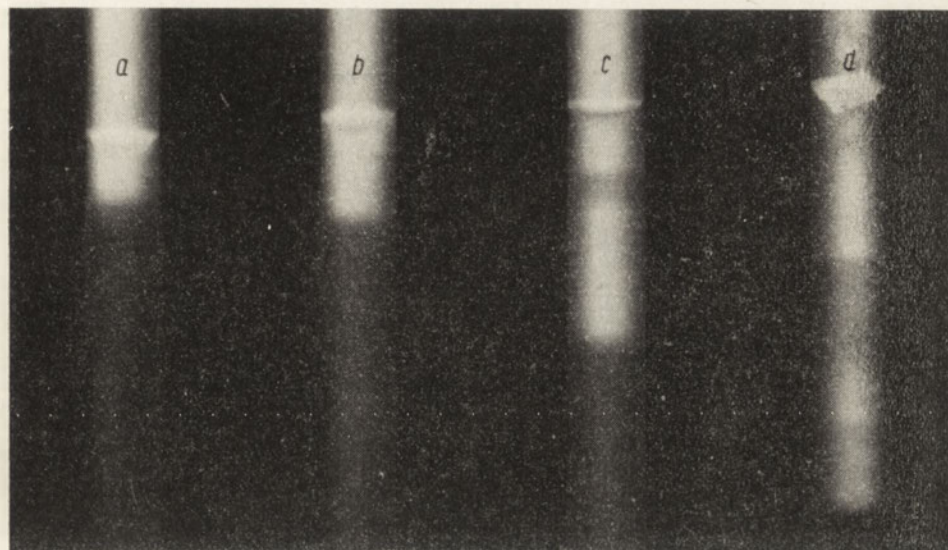
Badanie ruchliwości kompleksu otrzymanego po zagęszczeniu frakcji F-5 przez ultrafiltrację do zawartości ok. 0,5% białka, przeprowadzono przy pomocy zwykłej aparatury do elektroforezy bibułowej opisanej już przez nas poprzednio [7]. Stosowano bibułę Munktell 20, bufor weronałowy o sile jonowej 0,05, pH 8,6, napięcie 3,5 V/cm, temp. 20°, czas rozdziału wynosił ok. 17 godzin. Wpływ elektroosmozy określano przeprowadzając na równoległe umieszczonym pasku bibuły badanie zachowania się kropli roztworu glikozy. Oznaczona w ten sposób ruchliwość wyrażała się w powyższych warunkach wartością —  $6,99 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sek}^{-1}$ . Ruchliwość frakcji F-5 jest nieco większa niż frakcji  $\alpha_1$ -globulinów w surowicy krwi bydlęcej w tych samych warunkach.

### SPRAWDZANIE CZYSTOŚCI FRAKCJI F-5

Do badania stopnia czystości otrzymanego kompleksu zastosowano immunochemiczną metodę dyfuzji w agarze, opisaną przez Oudine'a [9], stosując postępowanie podane przez Munozę i Beckera [5]. Surowicę królika uodpornianego surowicą bydlęcą rozcieńczono 2,5 razy 0,9% roztworem NaCl, po czym mieszano ją z równymi objętościami



0,6% roztworu agaru w temp. 43°. Otrzymywano więc mieszaninę zawierającą 5-krotne rozcieńczenie surowicy odpornościowej i 0,3% agaru. Mieszaninę rozlewano do probówek o rozmiarach 90 × 3,5 mm, wypełniając ok. 2/3 wysokości probówki. Po oziębieniu i zestaleniu agaru, wkraplano na jego powierzchnię roztwory badanych frakcji, uzyskiwanych w toku oczyszczania kompleksu, będące antygenem dla surowicy odpornościowej i umieszczano w temp. 22°C. Po upływie 11 dni, w czasie których roztwór antygeny dyfundował do warstwy agaru, zmieszanej z su-



Rys. 4. Występowanie smug precypitacyjnych w agarze przy badaniu immunochemicznym: a) frakcja F-5, b) frakcja Nr 6 z rys. 3, c) frakcja F-4, d) pełna surowica bydłęca. Omówienie w tekście

rowicą odpornościową, uzyskano obrazy, które przedstawia rys. 4. Probówka a) zawiera antygen odpowiadający frakcji Nr 5 z rys. 3 (F-5, b) zawiera frakcję Nr 6, c) przedstawia obraz po zastosowaniu frakcji F-4, d) odpowiada efektowi po zastosowaniu niefrakcjonowanej surowicy bydłowej. Jak widać z rys. 4, w probówce a), której antygenem jest frakcja F-5, widać tylko jedną smugę odpowiadającą reakcji antygeny z przeciwciałem. W probówce b) widzimy dwie smugi. W probówce c), w której użyto jako antygeny frakcji F-4, uzyskanej tylko przez frakcjonowanie siarczanem amonu, widzimy 4 smugi odpowiadające reakcji antygeny z przeciwciałem, w probówce d), w której antygenem była nierozdzielana surowica, szereg smug.

Opisana powyżej immunochemiczna metoda nie daje wyników bezwzględnych, tzn. ilość smug nie zawsze odpowiada liczbie układów anty-

gen-przeciwiało reagujących w mieszaninie. Nigdy jednak ilość smug nie jest większa od ilości układów, a raczej mniejsza o 1 lub 2 [5]. Jakkolwiek więc frakcja F-5 wykazuje tylko jedną smugę dyfuzyjną, to nie dowodzi to jednak jednorodności tego białka. Inne znajdujące się jeszcze w tej frakcji antygeny mogą występować w bardzo małym stężeniu, skutkiem czego mogą nie wytwarzać odrębnych smug.

#### CHROMATOGRAFICZNY ROZDZIAŁ ERYTROGLOBULINU I WOLNEGO WITAMINU B<sub>12</sub>

Do prób tego rodzaju nadaje się szczególnie dobrze surowica krwi będącej, zawierająca mniej więcej połowę ogólnego stężenia witaminu B<sub>12</sub> w postaci wolnej, wykorzystywanej bezpośrednio w próbie mikrobiologicznej, bez uprzedniego autoklawowania [10]. Chromatografowanie oraz wykazywanie wolnego i związanego witaminu B<sub>12</sub> na pasku bibuły przeprowadzaliśmy według sposobu opisanego w poprzedniej naszej pracy [6]. Podstawowym rozpuszczalnikiem był 0,1 M roztwór sacharozy, do którego dodawano coraz większe stężenia alkoholu izopropylowego. W roztworze sacharozy bez dodatku alkoholu wolny witamin i jego połączenie z białkiem przesuwały się z jednakową szybkością: na chromatogramie występowała tylko jedna smuga wykazująca biologiczną aktywność witaminu o R<sub>f</sub> 0,92. Przy stężeniu 15% obj. izopropanolu smuga aktywności witaminu zatrzymywana na bibule była znacznie szerszą i cechowała się R<sub>f</sub> 0,78. Przy stężeniu 35% izopropanolu na chromatogramie występują dwie odrębne smugi, jedna o R<sub>f</sub> 0,33, druga o R<sub>f</sub> 0,78. Przy stężeniu 45% izopropanolu R<sub>f</sub> obu smug cechuje się wartościami 0,25 i 0,67, a przy stężeniu 50% izopropanolu — 0,14 i 0,52. Zastosowanie analizy mikrobiologicznej wykazało, że smuga o wyższym R<sub>f</sub> odpowiada położeniu wolnej cyjanokobalaminy, smuga o niższym R<sub>f</sub> odpowiada witaminowi B<sub>12</sub> związanemu z białkiem. Przy pewnym stężeniu izopropanolu można więc wygodnie oddzielić chromatograficznie wolny witamin B<sub>12</sub> od jego połączenia z białkiem, przy czym w miarę wzrostu stężenia izopropanolu w fazie ruchomej wartości R<sub>f</sub> stopniowo zmniejszają się.

#### Omówienie wyników

Z przedstawionych powyżej danych doświadczalnych wynika wniosek, że główna masa erytroglobulinu, a ściślej mówiąc witaminu B<sub>12</sub> związanego z białkiem jest składnikiem frakcji α<sub>1</sub>-globulinów surowicy krwi. Rys. 5 ilustruje znamieny fakt, że w miarę otrzymywania coraz czystszej frakcji kompleksu witamin B<sub>12</sub>-białko wzrasta ilość α<sub>1</sub>-globulinów, wykazywana przy pomocy elektroforezy tej frakcji. Oczywiście, nie można wyciągnąć stąd wniosków, aby w innych frakcjach uzyskanych

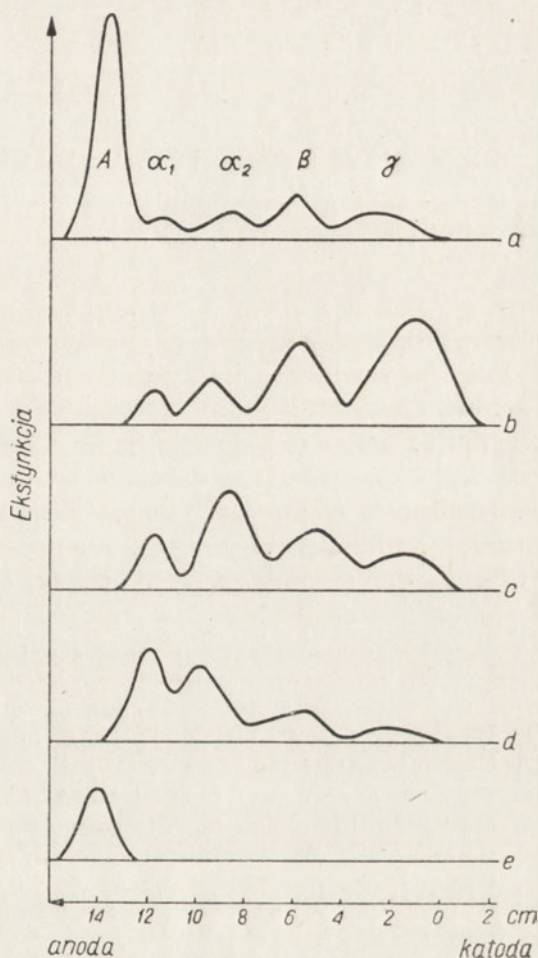


na drodze elektroforezy witamin B<sub>12</sub> był nieobecny. Obecność witaminu B<sub>12</sub> w tych frakcjach wykazuje wyraźnie rys. 3, przy czym w jednych frakcjach jest on związany z białkiem, w innych występuje jako wolny witamin.

Frakcja F-5 daje wyraźnie dodatni odczyn Moli-scha, co mogłoby wskazywać na glikoproteidowy charakter erytroglobulinu. Badanie tzw. kwaśnego  $\alpha_1$ -glikoproteidu surowicy, otrzymanego z przesącza surowicy odbiałzonego kwasem sulfosalicylowym po wytrąceniu alkoholem wykazuje, że białko to nie zawiera witaminu B<sub>12</sub>. Kwaśny  $\alpha_1$ -glikoproteid jest wraz z małą ilością  $\alpha_2$ -i  $\beta_1$ -globulinów oraz niskocząsteczkowych białek składnikiem frakcji VI Cohna. Badanie tej frakcji surowicy na obecność witaminu B<sub>12</sub> dało wynik ujemny.

Zdajemy sobie sprawę z tego, że mimo kilkusetkrotnego zagęszczenia otrzymany przez nas preparat nie może być czystym, jakkolwiek badania immunochemiczne i elektroforetyczne przemawiają za jednorodnością preparatu. Przyjmując, że 1 cz. witaminu wiąże się z 1 cz. białka oraz zakładając zupełnie dowolnie, że ciężar cząsteczkowy białka wiążącego witamin leży w rzędzie wielkości 50 tys. dochodzimy do wniosku, że na

1 mg czystego kompleksu powinno przypadać ok. 28  $\mu$ g witaminu na mg białka. Ponieważ przeciętna zawartość witaminu B<sub>12</sub> w surowicy krwi



Rys. 5. Kontrola elektroforetyczna poszczególnych frakcji w czasie oczyszczania kompleksu. Krzywe uzyskano przez fotometrowanie pasków bibuły przy pomocy fotoabsorbpcjometru [7] barwionych czernią emidową 10B. a) pełna surowica bydłęca, b) frakcji euglobulinów w surowicy bydłęcej, c) ekstrakt euglobulinów w 0'01 MNaCl (F-2), d) frakcja otrzymana przez wytrącenie siarczanem amonu (F-4), e) zagęszczony przez ultrafiltrację roztwór frakcji F-5.

bydłęcej wynosi 250  $\mu\text{g}$  to stężenie połączenia witamin-białko w surowicy leżałoby w rzędzie wielkości  $8.9 \times 10^{-7}\%$ . Dotychczasowe nasze wyniki oczyszczania można więc uważać jedynie za procedurę wstępną.

Kierownikowi Zakładu Prof. Dr B. Skarżyńskiemu za wydatną pomoc przy wykonywaniu oraz opracowywaniu wyników tej pracy składamy podziękowanie.

### Streszczenie

Przedstawiono sposób częściowego oczyszczania kompleksu witamin B<sub>12</sub>-białko (erytroglobulin) występującego w surowicy krwi bydłęcej, otrzymując preparat zagęszczony ok. 625-krotnie w porównaniu z surowicą wyjściową. Zbadano dalsze własności fizyko-chemiczne kompleksu, jak ruchliwość elektroforetyczną, własności antygenowe oraz zdolność adsorpcji na bibule.

Opisano uproszczony aparat do ciągłej elektroforezy bibułowej.

### L I T E R A T U R A

- [1] Durrum E. L., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4875, 1951.
- [2] Grassmann W. i Hannig K., *Z. Physiol. Chem.*, 296, 30, 1954.
- [3] Latner A. L. i Ungley C. C., *Brit. Med. J.*, I, 467, 1953.
- [4] Mejsbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Pol.* 2, 279, 1955.
- [5] Munoz J. i Becker L., *J. Immunol.* 65, 47, 1950.
- [6] Ostrowski W., *Acta Biochim. Pol.*, 2, 297, 1955.
- [7] Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.* 3, 277, 1952.
- [8] Ostrowski W., Skarżyński B. i Żak Z., *Bull. Acad. Pol. Sci.* 2, 9, 1954; *Acta Biochim. Pol.* 1, 13, 1954.
- [9] Oudin J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 29, 140, 1947; *Ann. l'Inst. Pasteur* 75, 30, 109, 1948.
- [10] Skarżyński B., Ostrowski W., Niewiarowska A. i Żak Z., *Acta Biochim. Pol.* 2, 115, 1955.

СОЕДИНЕНИЕ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> С БЕЛКАМИ. IV. ОЧИСТКА И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА ВИТАМИН В<sub>12</sub> — БЕЛОК В СИВОРОТКЕ КРОВИ СКОТА

### Резюме

Представлен способ частичной очистки комплекса витамин В<sub>12</sub>-белки (эритроглобулин), выступающего в сыворотке крови скота.



путем которого получается препарат сгущенный раз в 625, сравнительно с исходной сывороткой. Изучены также и другие физико-химические свойства комплекса, как электрофорезная подвижность, противогенные свойства и способность адсорбции на фильтрационной бумаге.

Описан упрощенный аппарат для постоянного бумажного электрофореза.

#### PROTEIN-VITAMIN B<sub>12</sub> COMPLEXES

#### IV. THE PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE VITAMIN B<sub>12</sub>-PROTEIN COMPLEX (ERYTHROGLOBULIN) IN THE BOVINE BLOOD SERUM

### S u m m a r y

The authors presented a method of partial, purification of the vitamin B<sub>12</sub>-protein complex (erythroglobulin), which appears in the bovine blood serum, obtaining a concentrated preparation condensed about 625 times as compared with the initial serum. They investigated the further physico-chemical properties of the complex, such as electrophoretic mobility, antigen properties and the adsorption capacity on filter paper. They also described a simplified device for a continued filter paper electrophoresis.

Otrzymano 15.12.1955 r.





W. BICZ

**ZASTOSOWANIE METODY NURKÓW KARTEZJUSZA DO BADANIA PRZEMIANY GAZOWEJ KOMÓREK ZWIERZĄT STAŁOCIEPLNYCH**

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie  
Kierownik prof. Dr. B. Skarżyński*

W r. 1937 Linderström-Lang po raz pierwszy użył klasycznej metody nurków Kartezjusza jako podstawę gazometrycznej ultramikrometody mogącej znaleźć zastosowanie do badania metabolizmu gazowego bardzo małych obiektów biologicznych [5], [7], [8]. Metoda ta w ciągu następnych lat została ulepszona i zmodyfikowana, zarówno w pracowni Linderströma-Langa [6], [9], jak i przez innych autorów [2], [11], [13]. Zasadą Anfinsena i Claffa [1], [3], było opracowanie technicznych zabiegów pozwalających na mieszanie ze sobą różnych substancji w obrębie nurka podczas trwania eksperymentu.

Dzięki tym ulepszeniom metoda nurków Kartezjusza znalazła zastosowanie do badania różnych tworów biologicznych, których masa jest zbyt mała do przeprowadzania badań metodą manometryczną Warburga. Wszystkie badania przeprowadzane tą metodą ograniczały się jednak wyłącznie do śledzenia metabolizmu komórek organizmów ciepłochwiewnych. Jedynie Waterlow i Borrow [12] próbowali stosować nurki Kartezjusza do badań tkanek ssaków, posługując się nurkami o szerokich szyjkach, powlekanych silikonem. Z polskich badaczy Pigoń [10] celem zwiększenia czułości pomiaru opracował typ nurka wypełnianego olejem.

To ograniczenie zakresu stosowania tej metody wynikało stąd, że oznaczenia gazometryczne  $(Q_{O_2}, Q_{CO_2}^{N_2}, Q_{CO_2}^{O_2})$  przeprowadzane na materiale pobranym ze zwierząt stałocieplnych wymagają przeprowadzenia doświadczenia w temperaturze wyższej od otoczenia. Po wypełnieniu nurków Kartezjusza, przeprowadzonym w temperaturze pokojowej, faza gazowa tych naczynek po ich umieszczeniu w temp. 37° ulega tak znacznemu zwiększeniu objętości, że zawartość nurka zostaje wypchnięta do

pływu flotacyjnego, zmieniając wybitnie ciężar wypełnionego nurka. Można było uniknąć tych trudności przeprowadzając zawile zabiegi wypełniania nurka w izolowanej kabinie, której temperatura nie różniła się znacznie od temperatury, w jakiej ma być wykonane doświadczenie. Oczywiście takie rozwiązanie tych trudności technicznych jest bardzo uciążliwe i niewygodne, wybitnie ograniczając możliwość korzystania z tej wartościowej ultramikrometody.

Poza tym, znacznie wyższa wymiana gazowa tkanek w temperaturze  $37^{\circ}$  zmusza do dokładnego uwzględnienia czynnika szybkości dyfuzji gazów przez warstwę cieczy w nurku, w jakiej zachodzą badane reakcje. Podczas badania metabolizmu komórek ustrojów zmiennocieplnych w temp. pokojowej, szybkość dyfuzji komplikuje wyniki doświadczenia w stosunkowo nieznacznym stopniu. Natomiast w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  czynnik ten wpływa na uzyskiwane wartości liczbowe decydująco, jak o tym będzie poniżej mowa.

Dla zastosowania nurków Kartezjusza do badań przemiany gazowej komórek zwierząt stałocieplnych koniecznym było rozwiązanie dwojakich trudności wiążących się dotychczas z tą metodą:

1. Konstrukcja dającego się zastosować w obrębie nurka mieszalnika, eliminującego przez wytrząsanie badanego materiału wpływ czynnika dyfuzji gazów w obrębie nurka.
2. Zastosowanie sposobu wypełniania nurków Kartezjusza w temp. pokojowej, umożliwiającego następnie przeprowadzanie pomiarów w  $37^{\circ}\text{C}$ .

Poniższe doniesienie przedstawia sposób rozwiązania tych dwóch zadań.

### 1. Mikromieszalniki i nurki magnetyczne

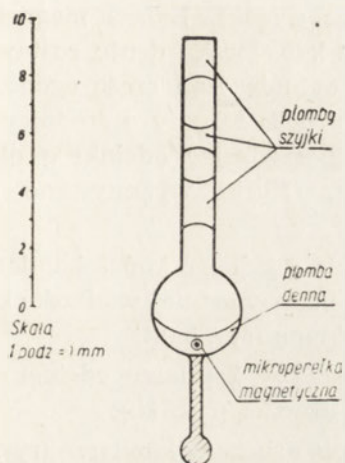
#### Zasada metody:

Mała perelka szklana, zawierająca wewnątrz zatopiony kawałek żelaza, przystosowana wymiarami do średnicy szyjki nurka i umieszczona na dnie jego bańki, spełnia rolę mikromieszalnika (rys. 1).

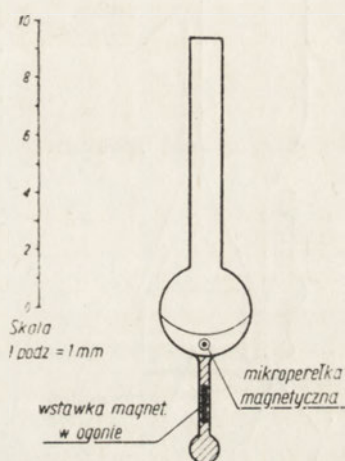
Na mikroperełkę magnetyczną działa od zewnątrz zmienne pole magnetyczne, wytworzone przez elektromagnes, zanurzony w łaźni wodnej obok ścianki naczynka flotacyjnego. Przerwy w prądzie płynącym przez elektromagnes, uzyskane automatycznym przerywaczem, wprawiają w ruch mikroperełkę magnetyczną, która w zależności od częstości przerw w obwodzie elektromagnesu wytrząsa zawartość bańki nurka z różną szybkością. Chcąc posługiwać się słabymi elektromagnesami dzwonicowymi musimy przesunąć nurek z pozycji środkowej naczynka flotacyjnego do jego ścianki, pozostającej w najbliższym sąsiedztwie elektromag-



nesu. Efekt ten uzyskujemy przez zastosowanie specjalnych nurków magnetycznych (rys. 2) posiadających wewnątrz ogona powyżej kulistego zakończenia, wtopiony kawałek drucika żelaznego. Nurek tego typu zostaje przesunięty przez pole magnetyczne do ścianki naczynka flotacyjnego, skutkiem czego bańka nurka i mieszcząca się wewnątrz niej mikroperelka magnetyczna zostają przeniesione w obręb silniejszego pola magnetycznego. Przed samym odczytem zmiany ciśnienia w manometrze, przerywamy wytrząsanie i sprowadzamy nurka do pozycji środkowej naczyn-



Rys. 1. Nurek Kartezjusza z mikroperelką magnetyczną



Rys. 2. Nurek magnetyczny

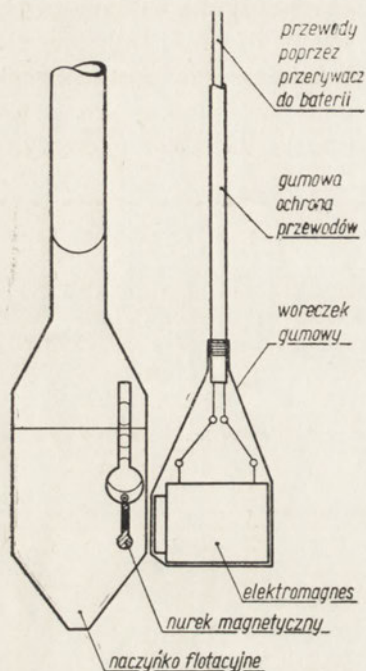
ka flotacyjnego. W przerwie tej dokonujemy odczytu manometru, następnie sprowadzamy nurek na dno naczynka stosując nieco zwiększone ciśnienie, włączamy ponownie układ wyrząsania i kontynuujemy oznaczenie (rys. 3).

#### WYKONANIE MIKROPERELKI MAGNETYCZNEJ

1. Wyciągnąć kapilarę o odpowiedniej średnicy.
2. Umieścić w połowie długości kapilary maleńki odcinek drucika żelaznego (rys. 4a).
3. Stopić w obrębie mikroplamienia szkło z metalem i szybkim ruchem wyciągnąć kapilarę, formując po obu stronach zatopionego drutu włosy szklane (rys. 4b).
4. Odłamać boczne włosy blisko masy perełki i stopić odłamane końce z jej masą szklaną (rys. 4c).

Przy zastosowaniu odpowiedniego kształtu drucika żelaznego i przy zręcznym wyciągnięciu kapilary sporządzona perełka powinna przyjąć

kształt kulisty. Mikroperełkę magnetyczną należy oglądać pod lupą i zwrócić uwagę na to, czy cała masa metalu pokryta została szkłem. Wymiary mikroperełki winny być przystosowane do wymiarów nurka.



Rys. 3. Nurek magnetyczny w naczynku flotacyjnym obok elektromagnesu

#### WYKONANIE NURKÓW MAGNETYCZNYCH

Nurki magnetyczne wykonujemy ze szklanych kapilar o odpowiednio dobranych rozmiarach wewnętrznej średnicy i grubości ścianki. Balast magnetyczny w postaci kawałeczka drutu zostaje wtopiony w cylindryczną część ogona. Użyliśmy drucik żelazny o średnicy około 0,5 mm, sporządzając odcinki o długości 2—3 mm. Nurki wykonywano następująco:

1. Zatopić z jednego końca kapilarę formując odpowiedniej wielkości kuleczkę szklaną (rys. 5a).
2. Umieścić w kapilarce odcinek żelaznego drucika (rys. 5b).
3. Zatopić drucik w kapilarze (rys. 5c). Podczas zatapiania zwrócić uwagę na to, aby w szkłe nie pozostawało bąbleczki powietrza i aby drucik został całkowicie wtopiony.
4. Uformować bańkę nurka odpowiedniej wielkości (rys. 5d).
5. Odciąć na odpowiedniej wysokości szyjkę (rys. 5e) i sprawdzić pod lupą poprawne wykonanie nurka.



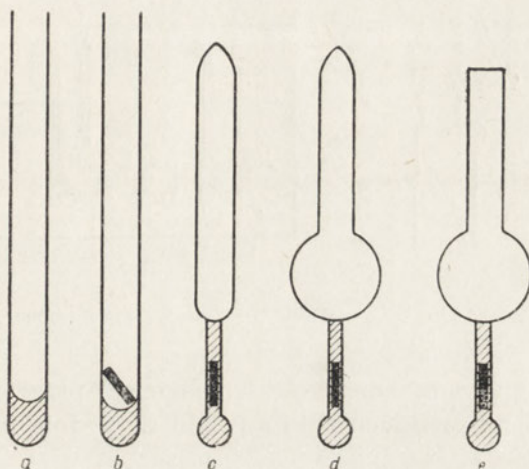
Rys. 4. Etapy wykonania mikroperełki magnetycznej

- a. Kawałek drucika żelaznego umieszczony w kapilarce
- b. Wyciągnięta kapilarka nad mikropalnikiem
- c. Uformowana mikroperełka

Pozostałe szczegóły dotyczące techniki wyrobu nurków stosowano według Holtera [4].



Nurki te posiadają tę zaletę, że pomijając obecność balastu magnetycznego mają usztywnioną część cylindryczną ogona, co w znacznym stopniu ułatwia dotopienie włosów szklanych podczas cechowania bez niebezpieczeństwa deformacji bańki nurka. Cechowanie nurków magnetycznych przeprowadza się uwzględniając we wzorze na ( $g_N$ ) masę żelaza użytego na wykonanie mikroperełki i wstawki magnet. jako dodatkową plombę.



Rys. 5. Kolejne etapy wykonania nurka magnetycznego

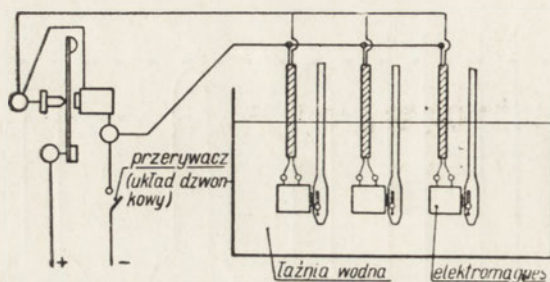
- a. Zatopienie kapilary
- b. Umieszczenie wstawki magnet.
- c. Zatopienie wstawki i ztopienie ogona
- d. Uformowanie bańki nurka
- e. Odcięcie zbywającej części szyjki

#### WYKONANIE URZĄDZENIA WYTRZĄSAJĄCEGO

**Elektromagnesy.** Stosowaliśmy pojedyncze elektromagnesy dzwonkowe, które po wymontowaniu z oprawki dzwonnka umieszczano w cienkim woreczku gumowym. Oba wolne końce uzwojenia przedłużone zostały drutami biegnącymi wewnątrz cienkiej rurki gumowej, na której dolnej części zawiązywano woreczek osłaniający elektromagnes (rys. 3). Długość rurki gumowej i wewnętrznych przewodów dostosowane były do głębokości zanurzenia elektromagnesu w łaźni wodnej. Sam elektromagnes zabezpieczony przed zetknięciem się z wodą umieszczano przy ścianie każdego naczynka flotacyjnego, w którym pływa nurek magnetyczny, łącząc wolne końce przewodów doprowadzających do uzwojenia z przewodami biegnącymi przez automatyczny przerywacz.

## AUTOMATYCZNY PRZERYWACZ

Rolę automatycznego przerywacza spełniał zwyczajny dzwonek, po usunięciu z niego metalowej muszli dzwonekowej. Podłączenie do źródła prądu i obwodu elektromagnesów przedstawiono na rys. 6. Szybkość wytrząsania regulowano przez odpowiednie nastrajanie (regulacja odległości



Rys. 6. Schemat urządzenia wytrząsającego

między sprężyną a rdzeniem elektromagnesu) przerywacza oraz przez zmianę napięcia na zaciskach źródła prądu względnie transformatora.

## ZRODŁO PRĄDU

Źródło prądu w naszych pracach stanowił transformator z końcówkami, 4, 6, 12, 24 V. Do tego celu można używać baterii względnie akumulatora.

## WPŁYW WYTRZĄSANIA NA WYNIK POMIARÓW ŻUŻYCIA TLENU

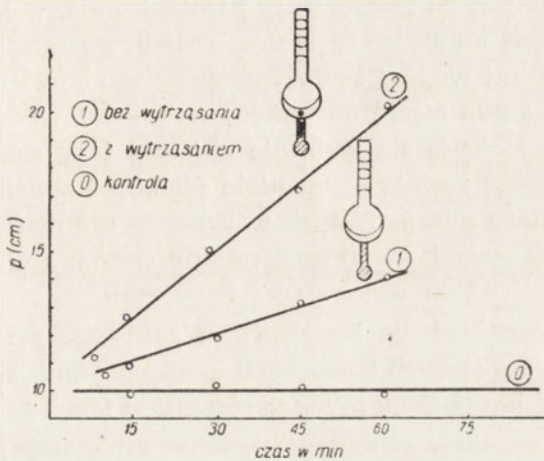
Badanie przeprowadzono z komórkami drożdży i z komórkami szpiku kostnego posługując się zarówno klasycznymi nurkami Kartezjusza, jak i nurkami magnetycznymi. Pomiary przeprowadzono w termostacie wodnym w temp. 37°C, stosując poniżej opisaną metodę wypełniania nurków.

Do doświadczenia użyto zawiesziny komórek drożdży piekarnianych w roztworze Krebsa-Ringera z dodatkiem buforu fosforanowego o pH 7,4. W wypadku przeprowadzania pomiaru zużycia tlenu przez komórki szpiku kostnego, posługiwano się zawiesiną szpiku kostnego otrzymanego z mostka białej myszy w roztworze Krebsa-Ringera z buforem fosforanowym. W obu wypadkach, zarówno klasyczne nurki Kartezjusza, jak i nurki magnetyczne wypełniano tymi samymi ilościami (1,5  $\mu$ l) jednorodnej zawiesziny komórek drożdżowych, czy też szpiku kostnego. Pomiar

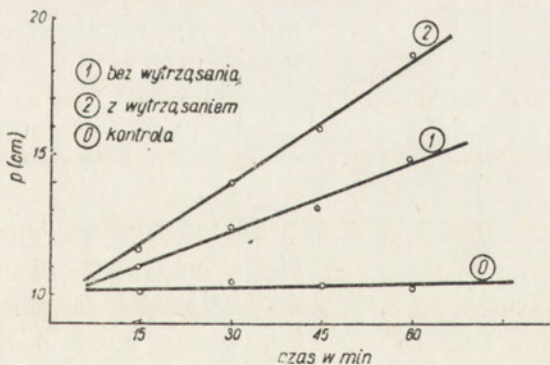


zużycia tlenu wyrażano zmianą ciśnienia, odczytaną na manometrze w mm słupa płynu Brodiego (rys. 7a i 7b).

Jak wynika z rys. 7a, zużycie tlenu przez zawieszinę komórek drożdżowych, podczas stosowania systemu wytrząsania w nurkach Kartezjusza,



Rys. 7a. Zużycie tlenu przez komórki drożdży  
p — ciśnienie (płyn Brodiego)



Rys. 7b. Zużycie tlenu przez komórki szpiku kostnego p — ciśnienie (płyn Brodiego) w cm

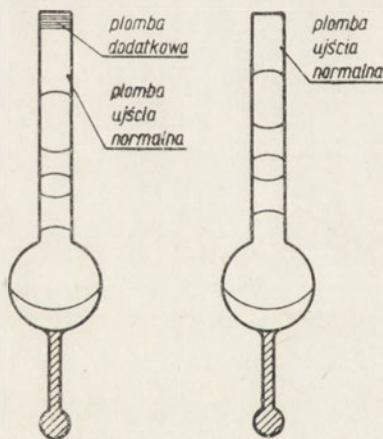
było o 150% większe od zużycia tlenu przez tę samą ilość materiału bez wytrząsania. Podobny efekt zaobserwowano badając zawieszinę komórek szpiku kostnego myszy (rys. 7b).

## 2. Przeprowadzenie pomiarów w nurkach Kartezjusza w temperaturach wyższych od temperatury pracowni

Główne założenia techniki posługiwania się nurkami Kartezjusza przewidują przeprowadzenie pomiarów w termostacie wodnym, którego temperatura zbliżona jest do temperatury pomieszczenia, w jakim nurek był wypełniany. Jeżeli nurek przed umieszczeniem go razem z naczynkiem flotacyjnym w łaźni wodnej był wypełniany w atmosferze, której temperatura jest znacznie niższa od temperatury łaźni wodnej, spełniającej rolę termostatu, zmienia się wybitnie objętość fazy gazowej w nurku, w następstwie czego zostają przesunięte plomby i zmienia się pokaźnie ciężar wypełnionego nurka. W tych warunkach nie można ustalić nurka na wycechowanej pozycji za pomocą zmiany ciśnienia w dopuszczalnych granicach (cd 5 do 10 cm słupa cieczy Brodiego).

Przeprowadzając badania metabolizmu gazowego przy pomocy nurków Kartezjusza na żywych komórkach ludzkich (szpik kostny) wykonywałem pomiary zużycia tlenu przez te obiekty w temp. 37—38°C. Początkowo wypełniałem nurki w szklanej kabinie spełniającej rolę termostatu,

o temperaturze powietrza utrzymywanej w granicach temperatury łaźni wodnej. Praca z nurkami w kabinie-termostacie podczas wykonywania serijnych i częstych pomiarów jest niewygodna i uciążliwa. Trudności związane z tym rozwiązałem w następujący sposób:



Rys. 8 a i b

Nurek przed  
umieszczeniem  
w łaźni

Nurek po  
umieszczeniu  
w łaźni

### ZASADA POMIARU

Znając różnicę temperatur otoczenia i łaźni wodnej obliczamy przyrost objętości fazy gazowej w nurku, który musi nastąpić w chwili umieszczenia wypełnionego w temperaturze otoczenia nurka w łaźni wodnej o znacznie wyższej temperaturze. Obliczoną wartość przyrostu objętości przeliczamy na wartość masy płynu flotacyjnego, która stanowić będzie dodatkowe obciążenie nurka w postaci plomby ujścia powiększonej o tę wartość. Nurek wypełniony w temperaturze pokojowej i zamknięty



plombą ujścia, której objętość równa jest sumie objętości plomby normalnej i dodatkowej (obliczonej) będzie w temperaturze pokojowej względem płynu flotacyjnego o tyle za ciężki, ile wynosi ciężar dodatkowej części plomby ujścia. Po umieszczeniu w łaźni o temperaturze wyższej, napełniony w ten sposób nurek straci na wadze dzięki wypchnięciu dodatkowej części plomby przez rozszerzającą się fazę gazową nurka. W ten sposób nurek wypełniony w temperaturze pokojowej, a umieszczony w łaźni wodnej o temperaturze wyższej, uzyskuje ciężar równoważny z płynem flotacyjnym, co umożliwi przeprowadzanie pomiarów według klasycznych zasad (rys. 8).

#### OBLICZENIA

Dodatkową objętość plomby ujścia obliczamy dla każdego nurka wykorzystując jego stałą gazową ( $V$ ), która jest całkowitą objętością fazy gazowej nurka, gdy ten ostatni jest wypełniony i znajduje się w równoważnej pozycji w płynie flotacyjnym pod ciśnieniem  $P$  i w temp.  $t$ .

Stałą tę można obliczyć:

1. z różnicy całkowitej objętości samego nurka i całkowitej objętości fazy ciekłej, albo
2. z poniższego wzoru

$$1) \quad V = \frac{g_N + V_{ol} \varphi_{ol} + V_w \varphi_w - V_{ol} \varphi_M - V_w \varphi_M - [g_N \varphi_M / \varphi_{sz}]}{\varphi_M}$$

gdzie:  $g$ ,  $V$ ,  $\varphi$  oznaczają: masę, objętość i gęstość, a wskaźniki  $N$ ,  $ol$ ,  $w$ ,  $M$ ,  $sz$  oznaczają kolejno: nurek, olej parafinowy, wodną fazę, płyn flotacyjny i szkło. Wzór ten wyprowadzony jest z równania wyrażającego stan równowagi pomiędzy gęstością płynu flotacyjnego a gęstością wypełnionego nurka:

$$2) \quad \varphi_M = \frac{g_N + V_{ol} \varphi_{ol} + V_w \varphi_w}{V + V_{ol} + V_w + g_N / \varphi_{sz}}$$

Jeżeli wypełniony nurek w temp. pokojowej ( $t_1$ ), posiadający obliczoną wg powyższego wzoru stałą ( $V$ ), zostanie umieszczony w temp. wyższej ( $t_2$ ), to faza gazowa (stała  $V$ ) ulegnie zwiększeniu objętości i przyjmie wartość (przy zachowaniu tego samego ciśnienia):

$$3) \quad V_{t_2} = V_{t_1} \frac{T_2}{T_1}$$

gdzie  $V_{t_1}$  = objętość fazy gazowej nurka w temp. pokojowej ( $t_1$ )

$V_{t_2}$  = objętość fazy gazowej nurka w temp. wyższej ( $t_2$ )

$T_0$  = temperatura bezwzględna = 273°K

$T_1 = T_0 + t_1$

$T_2 = T_0 + t_2$

Z różnicy objętości fazy gazowej nurka w temp. pokojowej  $t_1$  ( $V_{t_1}$ ) i objętości fazy gazowej w temp. wyższej  $t_2$  ( $V_{t_2}$ ) obliczamy przyrost objętości fazy gazowej ( $\Delta V$ ) podczas zmiany temperatury od  $t_1$  do  $t_2$

$$(4) \quad \Delta V = V_{t_2} - V_{t_1}$$

Ponieważ  $V_{t_1}$  jest obliczoną dla każdego nurka stałą gazową  $V$  przeto znając tylko stałą ( $V$ ) nurka i różnicę temperatur ( $t_2 - t_1$ ) możemy obliczyć  $\Delta V$  dla każdego nurka według ogólnego wzoru:

$$(5) \quad \Delta V = V \frac{T_2 - T_1}{T_1}$$

Otrzymany przyrost objętości ( $\Delta V$ ) stanowi zarazem dodatkową objętość plomby ujścia, o którą należy powiększyć pierwotną plombę podczas wypełniania nurka w temp. pokojowej  $t_1$ . Wobec tego nurek wypełniony w temp. pokojowej ( $t_1$ ) i zamknięty plombą ujścia powiększoną o obliczoną objętość  $\Delta V$ , po następnym umieszczeniu go w wyższej temperaturze łaźni ( $t_2$ ), utraci dodatkową objętość plomby ujścia  $\Delta V$ , która zostanie wypchnięta do płynu flotacyjnego przez rozszerzoną fazę gazową.

Założenie plomby ujścia przeprowadzamy następująco: dodając obliczoną wartość  $\Delta V$  do objętości pierwotnej plomby ujścia ( $V_M$ ) uzyskujemy objętość powiększonej plomby ujścia ( $\Delta V + V_M$ ). Znając średnicę szyjki nurka ( $d$ ) możemy obliczyć długość odcinka szyjki nurka ( $h$ ), który winien być wypełniony plombą ujścia o objętość  $V_M + \Delta V$ .

$$(6) \quad h = \frac{(V_M + \Delta V) 4}{\pi d^2}$$

Znając długość odcinka szyjki nurka ( $h$ ) przeprowadzamy założenie plomby ujścia wg klasycznej metody, posługując się przy tej czynności poziomym mikroskopem z poprzeczną podziałką.



## Przykład obliczenia:

Zbadać należy zużycie tlenu ( $Q_{0_2}$ ) przez zawieszinę komórek posługującą się nurkami Kartezjusza. Pomiar wykonany ma być w temp.  $38^\circ\text{C}$  ( $t_2$ ). Wypełnianie nurków prowadzone ma być w temp. pokojowej  $18^\circ\text{C}$  ( $t_1$ ).

W podanym przykładzie do dyspozycji mamy nurki o następujących danych:

Nurek Nr	Waga nurka w mg	Objętość nurka $\mu\text{l}$	$\varphi_{sz}$	$\varphi_{01}$	$\varphi_M$	Śred. szyjki mm [d]	Dług. plomby ujścia mm [h]
1. (komórki)	19,01	19,2	2,4	0,87	1,325	0,75	2,7
2. (kontr.)	19,71	20,1	2,4	0,87	1,325	0,81	2,5
3. (komórki)	22,03	21,2	2,4	0,87	1,325	0,80	2,5

Nurki wypełniamy następującymi objętościami płynów:

- kropla denna  $0,8 \mu\text{l}$  (zawiesina komórek),
- niska plomba szyjki  $0,5 \mu\text{l}$  ( $0,1 \text{ n NaOH}$ ),
- plomba z oleju paraf.  $0,4 \mu\text{l}$ ,

Przed przystąpieniem do właściwego wypełnienia nurka obliczamy dodatkową objętość plomby ujścia z równania (5):

$$\Delta V = V \frac{T_2 - T_1}{T_1}$$

gdzie:  $\Delta V$  — dodatkowa objętość plomby ujścia,  $V$  — stała gazowa nurka (obliczona z równania (1),  $T_1 = 273 + 18 = 291$ ,  $T_2 = 273 + 38 = 311$ ).  
Obliczamy stałą gazową nurka ( $V$ ) wg wzoru (1).

Dla nurka Nr 1:

$$V = \frac{19,01 + 0,4 \cdot 0,87 + 1,3 \cdot 1,0 - 0,4 \cdot 1,325 - 1,3 \cdot 1,325 - \frac{19,01 \cdot 1,325}{2,40}}{1,325} = 5,97 \mu\text{l}$$

Znając stałą gazową ( $V$ ) nurka Nr 1 obliczamy z równania (5) dodatkową objętość plomby ujścia:

$$\Delta V = 5,97 \frac{311 - 291}{291} = 0,41 \mu\text{l}$$

Obliczona wartość dla rozważanego przykładu 0,41  $\mu\text{l}$  stanowi objętość dodatkowej plomby ujścia, o którą to ilość należy powiększyć normalną plombę ujścia ( $V_M$ ). Dopiero po założeniu takiej plomby ujścia, której objętość równa jest sumie objętości normalnej plomby ( $V_M$ ) i dodatkowej ( $\Delta V$ ), możemy przystąpić do przeprowadzenia pomiarów w temp. 38°C. W naszym wypadku całkowita objętość plomby ujścia ( $V_M + \Delta V$ ) równa jest:

$$\frac{\pi d^2}{4} h + \Delta V = 1,60 \mu\text{l}$$

$$\text{ponieważ } V_M = \frac{\pi d^2}{4} h$$

gdzie:  $V_M$  = objętość plomby ujścia normalnej (obliczonej dla temperatury 18°C),  $d$  = średnica szyjki nurka mm,  $h$  = wysokość normalnej plomby ujścia ( $V_M$ ) w szyjce nurka w mm,  $\Delta V$  = objętość dodatkowej plomby ( $\mu\text{l}$ ).

Po założeniu plomby ujścia z płynu flotacyjnego o objętości 1,60  $\mu\text{l}$  w szyjce nurka Nr 1 umieszczamy wypełnionego nurka z naczynkiem flotacyjnym w termostacie o temp. 38°C i po wyrównaniu temperatur przeprowadzamy pomiar zużycia tlenu.

Podobne obliczenia wykonujemy dla każdego nurka z osobna.

### Streszczenie

Podano modyfikację metody nurków Kartezjusza mającej na celu przystosowanie tego postępowania do badania metabolizmu gazowego komórek zwierząt ciepłokrwistych.

1. Podano metodę magnetycznego wytrząsania mieszanin reagujących w bańce nurka Kartezjusza podczas trwania pomiaru. Wprowadzono nowy typ nurka magnetycznego z mikroperełką magnetyczną.

2. Wykazano, że zużycie tlenu przez zawiesinę komórek drożdżowych podczas stosowania systemu wytrząsania jest o około 150% wyższe od wartości zużycia tlenu przez ten sam materiał bez wytrząsania. Podobną zależność wykazano używając do oznaczeń zawiesiny komórek szpiku kostnego myszy.

3. Podano metodę wypełniania nurków Kartezjusza do przeprowadzania pomiarów w temp. wyższych od temp. otoczenia. Zastosowano zamknięcie ujścia szyjki nurka dodatkową plombą płynu flotacyjnego, która wypchnięta zostaje podczas zmiany temperatury. Objętość tej plomby oblicza się z przyrostu fazy gazowej.



## L I T E R A T U R A

- [1] Anfinsen C. B., Claiff C. L., *J. Biol. Chem.* **167**, 27, 1947.
- [2] Boel E. J., Koch H., Needham J., *Proc. Roy. Soc. London*, **127 B**, 363, 1939.
- [3] Claiff C. L., Thamisian, *J. Biol. Chem.* **179**, 577, 1949.
- [4] Holter H., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg Ser. Chim.* **24**, 399, 1943.
- [5] Linderström-Lang K., *Nature* **140**, 108, 1937.
- [6] Linderström-Lang K., Glick D., *Compt. rend. trav. Carlsberg, Ser. Chim.* **22**, 300—306, 1938, cyt. wg. Glick D., *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, 342, 1949.
- [7] Linderström-Lang K., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim.* **24**, 249, 1942.
- [8] Linderström-Lang K., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.* **24**, 333, 1943.
- [9] Linderström-Lang K., Holter H., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim.* **24**, 105, 1942.
- [10] Pigoń A., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **1**, 65, 1953.
- [11] Rocher H., *Compt. Rend. Soc. biol.* **136**, 366, 1942.
- [12] Waterlow M., Borrow E., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim.* **27**, 93, 1949, cyt. wg. *Chem. Abstr.* Vol. 44, 5423e, 1950.
- [13] Zeuthen E., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim.* **24**, 479, 1943.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОПЛАВКОВ ДЕКАРТА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ  
ГАЗОВОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ КЛЕТОК ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

## Р е з ю м е

Представлено упрощение метода поплавков Декарта, которое позволяет исследовать газовый метаболизм клеток теплокровных животных.

1. Представлен метод магнетического взбалтывания реагирующих смесей в резервуаре поплавок Декарта в течение измерений. Введен новый тип магнетического поплавок с магнетической микробусинкой.

2. Обнаружено, что потребление кислорода эмульсией дрожжевых клеток, при применении системы взбалтывания, на 150 процентов больше, чем количество кислорода, употребленного тем-же материалом без взбалтывания. Такого рода зависимость обнаружена была при применении для определений эмульсии клеток костного мозга мышей.

3. Представлен метод заполнения поплавков Декарта для проведения измерений в температурах выше окружающей температуры. Применена закупорка отверстия шейки поплавок добавочной пломбой из флотационной жидкости, которая выталкивается при перемене температуры. Объем этой пломбы вычисляется на основании приращения газовой фазы.

THE CARTESIAN DIVER METHOD AS APPLIED TO INVESTIGATIONS OF  
METABOLISM OF GASES BY CELLS OF WARM-BLOODED ANIMALS

S u m m a r y

The paper presents a modification of the Cartesian diver method in order to adapt the method to investigations of metabolism of gases by cells of warm-blooded animals.

1. The paper presents a method of magnetic shaking out of mixtures reacting in the bulb of the Cartesian diver while readings are taken. A new type of a magnetic diver with a magnetic micro-bead was introduced.

2. It was demonstrated that oxygen uptake by yeast cell suspensions increases by about 150 per cent when the shaking out system is applied. Similar results were obtained when a suspension of bone-marrow cells of mice were used.

3. A method is presented of filling Cartesian divers for carrying out measurements in temperatures exceeding the room temperature. The neck of the diver was closed with flotation fluid which is ejected during the change of temperature. The volume of this fluid is calculated from changes of the gaseous phase.

Otrzymano 15.2.1955 r.



L. WOJTCZAK

**NIEKTÓRE ZAGADNIENIA ZWIĄZANE Z AKTYWNOŚCIĄ  
ENZYMÓW ODDECHOWYCH W CZASIE ROZWOJU JEDWABNIKA  
MORWOWEGO, *BOMBYX MORIL***

Z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr W. Niemierko

W poprzednich badaniach [13] stwierdzono dość interesujące zmiany w układach enzymów oddechowych w czasie rozwoju i metamorfozy mola woskowego. Praca niniejsza poświęcona jest prześledzeniu aktywności niektórych enzymów oddechowych u jedwabnika morwowego, który ze względu na bardzo unormowany przebieg rozwoju jest niezmiernie dogodnym obiektem tego rodzaju badań.

Jedwabnik jest jednym z najdokładniej pod względem biochemicznym poznanych owadów. Oddychanie jedwabnika w różnych stadiach rozwojowych było wielokrotnie badane [3], [16] i inni, natomiast dotychczasowe badania nad enzymami oddechowymi jedwabnika są raczej fragmentaryczne i nie obejmują całego cyklu rozwojowego. W związku z tym w pracy niniejszej przebadano pod względem aktywności niektórych enzymów oddechowych cały okres rozwojowy, począwszy od wylęgu z jaja, poprzez stadia gąsienicy i poczwarki, aż do formy imaginalnej. Badania dotyczą aktywności fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej oraz poziomu endogennego zużycia tlenu przez miazgę (zużycia tlenu przez świeżo przygotowaną miazgę bez dodawania substratów enzymatycznych).

Wstępne doniesienie z części przedstawionych tu badań ogłoszono wcześniej [14].

**Material i metody**

Badania przeprowadzono na następujących rasach jedwabnika morwowego *Bombyx mori*: białej adrianopolskiej, żółtej Ascoli i żółtej warskiej dużej. Ze względu na to, że różnice rasowe w aktywności badanych enzymów okazały się nieistotne, dane doświadczalne pochodzące z różnych ras potraktowano łącznie. Hodowlę gąsienic prowadzono w temp. 20°—25° przy wilgotności względnej 60%—75%, rozwój poczwarek odbywał

się w temp.  $23^{\circ}$ — $25^{\circ}$ . Zebrany materiał doświadczalny pochodzi z czterech sezonów hodowlanych. Stadium gąsienicy (od wylęgu z jaja do przepoczwarczenia) trwało około 40 dni; długość zaś okresu poczwarkowego wahała się w różnych latach od 12 do 18 dni. W tym celu, aby móc łącznie rozpatrywać wyniki badań nad okresami poczwarkowymi o różnej długości trwania, wiek poczwarek wyrażano nie w dniach, lecz w procentach całego okresu poczwarkowego. Moment przepoczwarczenia ustalano z dokładnością do kilku godzin obserwując gąsienicę przez niewielkie okienko wycięte w kokonie. Płci gąsienic nie oznaczano; płeć poczwarek określano na podstawie zewnętrznych cech po wyjęciu z kokonu. Zużycie tlenu przez żywe owady (poczwarki i formy imaginalne) mierzono w aparacie Warburga w naczyniach o pojemności około 100 ml w temperaturze  $25^{\circ}$ . Badane poczwarki znajdowały się w kokonach z wyciętymi okienkami. Aktywność enzymów oznaczano również w aparacie Warburga w zwykłych naczyniach o pojemności około 15 ml w temperaturze  $30^{\circ}$ . Sposób przygotowania miazgi (homogenatu) do doświadczeń enzymatycznych, podobny do tego, jaki zastosowano do badań nad molem woskowym [12], był następujący: owady rozcierano w homogenizatorze Pottera Elvehjema [9] z roztworem buforowym fosforanów według Sørensen a o  $\text{pH} = 6,6$  w temperaturze około  $0^{\circ}$  (na 1 g masy owadów brano 9 ml roztworu buforowego). Po 2 ml tak sporządzonej miazgi umieszczano w naczyniach aparatu Warburga i po 5-minutowym okresie wyrównawczym mierzono w ciągu 60 minut endogenne zużycie tlenu. Pomiary przeprowadzano w odstępach 15-minutowych. Dwutlenek węgla pochłaniano przy pomocy 10% KOH. Po upływie 60 minut wlewano do miazgi z bocznego naczynia około 0,5 ml roztworu substratu i mierzono zużycie tlenu przez dalsze 30—45 minut. Jako substratów dla fenoloksydazy używano: fenolu w roztworze wodnym 2% (w doświadczeniach nad stadium gąsienicy) i 1% roztworu wodnego katecholu (w doświadczeniach nad okresami: poczwarkowym i imaginalnym). Jako substrat dla oksydazy bursztynowej służył 0,2 M roztwór bursztynianu sodu o  $\text{pH}$  doprowadzonym do 6,6. Miarą aktywności badanych enzymów był wzrost zużycia tlenu przez miazgę po dodaniu odpowiedniego substratu. Wstępne doświadczenia wykazały, że wzrost zużycia tlenu przez miazgę jest w przybliżeniu taki sam niezależnie od tego, czy substrat dodano na początku doświadczenia, czy dopiero po godzinie pomiaru „oddychania” miazgi bez substratu.

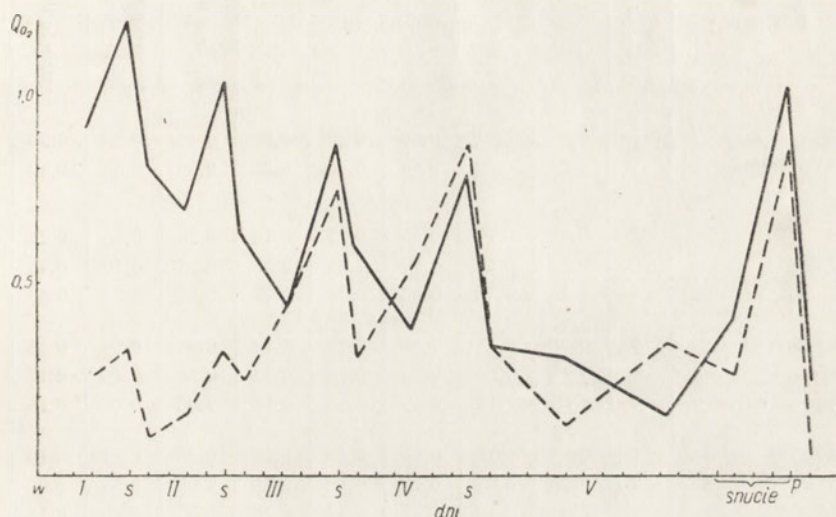
### Część doświadczalna

#### GĄSIENICA

Badania nad stadium larwalnym rozpoczęto w 3 dni po wylęgu gąsienicy z jaja. Tablica 1 przedstawia przebieg endogennego zużycia tlenu



przez miążgę oraz aktywność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej. Chociaż wyniki pomiarów tych samych stadiów rozwojowych wykazują duże indywidualne wahania (dane tablicy 1 stanowią średnie wartości z doświadczeń prowadzonych w ciągu 4 lat) i w związku z tym średnie odchylenie jest dość znaczne, to wydaje się, że fakt okresowego wzrostu endogennego zużycia tlenu przez miążgę i aktywności fenoloksydazy w okresach snu linkowego w porównaniu z okresami żerowania nie ulega wątpliwości. Wzrost endogennego zużycia tlenu przez miążgę w okre-



Rys. 1. Endogenne zużycie tlenu przez miążgi (homogenaty (—)) i aktywność fenoloksydazy (---) w czasie rozwoju gąsienicy jedwabnika. Endogenne zużycie  $O_2$  przez miążgę wyrażone w ml na g świeżej masy na godzinę  $Q_{O_2}$  dla pierwszej 15 minut pomiaru, aktywność fenoloksydazy wyrażona jako wzrost zużycia tlenu po dodaniu fenolu do miążgi. Temperatura  $30^\circ$ . Oznaczenia: w — wylęg gąsienicy, s — okresy snu linkowego, p — przepoczwarczenie, I do V — kolejne okresy larwalne

sach snu linkowego widać najwyraźniej, jeśli porównuje się zużycie tlenu miążgi w ciągu pierwszych 15 minut pomiaru (rys. 1). Bezpośrednio po lince następuje spadek zużycia tlenu przez miążgę i spadek aktywności fenoloksydazy. Wzrost aktywności oddechowej miążgi i czynności fenoloksydazy ma miejsce również pod koniec ostatniego okresu larwalnego, to jest w czasie snucia kokonu i w stadium przedpoczwarkowym.

Czynność oksydazy bursztynowej, mierzona stosowanym przez nas sposobem, okazała się bardzo niska lub równa zero w czasie całego okresu larwalnego (tablica 1).

Tablica 1

Zużycie tlenu przez miążgi (homogenaty) z gąsienic jedwabnika oraz aktywność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej. Wszystkie wartości wyrażone w ml O<sub>2</sub> na gram świeżej masy na godzinę

Okres larwary	Dni po wylęgu lub lince	Ilość doświadczeń	Endogenne zużycie tlenu w kolejnych okresach 15-minutowych					Utleńnianie substratów			
								fenol		bursztynian	
							zużycie tlenu	przyrost zużycia tlenu	zużycie tlenu	przyrost zużycia tlenu	
I	3	3	0,91	0,31	0,60	0,33	0,23	0,49	0,26	0,30	0,07
	5 (sen linkowy)	11	1,21	0,22	0,80	0,40	0,26	0,59	0,33	0,42	0,16
II	0	3	0,81	0,17	0,53	0,27	0,18	0,28	0,10	0,21	0,03
	2-4	10	0,70	0,23	0,40	0,26	0,18	0,34	0,16	0,18	—
	5 (sen linkowy)	4	1,05	0,22	0,62	0,38	0,22	0,54	0,32	0,33	0,11
III	0-1	4	0,64	0,13	0,40	0,27	0,14	0,39	0,25	0,22	0,08
	2-5	8	0,45	0,14	0,29	0,18	0,13	0,58	0,45	0,17	0,04
	6 (sen linkowy)	5	0,88	0,19	0,32	0,14	0,12	0,88	0,76	0,16	0,04
IV	0	4	0,60	0,02	0,30	0,18	0,14	0,45	0,31	0,19	0,05
	3-5	5	0,38	0,07	0,19	0,10	0,09	0,65	0,56	0,09	—
	7 (sen linkowy)	5	0,80	0,16	0,22	0,14	0,14	1,02	0,88	0,18	0,04
V	0-1	5	0,34	0,11	0,17	0,09	0,06	0,42	0,34	0,07	0,01
	4-6	7	0,31	0,09	0,19	0,13	0,09	0,21	0,12	0,07	—
	9-12	3	0,15	0,02	0,08	0,05	0,05	0,40	0,35	0,05	—
	13-15 (snucie)	5	0,41	0,16	0,26	0,18	0,14	0,40	0,26	0,09	—
	16 (forma przed-poczwarkowa)	5	1,03	0,31	0,39	0,18	0,13	1,00	0,87	0,12	—

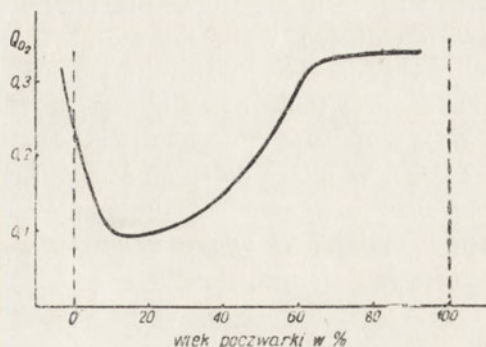
## POCZWARKA

Ponieważ nie stwierdzono wyraźnych różnic płciowych ani w oddychaniu ani w aktywności badanych enzymów w stadium poczwarkowym, dane dotyczące obu płci potraktowano w dalszym opisie łącznie.

Przed przystąpieniem do badań enzymatycznych przebadano zużycie tlenu przez żywe poczwarki w ciągu całego okresu rozwojowego w tym celu, aby aktywność enzymatyczną móc bezpośrednio porównać z natężeniem oddychania żywej poczwarki. Pomiary oddychania i aktywności



enzymów przeprowadzano przeważnie na tych samych osobnikach. Rysunek 2 obrazuje zmiany w natężeniu zużycia tlenu przez poczwarki jedwabnika. Bezpośrednio po przepoczwarczeniu zużycie tlenu szybko maleje, osiągając najniższy poziom w okresie równym około 10% całego stadium poczwarkowego. Następnie ma miejsce stopniowy wzrost natężenia oddychania poczwarki aż do około 65% okresu poczwarkowego. Od tego czasu zużycie tlenu utrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie, aż od wyklucia imago. Otrzymane wyniki zgodne są na ogół z rezultatami badań Białaszewicza [3] nad oddychaniem poczwarki jedwabnika.



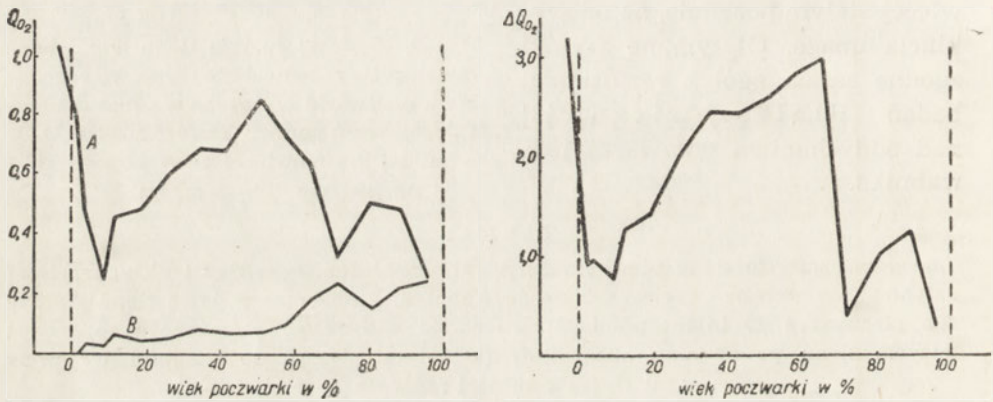
Rys. 2. Przebieg zużycia tlenu w czasie metamorfozy jedwabnika morwowego. Wiek poczwarki wyrażono w procentach całego okresu poczwarkowego zużycie  $O_2$  w ml na gram świeżej masy poczwarki na godzinę. Temperatura  $25^\circ$

Tablica 2

Endogenne zużycie tlenu przez miążgi i aktywność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej w okresie poczwarkowym jedwabnika. Endogenne zużycie tlenu podano dla pierwszych 15 minut pomiaru; utlenianie substratów wyrażono jako wzrost zużycia tlenu po dodaniu substratów do miążgi. Wszystkie wartości wyrażone w ml  $O_2$  na g świeżej masy na godzinę

Wiek poczwarki w %/0	Ilość doświadczeń	Endogenne zużycie tlenu	Utlennianie substratów	
			katechol	bursztynian
forma przed- poczwarkowa	5	1,03	3,15	0,00
2	4	0,77	0,90	0,00
4	4	0,47	0,94	0,03
9	3	0,24	0,77	0,02
12	6	0,45	1,27	0,06
19	7	0,48	1,43	0,04
27	6	0,60	2,04	0,05
35	8	0,68	2,43	0,08
42	7	0,67	2,42	0,07
51	6	0,84	2,61	0,07
58	5	0,71	2,84	0,10
65	5	0,63	2,99	0,19
72	7	0,31	0,39	0,24
81	7	0,50	1,04	0,15
89	5	0,48	1,28	0,22
96	8	0,25	0,31	0,24

Badania enzymatyczne prowadzono podobnie jak u gąsienic. Tablica 2 i rysunek 3a przedstawiają przeciętne wartości dla endogennego zużycia tlenu przez miążgę oraz dla aktywności fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej (na wykresie uwzględniono tylko endogenne zużycie tlenu w ciągu pierwszych 15 minut pomiaru). Bezpośrednio po przepoczwazczeniu zużycie tlenu przez miążgę szybko maleje; najniższe endogenne zużycie  $O_2$  wykazuje miążga z poczwarek w wieku około 10% okresu poczwarkowego. W miarę dalszego rozwoju poczwarki zużycie tlenu przez miążgę wzrasta, osiągając maksimum dla poczwarek w wieku około 50%, po czym znów maleje. W wieku około 80%—90% zaznacza się drugie, znacznie niższe maksimum.



Rys. 3a. Endogenne zużycie tlenu przez miążgi z poczwarek (krzywa A) i aktywność oksydazy bursztynowej w rozwoju poczwarkowym jedwabnika (krzywa B). Endogenne zużycie  $O_2$  wyrażone w ml/g godz. ( $Q_{O_2}$ ) dla pierwszych 15 minut pomiaru, aktywność oksydazy bursztynowej wyrażona jako wzrost zużycia tlenu po dodaniu bursztynianu do miążgi. Temperatura  $30^\circ$

Rys. 3b. Aktywność fenoloksydazy w czasie rozwoju poczwarkowego jedwabnika wyrażona jako wzrost zużycia tlenu ( $\Delta Q$ ) po dodaniu katecholu do miążgi

Aktywność fenoloksydazy w okresie poczwarkowym wykazuje zmiany o tym samym charakterze i kierunku, co zmiany endogennego zużycia tlenu (rys. 3b).

Aktywność oksydazy bursztynowej na początku okresu poczwarkowego jest bardzo niska. W miarę rozwoju poczwarki czynność enzymu stopniowo wzrasta i osiąga najwyższy poziom w ostatnich dniach metamorfozy.



## IMAGO

Mierzono zarówno zużycie tlenu przez żywe dorosłe owady, jak i aktywność enzymatyczną miazgi z form imaginalnych. Owady były badane w większości wypadków wkrótce po wyjściu z kokonu, jeszcze przed kopulacją.

Natężenie oddychania form dorosłych jest wyższe niż poczwarek, przy czym zużycie tlenu przez samce jest około dwa razy wyższe niż przez samice (tablica 3). Endogenne zużycie tlenu przez miazgę z samców jest stosunkowo jeszcze wyższe niż przez miazgę z samic. Podobnie czynność oksydazy bursztynowej jest znacznie wyższa u osobników samczych. Natomiast aktywność fenoloksydazy jest wyższa u samic niż u samców (tablica 3).

Tablica 3

Zużycie tlenu i aktywność enzymów oddechowych w stadium imaginalnym jedwabnika morwowego. Endogenne zużycie tlenu przez miazgę podano dla pierwszych 15 minut pomiaru; utlenianie substratów wyrażono jako wzrost zużycia tlenu pododaniu substratów do miazgi. Wszystkie wartości podane w ml O<sub>2</sub> na g świeżej masy na godzinę. Pomiar zużycia tlenu przez żywe owady przeprowadzono w temp. 25°, pomiary zużycia tlenu przez miazgi i pomiary aktywności enzymów w temp. 30°

Płeć	Ilość dośw.	Zużycie O <sub>2</sub> przez żywe owady	Ilość dośw.	Endogenne zużycie tlenu przez miazgę	Utlenianie substratów				
					bursztynian		katechol <sup>1</sup>		
				M	S	M	S	M	S
samce	3	0,77; 0,88; 0,83	9	1,15 ± 0,56	0,79 ± 0,38			1,41 ± 0,94	
samice	3	0,42; 0,38; 0,47	7	0,39 ± 0,20	0,32 ± 0,18				

M — średnia wartość, S — średnie odchylenie.

<sup>1</sup> Z powodu dużej rozbieżności wyników i braku wyraźnych różnic płciowych wartości dla utleniania katecholu dla obu płci potraktowano łącznie

## Dyskusja

W pracy niniejszej badano w ciągu całego pozazarodkowego rozwoju jedwabnika morwowego aktywność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej oraz poziom tak zwanego endogennego zużycia tlenu przez miazgę, które jako wypadkowa różnych procesów enzymatycznych może również dostarczyć pewnych informacji o czynności enzymów oddechowych.

Charakterystycznym i rzucającym się w oczy zjawiskiem był zaobserwowany wzrost zużycia tlenu przez miazgę oraz wzrost aktywności fenoloksydazy w kolejnych okresach snu linkowego gąsienicy w porównaniu do okresów żerowania. Z badań Białasze-wicza [3] i innych autorów [16] wynika, że w okresie snu linkowego ma miejsce spadek oddychania gąsienicy, zaś w okresie żerowania wzrasta, a więc przeciwnie niż w przypadku zużycia tlenu przez miazgi, jak to wykazały niniejsze badania. Jest jednak rzeczą znamioną, że — jak to widać z doświadczeń Białasze-wicza [3] — wzrost natężenia oddychania gąsienicy po przejściu wylinki następuje dopiero z chwilą rozpoczęcia odżywiania. Jeśli gąsienicę pozbawiono pokarmu, poziom zużycia tlenu po wylince nie tylko nie wzrastał, lecz przeciwnie spadał aż do chwili umożliwienia gąsienicy pobrania pokarmu. Analogicznie, jeśli żerujące gąsienice pozbawiono pokarmu, zużycie tlenu znacznie malało [3]. Wydaje się więc, że wysoki poziom zużycia tlenu przez gąsienicę jedwabnika w okresie międzylinkowym w znacznym stopniu zależy od jej ruchów i funkcji odżywiania. Natomiast, stwierdzona w niniejszej pracy wysoka aktywność enzymów oddechowych w okresach snu linkowego jest, być może, odbiciem innych procesów metabolicznych zachodzących z dużą intensywnością właśnie w tym czasie. Na duże natężenie pewnych procesów przemiany materii wskazują również i inne prace Zakładu [7, 8].

Wzrost aktywności fenoloksydazy w okresach przedlinkowych i w okresie poprzedzającym przepoczwarczenie gąsienicy jest zjawiskiem bardzo interesującym. Wydaje się mianowicie, że stanowi ono jeszcze jedno potwierdzenie przypuszczenia [11, 15], że fenoloksydaza spełnia u owadów jakąś ważną rolę podczas przepoczwarczenia i linienia.

Badania nad okresem poczwarkowym dotyczyły zarówno poziomu zużycia tlenu przez żywe poczwarki jak i aktywności enzymów oddechowych w miazgach z poczwarek. Chodziło bowiem o możliwość porównania aktywności enzymatycznej z natężeniem oddychania żywego owada. Dotychczasowe badania na innych owadach [5, 13] wykazały, że zużycie tlenu przez miazgę z poczwarek jest w pewnym stopniu proporcjonalne do zużycia  $O_2$  przez żywą poczwarkę i że obie wartości ulegają w czasie rozwoju poczwarki podobnym zmianom, dając na wykresie charakterystyczne krzywe o kształcie litery „U”. Z obecnych doświadczeń wynika, że w okresie poczwarkowym jedwabnika sprawa przedstawia się nieco inaczej. Mianowicie zmiany w oddychaniu poczwarki nie przebiegają według typowej krzywej „U”, lecz już w okresie odpowiadającym około 65% całego okresu poczwarkowego zużycie tlenu osiąga najwyższą wartość, na której utrzymuje się aż do wyklucia owada dorosłego. Endogenne zużycie tlenu przez miazgi z poczwarek zmienia się w pierwszej połowie okresu poczwarkowego podobnie jak oddychanie poczwarki (spadek,



a następnie wzrost zużycia tlenu). Natomiast w drugiej połowie stadium poczwarkowego zużycie tlenu przez miazgi ponownie spada, podczas gdy zużycie  $O_2$  przez żywe poczwarki utrzymuje się, jak już pisaliśmy, na stałym wysokim poziomie. W podobny sposób jak endogenne zużycie tlenu przez miazgi zmienia się w okresie poczwarkowym aktywność fenoloksydazy. Widać tu wyraźnie, że endogenne zużycie tlenu przez miazgę jest w pierwszym rzędzie odbiciem aktywności fenoloksydazy.

W trakcie rozwoju poczwarkowego jedwabnika wzrasta aktywność oksydazy bursztynowej. Podobne zjawisko zostało zaobserwowane już wcześniej u *Calliphora erythrocephala* [1] i u *Galleria mellonella* [13]. Chodzi więc tu prawdopodobnie o proces o ogólniejszym znaczeniu dla metamorfozy owadów.

Wzrost aktywności systemu oksydazy bursztynowej w drugiej połowie metamorfozy i spadek czynności fenoloksydazy przy jednoczesnym wzroście natężenia procesów oddechowych poczwarki wskazują, że w okresie tym rolę oksydazy końcowej spełnia prawdopodobnie w znacznym stopniu oksydaza cytochromowa. Natomiast pewna równoległość zmian aktywności fenoloksydazy i poziomu zużycia tlenu przez poczwarkę w pierwszej połowie metamorfozy pozwalają przypuszczać, że w tym okresie funkcję oksydazy końcowej może pełnić, przynajmniej w pewnym zakresie, fenoloksydaza.

U form imaginalnych jedwabnika zwracają uwagę znaczne różnice płciowe zarówno w oddychaniu owadów jak i w aktywności enzymów oddechowych. Wyższe zużycie tlenu przez samce można przypisać, przynajmniej częściowo, zaobserwowanej większej ruchliwości samców niż samic. Pomiarы przeprowadzone na miazgach wykazały jednak, że i aktywność oksydazy bursztynowej jest znacznie wyższa u samców niż u samic. Jest to, jak się wydaje, zjawisko ogólniejsze, gdyż i u innych owadów obserwowano wyższy poziom oddechowej przemiany tkankowej [2] i aktywności oksydazy bursztynowej [4, 6, 10] u samców niż u samic.

### Streszczenie

Badano aktywność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej w czasie rozwoju pozazarodkowego jedwabnika morwowego, *Bombyx mori*, począwszy od trzeciego dnia po wylęgu gąsienicy z jaja aż do stadium imaginalnego. Przeprowadzono również pomiary endogennego zużycia tlenu przez miazgi (homogenaty) w ciągu całego okresu rozwojowego jedwabnika oraz pomiary zużycia tlenu przez poczwarki i owady dorosłe.

Stwierdzono wzrost aktywności fenoloksydazy w kolejnych okresach snu linkowego gąsienicy oraz bezpośrednio przed przepoczwarczeniem

w porównaniu z okresami międzylinkowymi. Również endogenne zużycie tlenu przez miążgę jest znacznie wyższe w przypadku gąsienic w stanie snu linkowego i w okresie przedpoczwarkowym niż w okresach międzylinkowych. Wzrost aktywności fenoloksydazy i zużycia tlenu przez miążgę w okresie snu linkowego oraz spadek obydwu wartości po przejściu wylinki powtarzały się regularnie we wszystkich pięciu okresach wzrostu gąsienicy jedwabnika.

Aktywność systemu oksydazy bursztynowej jest bardzo niska w czasie całego okresu larwalnego.

Zużycie tlenu przez poczwarkę spada szybko po przepoczwarczeniu i osiąga najniższą wartość w czasie odpowiadającym około 10% całego okresu poczwarkowego. Następnie zużycie tlenu rośnie i osiąga poziom najwyższy przy około 65% okresu poczwarkowego, na którym to poziomie utrzymuje się aż do wyklucia imago.

Aktywność fenoloksydazy znacznie maleje po przepoczwarczeniu; najniższa aktywność przypada również na okres około 10% całego okresu poczwarkowego. Następnie aktywność fenoloksydazy wzrasta osiągając maksimum przy około 65% wieku poczwarki, po czym ponownie maleje. Podobnym zmianom (spadek, wzrost i ponowny spadek) podlega endogenne zużycie tlenu przez miążgę z poczwarek.

Aktywność oksydazy bursztynowej jest bardzo niska lub równa zeru bezpośrednio po przepoczwarczeniu i rośnie stopniowo w czasie rozwoju poczwarki. Najwyższą czynność osiąga oksydaza bursztynowa w ostatnich dniach okresu poczwarkowego.

U form imaginalnych zaobserwowano znaczne różnice płciowe odnośnie zużycia tlenu i aktywności enzymatycznej. Zużycie tlenu przez osobniki samcze jest dwa razy wyższe niż przez samice (w obliczeniu na wagę ciała). Również zużycie tlenu przez miążgę i aktywność oksydazy bursztynowej jest znacznie wyższa odnośnie samców niż samic.

#### LITERATURA

- [1] Agrell I., *Acta Physiol. Scand.* **18**, 355, 1949, *Nature* **164**, 1039, 1949.
- [2] Barron E. S. G. i Tahmisian T. N., *J. Cell. Comp. Physiol.* **32**, 57, 1948.
- [3] Białaszewicz K., *Acta Biol. Exper.* **11**, 229, 1937.
- [4] Harvey G. T. i Beck S. D., *J. Biol. Chem.* **201**, 765, 1953.
- [5] Heller J., *Acta Biol. Exper.* **14**, 229, 1947.
- [6] Mc Shan W. H., Kramer S. i Schlegel V., *Biol. Bul.* **106**, 341, 1954.
- [7] Niemierko S., Włodawer P. i Wojtczak A., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 588, 1954; *Acta Biol. Exper.* **17**, 1956 (w druku).
- [8] Niemierko W., Kąkol I. i Załuska H., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 584, 1954.
- [9] Potter V. R. i Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **114**, 495, 1936.
- [10] Sacktor B. i Thomas C. M., *J. Cell. Comp. Physiol.* **45**, 241, 1955.
- [11] Sussman A. S., *Quart. Rev. Biol.* **24**, 328, 1949.



- [12] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* 16, 199, 1952.  
[13] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* 16, 223, 1952.  
[14] Wojtczak L., *Acta Physiol. Polon.* 5, 111, 1954.  
[15] Wojtczak L., *Acta Physiol. Polon.* 5, 593, 1954.  
[16] Yamafuji K., *Tabulae Biologicae* 14, 36, 1937.

ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ВО ВРЕМЯ РОСТА И МЕТАМОРФОЗА  
ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI L.*

Р е з ю м е

Исследовалось поглощение кислорода кашицей из тутового шелкопряда, а также активность фенолоксидазы и сукциноксидазы во время всего периода роста и метаморфоза. Обнаружено, что поглощение кислорода кашицей и активность фенолоксидазы увеличивается во время линки гусеницы, а также перед окукливанием. Активность сукциноксидазы у гусениц незначительна.

Поглощение кислорода куколкой понижается быстро после окукливания, а затем увеличивается. В начальном периоде метаморфоза поглощение кислорода кашицей и активность фенолоксидазы тоже понижаются, а затем растут, но во второй половине метаморфоза снова наблюдается понижение поглощения кислорода кашицей и активность фенолоксидазы. Активность сукциноксидазы увеличивается в течение метаморфоза.

Поглощение кислорода бабочкой самцом вдвое больше, чем бабочкой самкой. Поглощение  $O_2$  кашицей, а также активность сукциноксидазы у самцов значительно выше, чем у самок.

ACTIVITY OF SOME RESPIRATORY ENZYMES DURING THE DEVELOPMENT  
OF SILKWORM, *BOMBYX MORI L.*

Summary\*)

The oxygen uptake of homogenates and the activity of phenoloxidase and of succinoxidase were measured during the entire development period of the silkworm, *Bombyx mori*, as well as the oxygen consumption of living pupae and adults. During all four periods of larval moults and before pupation a considerable increase, as compared with the periods between moultings, in oxygen consumption of homogenates and in the activity of phenoloxidase was observed. The succinoxidase activity was weak throughout the whole larval stage.

During the first days after pupation, mean oxygen uptake of living pupae decreases and later on it rises, remaining on a constant high level

\*) The full text appears in English in *Acta Biol. Exper.* 16 1956 (in press).

during the last days of metamorphosis. Similarly, both the endogenous oxygen consumption of homogenates of pupae and the activity of phenoloxidase decrease after pupation and rise later on; they show, however, a new decrease in the second half of the pupal stage. The succinoxidase activity increases gradually in the course of metamorphosis.

The oxygen consumption of male adults is twice as high as that of females. Considerably higher in adult males than in females are also the endogenous oxygen uptake of homogenates and the activity of succinoxidase.

Otrzymano 15.12.1955 r.



I. REIFER, A. RUMIŃSKA, J. KĄCZKOWSKI

## WPLYW ŻELAZICYJANKU POTASU NA *DATURA STRAMONIUM L.* PLON LIŚCI, ZAWARTOŚĆ ALKALOIDÓW I NIEKTÓRYCH INNYCH SKŁADNIKÓW

Z Zakładu Biochemii SGGW

Kierownik: prof. dr I. Reifer

i z Zakładu Szczegółowej Uprawy Roślin SGGW

Kierownik: prof. dr A. Listowski

W 1954 r. wykonano wstępne doświadczenia nad wpływem żelazicyjanku potasu na plon i zawartość alkaloidów w *Datura stramonium L.* [1]. Ponieważ w doświadczeniach tych uzyskano 25%-owy przyrost plonu liści u roślin traktowanych, oraz wzrost zawartości alkaloidów w liściach i nasionach, w roku bieżącym przeprowadzono dalsze, rozszerzone doświadczenia na ten temat.

### Doświadczenia polowe I

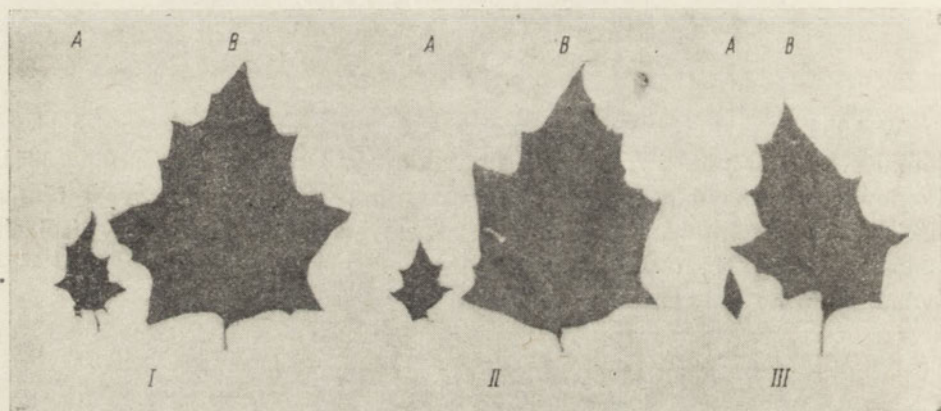
Doświadczenia przeprowadzono na poletkach doświadczalnych SGGW na glebie typu bielicy pyłowej, na powierzchni 250 m<sup>2</sup> w czterech kombinacjach, a mianowicie, przed wysiewem nasiona moczone w roztworze żelazicyjanku o trzech różnych stężeniach: 0,05%, 0,1% i 0,2%, oraz nasiona kontrolne moczone w wodzie. Wszystkie nasiona moczone w ciągu 5 dni, po czym w dniu 3.V.55 r. wysiano w trzech powtórzeniach na poletka w odstępach 50 × 50 cm. W trakcie moczenia stwierdzono, że nasiona traktowane kiełkowały szybciej niż nasiona kontrolne, poza tym zaś zaobserwowano wschody roślin traktowanych stężeniem 0,2% już dnia 20.V., a wschody roślin kontrolnych dopiero 28 maja. W tych doświadczeniach nie stosowano podlewania roślin roztworem żelazicyjanku. W okresie wzrostu stwierdzono znacznie szybszy rozwój i wzrost roślin traktowanych i to proporcjonalnie do stężenia roztworu żelazicyjanku. W późniejszym okresie różnice te zanikały, a pod koniec okresu wegetacyjnego uwydatniło się szybsze dojrzewanie i wędnięcie roślin traktowanych, podczas gdy rośliny kontrolne były jeszcze zielone. Należy jesz-

cze zaznaczyć, że początkowy okres wegetacji przebiegał w tej porze roku przy wyjątkowo niskiej temperaturze.

W ciągu okresu wegetacyjnego dokonano trzech zbiorów:

- I — dnia 23.VII. w okresie kwitnienia (pierwszy owoc wykształcony),
- II — dnia 12.VIII. w okresie wykształcenia się owoców (koniec kwitnienia),
- III — dnia 2.IX. w okresie pełnego dojrzewania owoców (koniec wegetacji).

Na materiale uzyskanym z poszczególnych zbiorów dokonano pomiarów długości części nadziemnej i podziemnej roślin oraz masy poszczególnych części roślin i ilości sztuk ważniejszych organów. Ponadto w użytym materiale oznaczono zawartości alkaloidów metodą Reifera-Buchowicza [2], oddzielnie w poszczególnych częściach roślin.



Fot. 1. Wygląd liści typowych z trzech zbiorów — dojrzałych (B) i młodych (A) z roślin traktowanych roztworem 0,2% żelazicyjanku potasu

Ponadto liście ze względu na zróżnicowaną zawartość alkaloidów i związane z tym wykorzystanie przy ekstrakcji atropiny, podzielono na trzy kategorie w zależności od wieku. Za liście młode przyjęto liście, osadzone na szczytach pędów o jaśniejszej barwie i nie wykształconej blaszce (około  $\frac{1}{3}$  powierzchni liści dojrzałych) — za liście dojrzałe przyjęto liście osadzone powyżej pierwszego rozgałęzienia o normalnie wykształconej blaszce, za liście stare — liście znajdujące się poniżej pierwszego rozgałęzienia — żółknące.

Do oznaczeń biometrycznych brano wszystkie liście, do oznaczeń alkaloidów natomiast pobierano 5 gramów liści typowych, przy czym próbki te natychmiast po zerwaniu utrwalano we wrzącym etanolu.

Wygląd liści typowych, dojrzałych i młodych z roślin traktowanych 0,2%-owym roztworem żelazicyjanku podano na fotografii 1;



T a b l i c a 1

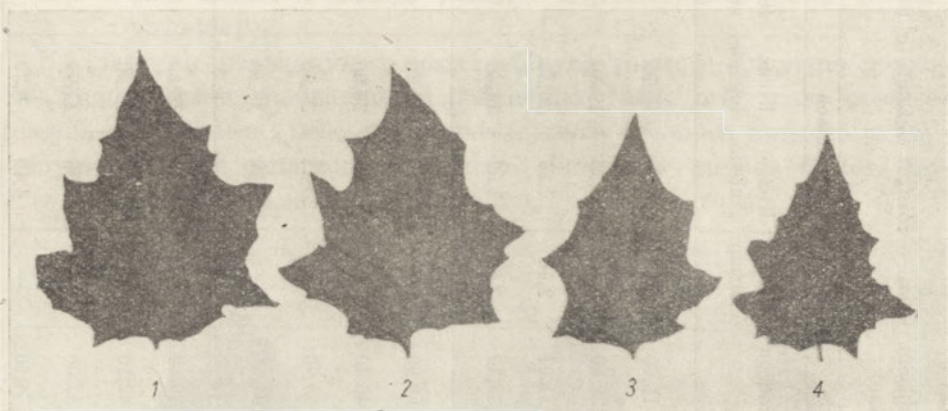
Dane biometryczne dotyczące roślin traktowanych żelazicyjankiem potasu o różnym stężeniu (w przeliczeniu na jedną roślinę)

Zbiór	Stężenie $K_3Fe(CN)_6$ w %/%	Ilość powtórzeń	Ilość roślin w powtórzeniach	Długość w cm		Ciężar w gramach							Ilość owoców	
				część nadziemna	część podziemna	korzeń	łodyga	pączki i kwiaty	liście młode	liście dojrzałe	liście stare	owoce		
I 23.VII.1955	0	III	15	23,27	16,63	5,30	15,90	0,62	3,96	14,10	—	—	2,35	1,63
	0,05	III	24	28,60	19,07	8,60	32,60	0,35	5,35	19,80	—	—	2,70	1,90
	0,1	III	24	38,30	19,03	10,37	51,03	2,10	7,50	30,30	—	—	7,93	3,00
	0,2	III	24	52,60	21,91	13,70	58,30	2,69	9,62	33,40	0,37	—	16,20	4,07
II 12.VIII.1955	0	II	10	57,30	23,50	17,40	69,90	0,80	23,90	43,30	4,60	—	60,30	8,00
	0,05	III	15	53,90	24,70	15,60	46,40	—	17,60	28,90	4,30	—	58,10	7,00
	0,1	III	16	57,30	26,20	19,73	59,90	—	20,23	29,00	4,41	—	69,29	8,70
	0,2	III	15	60,70	26,40	14,80	67,90	—	12,59	30,10	5,20	—	71,50	7,30
III 2.IX.1955	0	II	10	56,80	16,10	14,00	70,10	—	8,20	15,60	—	—	83,20	6,30
	0,05	III	15	49,30	21,80	9,70	42,70	—	3,90	12,40	—	—	48,10	4,26
	0,1	III	15	57,90	20,00	11,80	52,00	—	5,30	12,90	—	—	56,70	4,70
	0,2	III	25	60,40	21,50	12,90	54,50	—	4,49	9,30	—	—	58,30	5,10

## Wyniki

Wyniki pomiarów biometrycznych roślin z doświadczeń polowych (I) zestawiono w tablicy 1.

Jak widać z tablicy wpływ żelazicyjanku na wzrost i rozwój roślin uwidacznia się najsilniej w pierwszym okresie rozwoju, który został



Fot. 2. Wygląd liści roślin I-go zbioru w zależności od rodzaju traktowania. 1 — traktowanie 0,2% roztworem żelazicyjanku, 2 — traktowanie 0,1%, 3 — traktowanie 0,05%, 4 — liść rośliny kontrolnej

uchwycony w I-ym zbiorze. Przejawia się to zarówno w szybszym wzroście roślin traktowanych, jak i w większej masie poszczególnych ich organów, zwłaszcza liści, kwiatów, pączków i owoców, przy czym efekt jest wprost proporcjonalny do stężenia żelazicyjanku.

Wygląd liści z pierwszego zbioru roślin w różny sposób traktowanych przedstawia fotografia 2.

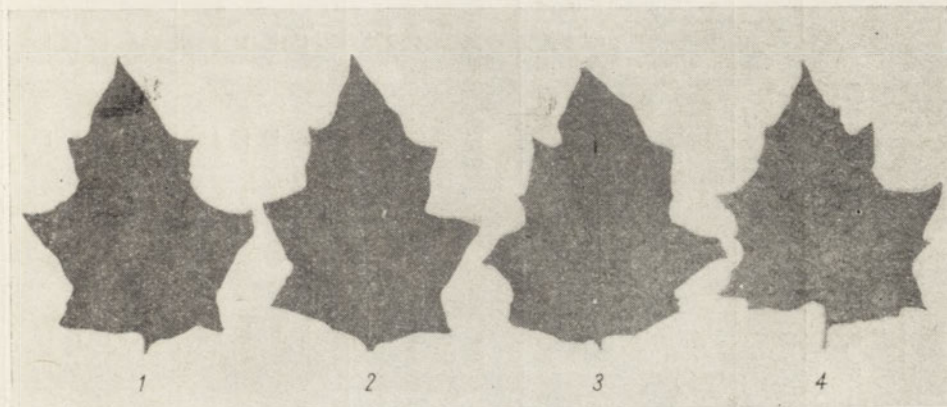
W II-gim i III-cim zbiorze ogólny efekt działania żelazicyjanku na wielkość części nadziemnych i podziemnych zmniejsza się, natomiast masy poszczególnych organów wykazują spadek u roślin traktowanych w porównaniu z kontrolnymi.

Fotografia 3 przedstawia liście dojrzałe II-ego zbioru wykazując brak istotnych różnic między roślinami traktowanymi i kontrolnymi.

Wydaje się, że nasiona poddane stymulującemu działaniu żelazicyjanku przekazują bodziec młodej roślinie, co wywołuje przyspieszenie wzrostu i rozwoju, w rezultacie czego, porównując w I-ym zbiorze rośliny, w tym samym czasie mamy do czynienia właściwie z różnym stopniem rozwoju osobniczego poszczególnych roślin.



Okres zbioru II-ego wydaje się być okresem przejściowym, w którym rośliny traktowane i kontrolne nie wykazują istotnych różnic i wszystkie znajdują się w fazie kwitnienia, co przejawia się w stosunkowo małym zróżnicowaniu danych liczbowych.



Fot. 3. Wygląd liści dojrzałych II-go zbioru roślin o różnym sposobie traktowania. 1 — traktowanie 0,2<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 2 — traktowanie 0,1<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 3 — traktowanie 0,05<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 4 — liść rośliny kontrolnej

Różnice te występują ponownie w III-cim zbiorze, gdyż w okresie tym rośliny traktowane zakończyły już swój okres wegetacyjny i zaczynają obumierać, gdy rośliny kontrolne dopiero dojrzewają. Powoduje to wystąpienie różnic w plonie poszczególnych organów — w niektórych wypadkach dość wyraźnych — na niekorzyść roślin traktowanych.

W tabelicy 2 podano wyniki oznaczeń alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny. Wyniki zestawione w tej tabelicy wykazują, że moczenie nasion w żelazicyjanku działa szczególnie silnie na przyrost alkaloidów w pierwszym okresie wegetacji (I-y zbiór). Wpływ ten zaznacza się szczególnie wyraźnie w liściach, natomiast działanie to na łodygi jest mniej równomierne, a w przypadku kwiatów i pączków nie stwierdza się istotnych różnic.

Najsilniej przejawia się wpływ żelazicyjanku na liście dojrzałe, gdzie jest on wprost proporcjonalny do jego stężenia; najkorzystniejsze więc dla tych liści jest stężenie 0,2<sup>o</sup>/<sub>o</sub>. W przypadku liści młodych przyrosty alkaloidów są znacznie mniejsze, a stężeniem optymalnym okazał się rozwór 0,1<sup>o</sup>/<sub>o</sub>-owy. W miarę starzenia się rośliny, przyrosty alkaloidów

T a b l i c a 2  
Zawartość alkaloidów u roślin traktowanych żelazcyjankiem potasu o różnym stężeniu

Zbiór	Stężenie $K_3Fe(CN_6)$ w %	Liście dojrzałe		Liście młode		Liście stare		Pączki		Kwiaty		Górna część łodygi	
		procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %	procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %	procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %	procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %	procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %	procent alkaloidów	przyrost alkaloidów w %
I 23.VII.1955	0	0,037	100	0,115	100	—	—	0,072	100	0,050	100	0,032	100
	0,05	0,067	181	0,151	131	—	—	0,076	105	0,067	134	0,044	137
	0,1	0,086	232	0,206	179	—	—	0,080	111	0,032	64	0,028	88
	0,2	0,092	248	0,186	161	—	—	0,075	104	0,056	110	0,056	175
II 12.VIII.1955	0	0,090	100	0,131	100	0,046	100	—	—	—	—	0,050	100
	0,05	0,105	117	0,235	179	0,077	167	—	—	—	—	0,031	62
	0,1	0,175	194	0,242	184	0,091	199	—	—	—	—	0,046	82
	0,2	0,191	212	0,151	115	0,096	208	—	—	—	—	0,052	105
III 2.XI.1955	0	0,147	100	0,188	100	—	—	—	—	—	—	0,025	100
	0,05	0,168	114	0,204	109	—	—	—	—	—	—	0,022	88
	0,1	0,224	152	0,209	111	—	—	—	—	—	—	0,017	64
	0,2	0,244	166	0,149	79	—	—	—	—	—	—	0,012	48

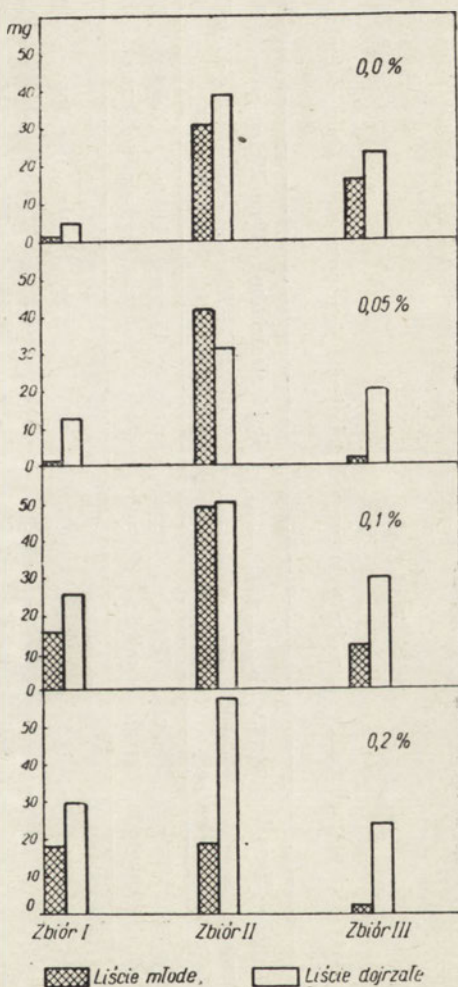


w obu rodzajach liści maleją, a w przypadku liści młodych przy kombinacji 0,2% w III-cim zbiorze zaobserwowano spadek zawartości alkaloidów w stosunku do kontrolnych. W przypadku łodyg najmniej korzystnym okazało się stężenie 0,1%, gdzie we wszystkich zbiorach obserwowano spadek zawartości alkaloidów w stosunku do kontroli. Przy pozostałych stężeniach uzyskano przyrosty alkaloidów w I-ym i II-gim zbiorze. W III-cim zbiorze uzyskano spadek alkaloidów w stosunku do kontroli, proporcjonalny do stężenia żelazicyjanku. W kwiatach i pączkach uzyskiwano niewielkie przyrosty alkaloidów, aczkolwiek nie we wszystkich przypadkach.

W tabelicy 3 zestawiono dane odnośnie plonu i zawartości alkaloidów oraz ilości alkaloidów w przeliczeniu na jedną roślinę (ilożycyn masy liści przez %-ową zawartość alkaloidów) w liściach roślin kontrolnych i traktowanych. Podano również stosunkowe przyrosty w odniesieniu do kontroli plonu liści i zawartości alkaloidów w przeliczeniu na jedną roślinę.

Dane tabelicy 3 wykazują wyraźny wpływ traktowania nasion na ogólną ilość alkaloidów, uzyskiwaną z jednej rośliny. Wzrost plonu liści z równoczesnym wzrostem zawartości w nich alkaloidów w porównaniu z kontrolą, powoduje duży przyrost ilości alkaloidów uzyskanych z jednej rośliny — w I-ym zbiorze prawie sześciokrotny dla liści dojrzałych, a prawie czterokrotny dla liści młodych.

W II-gim zbiorze obserwowano przyrost w wyższych stężeniach dla liści dojrzałych, a w niższych stężeniach żelazicyjanku dla liści młodych, na-



Wykres 1. Plon alkaloidów z liści młodych i dojrzałych (średnio na jedną roślinę) u roślin traktowanych żelazicyjankiem o różnym stężeniu w mg

T a b l i c a 3

Plon masy liści oraz alkaloidów u roślin traktowanych żelazcyjankiem potasu o różnym stężeniu

Zbiór	Stężenie $K_3Fe(CN)_6$ w %/%	Masa liści w gramach średnio na jedną roślinę		Procentowa zawartość alkaloidów		Ilość alkaloidów na jedną roślinę w miligramach		Masa liści w stosunku do kombinacji 0		Ilość alkaloidów w stosunku do kombinacji 0	
		Liście młode	Liście dojrzałe	Liście młode	Liście dojrzałe	Liście młode	Liście dojrzałe	Liście młode	Liście dojrzałe	Liście młode	Liście dojrzałe
I 23.VII.1955	0	4,0	14,1	0,115	0,037	4,6	5,22	100	100	100	100
	0,05	5,4	19,8	0,151	0,067	8,15	13,27	146	140	172	254
	0,1	7,5	30,3	0,206	0,086	15,45	26,05	203	214	336	499
	0,2	9,6	33,4	0,186	0,092	17,85	33,73	259	237	388	588
II 12.VIII.1955	0	23,9	43,3	0,131	0,090	31,31	38,97	100	100	100	100
	0,05	17,6	28,9	0,235	0,105	41,36	30,35	75	64	132	78
	0,1	20,2	29,0	0,242	0,175	48,88	50,75	84	67	156	130
	0,2	12,6	30,1	0,151	0,191	19,03	57,49	53	79	61	147
III 2.IX.1955	0	8,2	15,6	0,188	0,147	15,42	22,93	100	100	100	100
	0,05	3,9	12,4	0,204	0,168	7,96	20,83	48	80	52	90,8
	0,1	5,3	12,9	0,209	0,224	11,08	28,90	64	83	74	126
	0,2	4,5	9,3	0,149	0,244	6,70	22,69	53	58	44	98,9



tomiast III-ci zbiór wykazał najwyższy „plon” alkaloidów z jednej rośliny u roślin kontrolnych.

Charakterystyczne jest, że największą, absolutną ilość alkaloidów w przeliczeniu na jedną roślinę uzyskano w II-gim zbiorze, zarówno dla liści młodych, jak i dojrzałych, przy czym w I-ym przypadku przy stężeniu 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (48,9 mg), a w drugim przypadku przy stężeniu 0,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (57,5 mg). Dane te sugerują, że w przypadku roślin traktowanych znacznie korzystniejsze jest dokonywanie zbiorów nie przy końcu wegetacji, lecz w okresie bliskim końca kwitnienia. Uzyskiwany „plon” alkaloidów z jednej rośliny w poszczególnych zbiorach w zależności od kombinacji wykazuje powyższy wykres:

### Doświadczenia wazonowe i poletkowe II

Równolegle do wyżej opisanych badań jeden z autorów (J. Ką c z k o w s k i) prowadził doświadczenia wazonowe i poletkowe nad wpływem żelazicyjanku na zawartość alkaloidów i niektórych innych składników w *Datura stramonium L.* W doświadczeniach wazonowych, wykonanych w trzech seriach, wysianych w dniach 19 marca, 15 kwietnia i 2 maja, nasiona przed wysiewem moczoło w 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owym roztworze żelazicyjanku w ciągu 5 dni, natomiast nasiona kontrolne moczoło równolegle w wodzie, po czym wysiewano do wazonów z glebą próchniczną, inspektową. Po 10 dniach od wzejścia wazony roślin traktowanych podlewano 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owym żelazicyjankiem w ilościach 200 ml roztworu na wazon. Do analiz pobierano nadziemną część rośliny odciętą 0,5 cm nad powierzchnią gleby.

Podobnie w doświadczeniach poletkowych nasiona moczoło przed wysiewem w wyżej podany sposób i wysiewano rzędowo co 30 cm, a w rzędach co 10 cm. Na poletka wielkości 1,2 × 2,5 m dokonano wysiewu 15.V.1955 r. w czterech powtórzeniach i 5.VI.1955 r. również w czterech powtórzeniach. Następnie rośliny traktowane podlano 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owym roztworem żelazicyjanku w ilości 3 litrów roztworu na poletko. Poletka I-szej serii podlano 11.VI, a poletka II-giej serii 25.VI. Poletka kontrolne podlano równolegle analogiczną ilością wody.

Do analiz pobierano próbki połowe liści zielonych, zdrowych, dobrze wykształconych w ilości ok. 25 g, z których pobierano próby do analiz. Z poletek I-szej serii pobrano próby pięciokrotnie w dniach: 18.VI., 27.VI., 12.VII., 23.VII. i 2.VIII., z poletek II-giej serii w dniach: 12.VII., 23.VII. i 2.VIII.

Zarówno w próbach z doświadczeń wazonowych, jak i poletkowych oznaczano zawartość alkaloidów metodą Reifera i Buchowicza [2], azotu ogólnego i rozpuszczalnego metodą podbrominową Reifera i Tarnow-

skiej [3], cukrów redukujących metodą Fujita Akiji i Danzo Iwatake [4] w modyfikacji D. Wolszlegier [5], oraz kwasu cytrynowego [6] i jabłkowego [7] metodami Reifera. Ponadto w próbach z pola oznaczano suchą masę liści.

## Wyniki

Średnie wyniki z doświadczeń wazonowych i poletkowych (II) zestawiono w niżej podanych tablicach:

Tablica 4

Zawartość suchej masy w liściach w procentach w doświadczeniach polowych (II)

	I seria 25.VI.1955 r.					II seria 19.VIII.1955 r.				
	1	2	3	4	Średnio	5	6	7	8	Średnio
O	17,42	16,91	17,10	17,13	17,14	18,44	18,18	17,50	17,44	17,89
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	18,31	18,00	17,50	17,20	17,75	19,13	18,88	18,05	17,95	18,51

Powyższe wyniki wykazują wprawdzie niewielkie przyrosty zawartości suchej masy w roślinach traktowanych, jednakże wzrost ten obserwowano we wszystkich przypadkach, co pozwalałoby wnioskować, że traktowanie roślin żelazicyjankiem wpływa na zwiększenie zawartości suchej masy w liściach.

Tablica 5

Zawartość azotu ogólnego w procentach w doświadczeniu wazonowym

I seria				II seria				III seria			
Data	O	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Przyrost w %	Data	O	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Przyrost w %	Data	O	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Przyrost w %
20.IV	0,259	0,294	+13,8	3.V.	0,239	0,264	+10,0	21.V.	0,475	0,497	+4,6
23.IV	0,197	0,252	+28,9	9.V.	0,264	0,272	+11,4	25.V.	0,474	0,436	-8,7
28.IV	0,264	0,292	+10,7	13.V.	0,230	0,271	+17,8	1.VI	0,534	0,600	+12,8
30.IV	0,178	0,128	-37,0	18.V.	0,231	0,296	+28,7	6.VI.	0,446	0,534	+19,3



T a b l i c a 6

Zawartość niektórych składników w liściach w doświadczeniu polowym (II)

Seria	Data	Azot w procentach			Alkaloidy w %/o			Kwas jabłkowy w %		Kwas cytrynowy w %	
		kontr.	trakt.	przyrost w %/o	kontr.	trakt.	przyrost w %/o	kontr.	trakt.	kontr.	trakt.
I	18.IV	0,394	0,439	+11,4	0,061	0,064	+ 4,9	0,038	0,041	0,058	0,074
	27.VI	0,538	0,695	+29,1	0,040	0,051	+27,5	0,020	0,027	0,061	0,060
	12.VII	0,677	0,763	+12,7	0,055	0,053	- 3,7	0,073	0,084	0,039	0,054
	23.VII	0,957	1,027	+ 7,3	0,077	0,102	+32,4	0,099	0,087	0,045	0,052
	2.VIII	0,801	0,801	± 0	0,155	0,142	- 8,4	0,113	0,092	0,037	0,040
II	12.VII	0,607	0,700	+15,3	0,045	0,084	+86,6	0,082	0,072	0,042	0,043
	23.VII	0,817	0,911	+11,5	0,084	0,102	+21,4	0,097	0,089	0,040	0,054
	2.VIII.	0,685	0,856	+25,0	0,150	0,136	- 9,4	0,087	1,102	0,038	0,040

W tabelicy 5 zestawiono wyniki zawartości azotu ogólnego w roślinach trzech serii doświadczeń wazonowych:

Dane powyższej tabelicy wskazują w 10 przypadkach wzrost zawartości azotu ogólnego w granicach od 5 do 29<sup>0</sup>%, a w dwu przypadkach spadek jego zawartości. W większości przypadków przyrost azotu ogólnego u roślin traktowanych wahał się około 10<sup>0</sup>%.

W tabelicy 6 podano wyniki oznaczeń azotu ogólnego, alkaloidów oraz kwasu jabłkowego i cytrynowego, wykonanych na materiale z doświadczeń polowych (II). Jak wykazuje tablica 6, uzyskano w doświadczeniach poletkowych wyraźny wpływ traktowania nasion na zawartość azotu ogólnego w liściach, co zgadza się z opisanym wyżej doświadczeniem wazonowym. Uzyskane wyniki odnośnie zawartości alkaloidów wskazują również na wpływ żelazicyjanku na przyrost zawartości tego składnika. Wyniki późnych zbiorów wykazują obniżkę zawartości alkaloidów w roślinach traktowanych, co zgadza się z III-cim zbiorem tabelicy 2, w którym stężenie 0,2<sup>0</sup>% żelazicyjanku wywołuje podobny efekt. Wprawdzie stosowane tu stężenie bodźca wynosiło tylko 0,1<sup>0</sup>% jednak rośliny w czasie rozwoju zostały dodatkowo podlane żelazicyjankiem. Związku między zawartością kwasu jabłkowego i alkaloidów nie wykryto, natomiast przyrost zawartości kwasu cytrynowego w liściach rośliny traktowanych wskazywałby na intensywniejszą przemianę materii tych roślin.

Oznaczenia zawartości azotu rozpuszczalnego i cukrów redukujących oraz oznaczenia na młodych kiełkach (doświadczenie wazonowe) kwasu jabłkowego i cytrynowego nie dały istotnych i regularnych różnic, wobec czego nie są w niniejszej pracy zamieszczone.

### Dyskusja

W tegorocznych doświadczeniach uzyskano wyraźny wpływ moczenia nasion w żelazicyjanku potasu na wzrost osobniczy i rozwój rośliny, oraz na nagromadzenie się poszczególnych składników. Stwierdzono wybitnie stymulujące działanie żelazicyjanku w pierwszym okresie rozwoju roślin, co uwydatniło się szybszym kiełkowaniem i wschodami roślin traktowanych, jak również znacznymi różnicami wysokości roślin i wielkości plonu poszczególnych organów na korzyść roślin traktowanych w okresie I-go zbioru. Wpływ ten odbił się również w wyraźny sposób na gromadzeniu się alkaloidów, azotu ogólnego i kwasu cytrynowego oraz na wyższej zawartości suchej masy u roślin traktowanych, co świadczyłoby o znacznie wzmożonym metabolizmie roślin traktowanych żelazicyjankiem. W późniejszym okresie rozwoju różnice te wyrównują się i to zarówno w masie liści, jak i nagromadzeniu powyższych składników, co uwydat-



nia się bardzo małymi różnicami w plonie poszczególnych organów roślin, stwierdzonymi w II-gim zbiorze. Na skutek przyspieszenia rozwoju roślin traktowanych następuje też ich szybsze dojrzewanie i starzenie się, czego dowodzi spadek w ostatnim zbiorze plonu liści, jak i „plonu” alkaloidów z jednej rośliny. Również w późniejszych okresach opadają różnice na korzyść roślin traktowanych w zawartościach alkaloidów, azotu ogólnego i kwasu cytrynowego.

W ubiegłym roku okres wegetacyjny roślin traktowanych w stosunku do kontrolnych był przedłużony [1], w tym roku natomiast był skrócony. Należy jednak zaznaczyć, że warunki klimatyczne w obu okresach wegetacyjnych były krańcowo różne — gdy w roku 1954 wiosna i wczesne lato były ciepłe i raczej suche, w roku 1955 okres ten cechowała niska temperatura i stosunkowo duża wilgotność. Jednakże niezależnie od tego w obu doświadczeniach uzyskano przyrost alkaloidów w roślinach traktowanych.

Stwierdzono również, że wpływ żelazicyjanku jest w pewnym stopniu zależny od stężenia jego roztworu, który był użyty do moczenia nasion, przy czym wpływ ten jest różny dla różnych organów roślin. Mianowicie wpływ stężenia żelazicyjanku nie uwidacznia się w przypadku zawartości alkaloidów w kwiatach i pączkach, natomiast stężenie żelazicyjanku wpływa wyraźnie na zawartość alkaloidów w liściach i łodygach. Z tablicy 2 widać, że na zawartość alkaloidów w liściach młodych najbardziej wpływa stężenie 0,1%, a w liściach dojrzałych — stężenie 0,2%. Natomiast wpływ stężenia żelazicyjanku na zawartość alkaloidów w łodygach oraz na masę liści zaznaczył się wyraźnie jedynie w I-szym zbiorze.

„Plon” alkaloidów na jedną roślinę w zbiorze II-gim tak w roślinach traktowanych jak i kontrolnych wykazuje regularny przyrost w porównaniu z „plonem” I-go zbioru. W zbiorze III-cim „plony” alkaloidów na jedną roślinę wykazują silny spadek w porównaniu ze zbiorem II-gim.

Z drugiej strony „plony” alkaloidów liści dojrzałych na jedną roślinę w roślinach traktowanych są w I-szym zbiorze największe w porównaniu z kontrolą (około 600%), w II-gim zbiorze są znacznie niższe (około 150%) i w III-cim zbiorze nie wykazują zasadniczych różnic.

Nie ulega wątpliwości, że liście młode i dojrzałe I-go okresu rozwoju rośliny są z punktu widzenia teoretycznego najbardziej interesującym przedmiotem badań, natomiast w związku z praktycznym wykorzystaniem rośliny do ekstrakcji alkaloidów liście zbiorów późniejszych, odpowiadających mniej więcej okresowi zbioru II-go mogą przedstawiać większą wartość ekonomiczną. Masa liści II-go zbioru roślin traktowanych nie wykazuje wprawdzie większych różnic, natomiast zawartość alkaloidów w liściach dojrzałych tych roślin jest dwukrotnie większa, aniżeli

w zbiorze I-szym. Wprawdzie w zbiorze III-cim stwierdza się dalszy, znaczny przyrost zawartości alkaloidów, jednak masa liści opada gwałtownie, przeto „plon alkaloidów” ulega znacznemu obniżeniu.

W ten sposób doświadczenia ostatnich 2 lat wyraźnie nakreślają kierunek dalszych badań, szczególnie jeśli chodzi o farmakopealne znaczenie tej rośliny.

Ze względu na ścisły związek, jaki istnieje między rozwojem rośliny i zawartością w niej alkaloidów, wzrastającą regularnie z wiekiem rośliny, z drugiej zaś strony ze względu na to, że bodźcowanie żelazicyjankiem wykazuje najkorzystniejsze efekty w okresie między kwitnieniem i zawiązywaniem owoców, należy dokładnie przebadać te okresy rozwoju, w których iloczyn masy liści i zawartości alkaloidów przedstawia się najkorzystniej.

### Streszczenie

Przeprowadzono dalsze, rozszerzone badania nad wpływem żelazicyjanku potasu na plon i zawartość alkaloidów i niektórych innych składników w *Datura stramonium* L. uwzględniając różne stężenia bodźca (0,05%, 0,1% i 0,2%). Z uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Moczenie nasion w żelazicyjanku potasu powodowało znaczne przyspieszenie wzrostu i rozwoju roślin oraz przyrost zawartości alkaloidów, azotu ogólnego i kwasu cytrynowego, szczególnie w pierwszym okresie rozwoju rośliny.

2. Zawartość alkaloidów w liściach dojrzałych wzrasta proporcjonalnie do stężenia żelazicyjanku, natomiast dla liści młodych optymalne było stężenie 0,1%, a stężenie 0,2% wywołuje w nich bardzo wyraźne obniżenie zawartości alkaloidów.

3. Największe ilości alkaloidów z jednej rośliny uzyskano w II-gim zbiorze.

4. Rośliny traktowane wykazują przyrost zawartości suchej masy.

5. Nie stwierdzono istotnego wpływu żelazicyjanku na zawartość azotu rozpuszczalnego, cukrów redukujących i kwasu jabłkowego.

### LITERATURA

- [1] Reifer I., Rumińska A., Kączkowski J., *Acta Biochim. Pol.* 2, 315, 1955.
- [2] Reifer I., Buchowicz J., *Acta Biochim. Pol.* 2, 187, 1955.
- [3] Reifer I., Tarnowska K., *Acta Societ. Botan. Pol.* 20, 2, 1950.
- [4] Fujita Akiji, Danzo Iwatake, *Biochem. Z.* 242, 1—3, 43—60, 1931.
- [5] Wolszlegier D., *Przemysł Chém.* 9, 623, 1953.



[6] Reifer I., *Acta Biochim. Pol.* 1, 293, 1954.

[7] Reifer I., *Acta Bioch. Polon.* 2, 187, 1955.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТОГО КАЛИЯ НА *DATURA STRAMONIUM L.* УРОЖАЙ ЛИСТЬЕВ, СОДЕРЖАНИЕ АЛКАЛОИДОВ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ КОМПОНЕНТОВ

Резюме

Проведены дальнейшие, более расширенные исследования над воздействием железосинеродистого калия на урожай и содержание алкалоидов и некоторых других компонентов в *Datura stramonium L.*, учитывая различные концентрации импульса (0,05%, 0,1% и 0,2%). На основании полученных результатов сделан был следующий вывод:

1. Мочка семян в железосинеродистом калии способствовала значительному ускорению роста и развития растений, а также увеличению содержания алкалоидов, общего азота и лимонной кислоты, особенно в первом периоде развития растения.

2. Содержание алкалоидов в зрелых листьях возрастает пропорционально концентрации железосинеродистого калия, тогда как оптимальная для молодых листьев концентрация равнялась 0,1%, а концентрация 0,2% вызывает в них весьма заметное уменьшение содержания алкалоидов.

3. Самое большое количество алкалоидов из 1 растения получено было во втором сборе.

4. В обрабатываемых растениях обнаружен прирост сухой массы.

5. Не отмечено существенного влияния железосинеродистого калия на содержание растворимого азота, восстановительных сахаров и яблочной кислоты.

THE INFLUENCE OF FERRICYANIDE ON *DATURA STRAMONIUM L.* YIELD OF LEAVES, CONTENTS OF ALKALOIDS AND SOME OTHER COMPOUNDS

Summary

The influence of ferricyanide on the yield of leaves, contents of alkaloids and other compounds in *Datura stramonium L.* was investigated. Ferricyanide was used in concentrations of 0,05%, 0,1% and 0,2%. The following conclusions were drawn:

1. Treating of seeds with ferricyanide leads to a considerable speed up of plant growth and development, as well as to an increase of the con-

tent of alkaloids, total nitrogen and citric acid, particularly in the first stages of growth.

2. The contents of alkaloids in mature leaves increases in proportion with the concentration of ferricyanide. The optimal concentration for young leaves is about 0,1% and concentrations of 0,2% are decidedly detrimental.

3. The yield of alkaloids per plant is highest in the second crop.

4. Treated leaves show a marked increase of dry matter.

5. No differences were found in soluble nitrogen, reducing sugars and malic acid in the treated plants.

Otrzymano 29.12.1955 r.



J. PAWEŁKIEWICZ i K. ZODROW

## WYTWARZANIE WOLNYCH PORFIRYN PRZEZ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Z Katedry Chemii Ogólnej

Kierownik Naukowy: doc. dr J. Pawełkiewicz

i z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Kierownik: doc. dr J. Duda

Hodując na pożywkach półsyntetycznych szczep bakterii kwasu propionowego z gatunku *Propionibacterium shermanii*, zauważono wydzielanie się do pożywki czerwono-fioletowego barwnika. Barwnik ten wykazywał następujące cechy fizyko-chemiczne:

1. Wysalał się z pożywki (po odwirowaniu bakterii) siarczanem amonowym przy pH 4,0—5,0. Wysolony barwnik można było odsączyć, po czym ponownie rozpuścić w wodzie.

2. Barwnik przechodził bardzo łatwo z pożywki i wodnych roztworów do mieszaniny chloroformu i alkoholu n-butyłowego (1:1) przy pH 4,0—5,0. Z roztworu organicznego barwnik ekstrahował się wodnymi roztworami alkaliów lub soli alkalicznych (NaOH, NH<sub>4</sub>OH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>). Kwas solny również ekstrahował barwnik z fazy organicznej, ze zmianą barwy z czerwono-fioletowej na wyraźnie fioletową. Jednakże już po kilkunastominutowym wytrząsaniu z kwasem solnym część barwnika w sposób trwały wiązała się w fazie organicznej i nie dawała się już z niej wyekstrahować nawet roztworami alkalicznymi.

3. Zakwaszenie wodnego, obojętnego lub alkalicznego koncentratu barwnika do pH 3,0—4,0 powodowało jego wytrącanie się w postaci brązowych kłaczków. Wytrącony barwnik rozpuszczał się łatwo zarówno w roztworze HCl, jak i w roztworach alkalicznych.

4. Kwaśny wodny roztwór barwnika odbarwiał się natychmiast pod działaniem dwutlenku sodowego lub kwasu askorbinowego. W roztworze alkalicznym wymienione związki redukujące nie wywoływały żadnych zmian.

Przytoczone właściwości nasunęły przypuszczenie, że wydzielany przez *Propionibacterium shermanii* barwnik jest związkiem porfiryńowym.

Przypuszczenie to potwierdziły badania widmowe. W roztworze obojętnym barwnik posiadał charakterystyczne dla porfiryn czteropasmowe widmo absorpcyjne w zakresie 450—650 m $\mu$ , a w roztworze kwasu solnego widmo dwupasmowe. Ponadto barwnik wykazywał bardzo silną absorpcję przy około 400 m $\mu$ , przy czym maksimum nieco zmieniało się w zależności od pH roztworu. Wodne roztwory barwnika, zarówno kwaśne, obojętne, jak i alkaliczne, oraz roztwory w rozpuszczalnikach organicznych pod wpływem promieni ultrafioletowych (z lampy Wooda) bardzo silnie fluoryzowały jaskrawo czerwoną fluorescencją.

Wydzielanie wolnych porfiryn przez drobnoustroje jest zjawiskiem znanym. Występowanie wolnej koproporfiryny I oraz protoporfiryny IX stwierdzono prawie we wszystkich komórkach drożdżowych. Wytwarzanie koproporfiryn przez drożdże wzrasta podczas hodowania ich na pożywkach ubogich w witaminy [9], [10]. Kench i Wilkinson [19] wyizolowali izomery I i III koproporfiryny z drożdży piwnych. Smith [33] wykrył większe ilości wolnej porfiryny w toksycznych przesączach *Corynebacterium diphtheriae*, a odkrycie to potwierdzili Coulter i Stone [4]. Gray i Holt [12] zidentyfikowali tę porfiryne jako koproporfiryne III, zawierającą nadto bardzo małe ilości uroporfiryny I. Todd wyizolował koproporfiryne III z *Mycobacterium karlinski* [35]. Tę samą porfiryne wykrył Schaeffer [30] w beztlenowych hodowlach *Bacillus subtilis*.

## Część doświadczalna

### METODY HODOWLANE

Szczep *Propionibacterium shermanii*, otrzymany od Prof. dr H. Karnickiej z Olsztyna, hodowano na pożywkę agarowej (pożywka hodowlana) o składzie podanym w tablicy 1.

Na opisanej pożywkę szczep hodowano w kulturach kłutych przez 5 dni w temperaturze 28°. Wyhodowane w ten sposób kultury przechowywano w lodówce w temperaturze 4°. Co 4 tygodnie bakterie przeszczepiano na świeżą pożywkę hodowlaną.

Zbadano zasadnicze cechy szczepu pod względem hodowlanym, morfologicznym i właściwości fermentacyjnych. Hodowle związane z tymi badaniami, jak zresztą i wszystkie hodowle doświadczalne prowadzono w temp. 28°.

Rozwój szczepu na pożywkę hodowlanej skośnej w warunkach tlenowych jest bardzo słaby i ustaje zupełnie po kilku dniach. Rozwój szczepu na powierzchni tej samej pożywki w atmosferze CO<sub>2</sub> jest bujny. Uwidacznia się on po około 48 godzinach hodowli, nasila się z czasem i ustaje



po upływie 5—7 dni. Pasma bakterii wyrosłych wzdłuż linii posiewu jest koloru żółtawo-białawego, a w świetle przechodzącym prześwieca z odcieniem złotawo-żółtym. Hodowla kłuta na pożywce hodowlanej charakteryzuje się brakiem rozwoju na powierzchni. Wzrost zaczynający się

Tablica 1

## Pożywka hodowlana

1. Woda wodociągowa . . . . .	400 ml
2. Agar . . . . .	20 g
Rozpuścić w autoklawie	
3. Woda wodociągowa . . . . .	300 ml
4. Hydrolizat kwasowy kazeiny . . . . .	100 ml
5. Ekstrakt drożdżowy . . . . .	4 g
6. Namok z kukurydzy . . . . .	3 g
7. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	4,5 g
8. $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1%-owy roztwór) . . . . .	0,1 ml
Zmieszać na gorąco składniki od 1 do 8, dopełnić do 900 ml wodą wodociągową, ustalić pH na 6,8 i wstawić do autoklawu ( $110^\circ/15$ min.). Po wyjęciu z autoklawu sprawdzić pH, przesączony przez watę i wyjałowić w autoklawie ( $110^\circ/10$ min.).	
9. Glukoza (10%-owy roztwór) . . . . .	100 ml
Dodać jałowo roztwór glukozy i rozlać jałowo po 15 ml do probówek.	

przy powierzchni ciągnie się wzdłuż linii wklucia w postaci grubego pasma wykazującego gruzełkowate uwypuklenia. Pełny rozwój w hodowli kłutej trwa 4—6 dni.

Na pożywce Clauberga w atmosferze  $\text{CO}_2$  pasmo wzrostu jest czarne, przypominające wzrost *Corynebacterium diphtheriae*. Szczep hodowany w atmosferze  $\text{CO}_2$  na agarze mięsno-peptonowym z krwią charakteryzuje się wzrostem barwy szaro-białawej, bez zjawiska hemolizy.

Rozwój na pożywkach płynnych zaczyna się jednolitym zmętnieniem. Po 3 — 4 dniach, równocześnie z nasileniem się rozwoju, występuje tworzenie się zbitego osadu na dnie i przejaśnianie się górnej warstwy pożywki.

Kształt i układ komórek wyrosłych na powierzchni pożywki hodowlanej w atmosferze tlenowej jest typowy dla maczugowców, jednak z tendencją do tworzenia form zgiętych i kolbowato rozdętych. Charakterystyczna jest duża różnorodność wymiarów. Grubość komórek waha się od 0,3 do 0,4  $\mu$ , a długość od 0,6 do 2  $\mu$ . Komórki wyrosłe na powierzchni pożywki hodowlanej w atmosferze  $\text{CO}_2$  oraz komórki z pożywki płynnej (pożywka doświadczalna) mają postać krótkich pałeczek, podobnych do bakterii pseudofterytycznych. Wymiary ich są następujące: grubość

od 0,3 do 0,4  $\mu$ , długość od 0,5 do 1  $\mu$ . Często występują parami, rzadziej tworzą łańcuszki złożone najwyżej z 3 do 4 komórek.

Komórki te barwią się metodą Grama dodatnio. Barwienie metodą Neissera wykazuje, że w hodowlach powierzchniowych na pożywce hodowlanej, zarówno w warunkach tlenowych jak i w atmosferze CO<sub>2</sub>, tylko nieliczne komórki posiadają jedno lub dwa ziarenka metachromatyczne. Natomiast w hodowlach płynnych większość komórek charakteryzuje się obecnością dwu umieszczonych biegunowo ziarnistości metachromatycznych.

Właściwości fermentacyjne szczepu, użytego w niniejszej pracy, badano na opisanej niżej półsyntetycznej pożywce doświadczalnej. Szczep silnie fermentuje z wytworzeniem kwasu i gazu: glicerol, glukozę, galaktozę i laktozę. Rozwój na pożywce z D-mannozą jest silny, jednak fermentacja tego cukru przebiega z wytworzeniem tylko kwasu. Na pożywce z fruktozą rozwój jest słaby, z lekkim zakwaszeniem podłoża. L-(+)-arabinoza jest słabo fermentowana z wytworzeniem kwasu i gazu. Inozytol (i-inozytol) jest silnie fermentowany z zakwaszeniem pożywki. Rozwój na pożywce doświadczalnej z dodatkiem mleczanu sodu — słaby. Stwierdzono jednak, że tiamina (dodawano 2  $\mu$ g/ml pożywki) wywiera wyraźne stymulujące działanie na wykorzystanie przez szczep tego źródła węgla.

Poza powyższymi danymi stwierdzono, że szczep nie fermentuje: amygdaliny, dekstryny, skrobi, glikogenu, inuliny, maltozy, mannitolu, rafinozy, D-(—)-ribozy, L-(+)-ramnozy, sorbitolu, sorbozy, sacharozy, trehalozy i ksylozy.

Czynnikiem wzrostowym, koniecznym dla rozwoju szczepu, okazał się kwas pantotenowy, a biotyna wywierała wyraźne działanie stymulujące. Spostrzeżenia te są zgodne z badaniami innych autorów [34], [5]. M o a t i D e l w i c h e [23] wykazali, że kwas pantotenowy można częściowo zastąpić koenzymem A. Znaczenie biotyny polega według D e l w i c h e [6] na tym, że odgrywa ona zasadniczą rolę w procesie dekarboksylacji kwasu bursztynowego. Tiamina, jak wyżej podano, stymulowała, a kwas para-aminobenzoowy (PAB) nie stymulował wzrostu na pożywce z mleczanem sodu. Zarówno tiamina jak i PAB nie wpływały stymulująco na fermentację fruktozy.

Badania nad wytwarzaniem wolnych porfiryn wykonano na pożywce doświadczalnej (tablica 2).

Hydrolizat kazeiny przygotowano następująco: do 525 g handlowej kazeiny dodawano 4000 ml kwasu solnego (1 : 1) i gotowano pod chłodnicą zwrotną przez 10 godzin. Następnie, celem usunięcia nadmiaru HCl, odparowywano w próżni do konsystencji gęstego syropu, który z kolei rozpuszczano w 2000 ml wody i przy pomocy stężonego NaOH doprowadzano do pH 3,0—4,0. Tak uzyskany płyn zadawano 100 g węgla akty-



wowanego „Carbopol H2“ i po godzinie sączono. Przesącz alkalizowano NaOH do pH 6,5—7,0 (wytrąca się osad), zadawano 50 g tego samego węgla aktywowanego, gotowano i sączono. Węgiel przepłukiwano każdorazowo 150—200 ml wody. Przesącz stawiano na kilkanaście godzin do lodówki o temperaturze 4°, co powodowało wytrącanie się osadu, który odsączano.

Tak przygotowany hydrolizat zawierał wyraźne ślady żelaza (żelazo jonowe), co stwierdzano przy pomocy 2,2'-dwupirydyłu. Z tego wzglę-

Tablica 2

Pożywka doświadczalna

1. Hydrolizat kwasowy kazeiny (bez $Fe^{++}$ ) . . . . .	około* 200 ml
2. Roztwór $NaH_2PO_4$ (4,4 g w 100 ml $H_2O$ ) . . . . .	40 ml
3. Roztwór $K_3PO_4$ (4,4 g w 100 ml $H_2O$ ) . . . . .	40 ml
4. Roztwór $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2 g w 50 ml $H_2O$ ) . . . . .	10 ml
5. Roztwór $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g w 250 ml $H_2O$ ) . . . . .	5 ml
6. Woda podwójnie destylowana — dopełnić do . . . . .	939 ml
Zmieszać składniki od 1 do 6, sprawdzić pH (6,8) i wyjałowić w autoklawie (110° /15 minut).	
7. Roztwór pantotenu wapnia (10 mg w 250 ml $H_2O$ ) . . . . .	10 ml
8. Roztwór biotyny (10 mg w 500 ml $H_2O$ ) . . . . .	1 ml
9. Roztwór glukozy (20 g w 100 ml $H_2O$ ) . . . . .	50 ml

Składniki od 7 do 9 wyjałowić dwa razy w aparacie Kocha po 10 minut i dodać do wyjałowionych uprzednio składników 1 do 6.

\*) Ilość hydrolizatu odpowiadała 4 g azotu ogólnego

du nie nadawał się on do badań nad tworzeniem wolnych porfiryn przez bakterie propionowe. Żelazo usuwano z hydrolizatu przez zagotowanie go z dodatkiem 70 g węglanu wapnia. Przy usuwaniu żelaza z niektórych serii hydrolizatu dodawano oprócz węglanu wapnia jeszcze 2—3 g  $K_3PO_4$ , co ułatwiało usunięcie Fe. Po zagotowaniu z  $CaCO_3$  hydrolizat sączono. Jego barwa z poprzednio żółtawo-czerwonej po zabiegu usuwającym żelazo jonowe zmieniała się na jasno żółtą. Następnie hydrolizat zakwaszano przy pomocy HCl (1 : 1) do pH 6,8 i uzupełniano wodą do 3000 ml, rozlewano do kolb oraz wyjałowiano w autoklawie (110°/15 minut).

Każdą serię hydrolizatu badano na zawartość azotu całkowitego. Ilość N w różnych seriach hydrolizatu wahała się od 1,75 do 2,1 g w 100 ml. Do pożywki brano tyle hydrolizatu, aby ilość azotu całkowitego przypadająca na 1 litr pożywki wynosiła 4 g.

Opisaną wyżej pożywkę doświadczalną zaszczipiano silnie rozwiniętą kulturą bakterii, które rozmnażano etapami. Pobierano jałowo np. z 500 ml pożywki doświadczalnej, znajdującej się w kolbie Erlenmeyera o pojemności 750 ml, 100 ml pożywki i przenoszono do kolby o pojemności 200 ml. Z pobranych 100 ml przenoszono z kolei po 10 ml pożywki do dwu probówek. Probówki zaszczipiano dużą dawką bakterii pobranych z hodowli kłutej na pożywce hodowlanej, względnie zawiesiną przemytych komórek lub 1 ml uprzednio rozmnożonej gęstej hodowli. Po upływie 48—72 godzin kulturami z probówek zaszczipiano 80 ml pożywki znajdującej się w kolbce o pojemności 200 ml i znowu hodowano 48 godzin. Tak namnożoną kulturą zaszczipiano pozostałe 400 ml pożywki doświadczalnej, osiągając tym samym jej objętość wyjściową.

Kultury na pożywce doświadczalnej hodowano przez 9 do 14 dni. W czasie hodowli, zwłaszcza w pierwszych dniach, następowało szybkie zakwaszenie pożywki. W przeciągu dwóch dni pH obniżało się średnio do wartości 5,5—6,0. Dlatego też co 48 godzin doprowadzano pH pożywki do wartości 6,5—6,6 25% roztworem węglańu sodu. Do neutralizacji pożywki o objętości 1000 ml zużywano w czasie 14-dniowej hodowli około 100 ml roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Zabieg neutralizacji pożywki powodował przesycaenie się jej dwutlenkiem węgla, co wpływało korzystnie na utrzymanie się beztlenowych warunków rozwoju. Duża ilość  $\text{CO}_2$  w pożywce mogła również wywierać wpływ na proces asymilacji tego związku przez bakterie [37]. Oprócz neutralizacji stosowano 3 lub 4-krotne dokarmianie hodowli glicerolem, dodając go każdorazowo w ilości 10 ml na 1000 ml pożywki.

Po upływie około 40 godzin hodowli zaczynało pojawiać się różowe podbarwienie pożywki. Podbarwienie to po około 70 godzinach stawało się wyraźne i nasilało się jeszcze w ciągu następnych dni, tak że pożywka przyjmowała barwę czerwono-fioletową. Podbarwienie pożywki zmieniało odcień w zależności od jej pH. Przy pH wynoszącym około 6,8 pożywka przyjmowała wyraźniejszą barwę czerwono-różową niż przy pH 5,0—5,5.

Równolegle z kulturami na pożywce doświadczalnej nastawiano hodowle kontrolne na tej samej pożywce z dodatkiem żelaza. Na 1000 ml pożywki dodawano 10 ml roztworu siarczanu żelazawego (100 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  w 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Roztwór ten zakwaszano rozcieńczonym kwasem siarkowym, sterylizowano w aparacie Kocha i dodawano jałowo do pożywki. Kultury na pożywce z dodatkiem żelaza nie wykazywały podbarwienia czerwono-fioletowego. W miarę rozwoju przyjmowały one barwę białawo-żółtawą. Rozwój bakterii na pożywce z żelazem był intensywniejszy niż na pożywce bez żelaza. Świadczyła o tym ilość węglańu sodu zużytego dla neutralizacji pożywki. Do neutralizacji 1000 ml pożywki bez żelaza zużywano w czasie hodowli około 100 ml roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Neutralizacja tej samej ilości pożywki z dodatkiem żelaza wy-



magala około 160 ml roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . O wpływie żelaza na intensywność rozwoju bakterii świadczy także sucha masa komórek. W pożywkach bez żelaza wynosiła ona około 3,5 g na 1000 ml hodowli, a na pożywkach z żelazem osiągała średnio 5,5 g z tej samej objętości kultury.

#### METODY ANALITYCZNE

##### 1. Oznaczanie porfiryn

W niniejszej pracy stosowano następującą metodę oznaczania porfiryn:

Próbe pożywki zobojętniano 25%-owym roztworem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i wirowano celem usunięcia komórek. Do 20 ml odwirowanej pożywki dodawano 12 g stałego siarczanu amonowego oraz 1 do 2 kropel lodowatego kwasu octowego (pH obniżało się w ten sposób do 4,0—5,0). Po rozpuszczeniu się siarczanu amonowego dodawano 10 ml n-butanolu i silnie wstrząsano. Ponieważ w czasie wytrząsania tworzyła się słaba emulsja, dla jej rozbicia mieszaninę wirowano. Z warstwy butanolowej, zawierającej całą porfiryne, odciągano 5 ml i przenoszono do rozdzielacza o pojemności 100 ml, dodawano 15 ml chloroformu oraz 10 ml 1%-owego roztworu  $\text{NaHCO}_3$  (w/v) i silnie wytrząsano. Porfiryny przechodziły do fazy wodnej. Dolną warstwę butanolowo-chloroformową odrzucano, a warstwę wodną przemywano 5 ml chloroformu, który również odrzucano. Do warstwy wodnej dodawano teraz 10 ml 0,3 N HCl i zakwaszony w ten sposób roztwór porfiryn przenoszono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 50 lub 100 ml. Rozdzielacz przemywano 0,1 N HCl i tym samym roztworem dopełniano kolbkę do kreski.

Celem ilościowego oznaczania porfiryn w tak przygotowanym kwaśnym roztworze mierzono spektrofotometrycznie absorpcję w kiuwecie o szerokości 1 cm dla fal o długości 380, 401 i 422 m $\mu$ . Stężenie porfiryn w próbie obliczano, uwzględniając użyte objętości pożywki i butanolu, według wzoru:

$$\text{stężenie porfiryn w mg/l} = \frac{2 d_{401} - (d_{380} + d_{422}) 10^3 \cdot v}{1,833 \cdot E_{1\text{cm}}^{1\%} (401 \text{ m}\mu)}$$

w którym:

$d_{401}$ ,  $d_{380}$ ,  $d_{422}$  oznaczają wartości absorpcji dla fal o długości 401, 380 i 422 m $\mu$ ,

$v$  = objętość końcowa roztworu w kolbce miarowej 50 lub 100 ml

$E_{1\text{cm}}^{1\%} (401 \text{ m}\mu)$  — współczynnik absorpcji koproporfiryny III dla fali 401 m $\mu$ ,

1,833 — stały współczynnik.

Wzór powyższy wyprowadzono w oparciu o pracę Rimatingtona i Sveinssona [29], którzy oznaczali spektrofotometrycznie uroporfirynę w analitycznych koncentratkach badając wartość pochłaniania w maksimum absorpcji (w zakresie pasma Soreta). Bezpośrednie obliczenia stężeń uroporfiryny oparte na tych pomiarach dawały zbyt wysokie wartości, ponieważ obecne w koncentratkach zanieczyszczenia podwyższały wynik absorpcji. Celem wprowadzenia poprawki wymienieni autorzy mierzyli jednocześnie absorpcję dla 2 dodatkowych długości fal równo odległych od fali maksymalnego pochłaniania. Zakładając jednocześnie, że absorpcja wywołana zanieczyszczeniami jest odwrotnie proporcjonalna do długości absorbowanej fali (tj. tym większa im krótsza jest fala — zjawisko powszechnie obserwowane dla złożonych układów optycznych) wyprowadzili wzór na wartość skorygowanej absorpcji:

$$d_{\text{kor. max.}} = \frac{2d_{\text{max}} - (d_{\text{max} + a} + d_{\text{max} - a})}{f},$$

w którym:

$d_{\text{max}}$  oznacza absorpcję zmierzoną dla fali maksymalnego pochłaniania,  $d_{\text{max} + a}$  i  $d_{\text{max} - a}$  oznaczają absorpcję dla fal o długościach ( $\text{max} - a$ ) i ( $\text{max} + a$ )  $m\mu$ ,

$f$  — stały współczynnik, który można obliczyć mierząc wartości absorpcji dla wybranych fal w roztworze analitycznie czystej koproporfiryny.

Dla koproporfiryny Rimatington i Sveinsson podali  $f = 1,833$ . Tę samą wartość otrzymaliśmy dla wyodrębnionego przez nas z kultury *Propionibacterium shermanii* preparatu porfiryny. Fakt ten potwierdza również identyczność wyodrębnionej w niniejszej pracy porfiryny z koproporfiryną. Współczynnik ekstynkcji przyjęto równy  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (401  $m\mu$ ) = = 8120. Wartość tę podali Jope i O'Brien [18] dla koproporfiryny III w 0,10—0,15 N HCl.

## 2. Oznaczenie żelaza

Żelazo oznaczano w popiele hydrolizatów kazeiny według metody Siderisa [32] opartej na fotokolorymetrycznym pomiarze absorpcji zielonego kompleksu utworzonego z soli żelazawych i kwasu 1-nitrozo-2-hydroksy-naftaleno-3,6-dwusulfonowego. Odczynnik ten zsyntetyzowano według Klosterera [20].

## 3. Wykrywanie kwasu $\delta$ -aminolewulinowego

Kwas  $\delta$ -aminolewulinowy wykrywano w hodowlach bakterii kwasu propionowego według następującej metody: 5 lub 10 ml kultury bakte-



ryjnej zadawano szczyptą (na końcu noża) kaolinu, silnie wytrząsano i wirowano. Kultura powinna mieć pH 4,0—5,0. W warunkach tych ewentualnie obecne w kulturze wolne porfiryny zostają zaadsorbowane na kaolinie. Centryfugat dodatkowo sączono, a klarowny płyn dzielono na dwie równe części, które przenoszono do dwu probówek. Do jednej probówki dodawano 0,5 ml nasyconego wodnego roztworu acetylooctanu etylowego, a do drugiej, kontrolnej, 0,5 ml wody. Obie probówki stawiano na 10 minut do wrzącej łaźni wodnej, następnie studzono i dodawano do obu prób równą objętość 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub>-ego roztworu (w/v) p-dwumetyloamino-benzaldehydu w kwasie solnym (1 : 1). W obecności kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego badany roztwór przyjmuje barwę czerwono-fioletową. Próba kontrolna prawie nie zmienia barwy.

Ponieważ zawartość kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego w hodowlach była niska powstałe zabarwienie czerwono-fioletowe słabo się zaznaczało, zwłaszcza w próbach posiadających własne ciemno-żółte podbarwienie. Aby ominąć tę trudność i uczulić reakcję ekstrahowano czerwono-fioletowy barwnik mieszaniną n-butanolu i chloroformu (1 : 1, v/v). W tym celu dodawano do obydwu probówek po jednym ml mieszaniny i silnie wytrząsano, poczym odstawiano dla rozdzielenia się warstw. W wypadku pozytywnej reakcji warstwa butanolowo-chloroformowa przyjmowała czyste fioletowe zabarwienie. W próbie kontrolnej warstwa ta pozostawała bezbarwna, najwyżej lekko żółta. Reakcję wykrywania kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego oparto na doświadczeniach Granicka i Schrieka [11]. Autorzy ci kondensowali kwas  $\delta$ -aminolewulinowy z acetyloacetonem i utworzony w ten sposób związek pirolowy wykrywali przy pomocy odczynnika Ehrlicha (p-dwumetyloaminobenzaldehyd w HCl).

W opracowanej przez nas metodzie wykrywania kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego używaliśmy do kondensacji acetylooctanu etylowego, a metodę uczuliliśmy wprowadzając selektywną ekstrakcję utworzonego barwnika. Metodę sprawdzono na czystych, rozcieńczonych roztworach chlorowodoru kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego. Preparat tego związku o t.t. 148—151° (roz.) otrzymaliśmy od dr J. J. Scotta.

#### WYODRĘBNIANIE I IDENTYFIKACJA PORFIRYN

Porfiryny wyodrębniono z 28 litrów 10-dniowej hodowli *Propionibacterium shermanii* na pożywce doświadczalnej. Bakterie odwirowano na wirówce typu Sharples przy około 25000 obr./min. Klarowny centryfugat zakwaszono stężonym HCl do pH około 3,5 i zadano go 200 g kaolinu. Kaolin z zaadsorbowanymi na nim porfirynami odwirowano na wirówce Sharplesa. W odwirowanym płynie stwierdzono tylko ślady porfiryn. Płyn ten odrzucano.

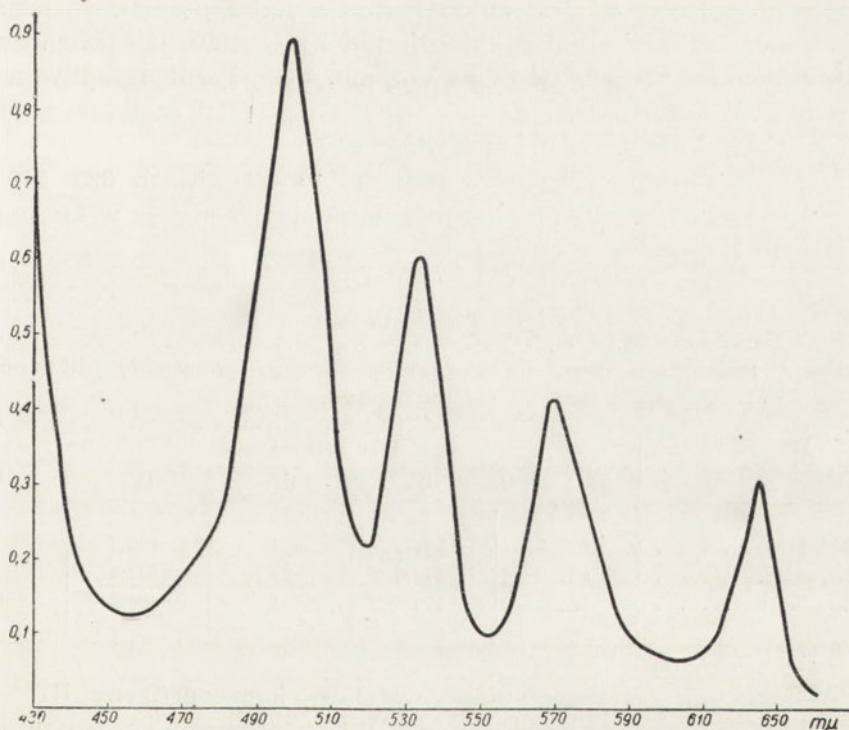
Porfiryny eluowano z kaolinu małymi porcjami acetonu zakwaszonego kwasem solnym (3 ml stęż. HCl na 100 ml acetonu). W sumie zużyto 1750 ml acetonu. Eluat zadano około 150 ml wody, poczym oddestylowano aceton pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50—60° na łaźni wodnej. Wodny, kwaśny roztwór zadawano stężonym roztworem octanu sodowego aż do uzyskania pH 3,5 (około 110 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Roztwór pozostawiono na 36 godzin w chłodni w temp. 4°, poczym odwirowano wytrącone porfiryny. Odwirowane porfiryny przemyto jeden raz wodą zakwaszoną kwasem octowym i wirowano. Odwirowany osad rozpuszczano w 100 ml 0,5 N HCl i sączono przez sączek piankowy G3. W kwasie solnym nie rozpuszczały się substancje o charakterze smolistym. Klarowny przesącz ponownie zadawano nasyconym roztworem octanu sodowego aż do uzyskania pH 3,5 i pozostawiono przez noc w chłodni.

Wytrącony osad odwirowano i przemyto rozcieńczonym roztworem kwasu octowego. Ciecz znad osadu miała barwę słomkową, popłuczyny były prawie bezbarwne. Przemyty osad wysuszono w eksykatorze próżniowym w temp. pokojowej nad  $\text{CaCl}_2$ , poczym rozpuszczono go w 50 ml metanolu nasyconego uprzednio gazowym chlorowodorem. Roztwór przechowywano w ciemnym pomieszczeniu w temp. pokojowej. Po 24 godzinach roztwór przelano do rozdzielacza o pojemności 1 l. Kolbę po rozdzieleniu przepłukano 50 ml chloroformu. Popłuczyny dolano do rozdzielacza, poczym szybko dodawano nasyconego roztworu octanu sodowego aż do uzyskania zmiany zabarwienia z fiołkowego na czerwone (pH 4,0). Dodano 150 ml wody, wytrząsano i oddzielono fazę chloroformową zawierającą metylowe estry wyodrębnionych porfiryn. Pozostały wodno-alkoholowy roztwór ekstrahowano kilka razy małymi porcjami chloroformu, aż do zupełnego usunięcia barwnych estrów. Połączone ekstrakty chloroformowe przemyto jeden raz wodą, potem rozcieńczonym roztworem amoniaku (celem usunięcia ewentualnie niezestryfikowanych porfiryn), a wreszcie dwa razy wodą. Roztwór chloroformowy przesączono przez zwilżony chloroformem sączek do kolby próżniowej i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 40—60°. Pozostałość rozpuszczono w 4 ml chloroformu, roztwór przeniesiono do erlenmayerki i kolbę przemyto małymi porcjami gorącego metanolu. Połączone w kolbie Erlenmayera roztwory zadano 4-krotną objętością wrzącego metanolu i wstawiono na 3 dni do chłodni.

Ester metylowy porfiryn, wykryty w postaci ciemnych kryształów, odsączono na lejku piankowym G3, przemyto małą ilością metanolu i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem najpierw nad  $\text{CaCl}_2$ , a następnie nad  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . W ten sposób otrzymano 159 mg estru metylowego porfiryn.



Temperatura topliwości surowego preparatu wynosiła  $146^{\circ}$ . Punkt retopliwości wynosił  $176^{\circ}$ . Punkty topliwości i retopliwości wskazywały, że preparat jest prawie czystą koproporfiryną III (estrem metylowym). Potwierdziła to również analiza chromatograficzna, wykonana według Rapporta, Calverta, Loefflera i Gasta (metoda chromatografii bibułowej pierścieniowej) [28]. W metodzie tej wprowadzono modyfikację polegającą na zastąpieniu w rozpuszczalniku rozwijającym dwuchloroetylenu — dwuchloroetanem, a heptanu — heksanem. W badaniach tych jako standardu protoporfiryny IX użyto preparatu sporządzo-



Rys. 1. Widmo absorpcyjne estru czterometylowego koproporfiryny III, wyodrębnionej z kultur *Propionibacterium shermanii* w roztworze chloroformowym

nego z hemoglobiny według Grinsteina [13]. Do preparatyki użyto hemoglobiny firmy Difco.

Na chromatogramach wykonanych na bibule chromatograficznej Whatman nr 3, prócz głównego pierścienia koproporfiryny III ( $R_f = 0,71$ ) stwierdzono występowanie w ilościach śladowych drugiego pierścienia o  $R_f = 0,41$ . Prawdopodobnie jest to plama koproporfiryny I. Dla protoporfiryny IX użytej w badaniach jako standardu wartość  $R_f$  wynosiła 0,82.

R a p p o r t i i n n i [28] podają dla koproporfiryny III i I odpowiednio wartości  $R_f$  0,62 i 0,53, a dla protoporfiryny IX — 0,83.

Celem dalszego oczyszczenia preparatu otrzymanej koproporfiryny III użyto metody chromatograficznej według G r a y a i H o l t a [12]. W tym celu benzenowy roztwór estru metylowego badanej porfiryny przepuszczono przez kolumnę z węglanem wapniowym. Czerwony pas koproporfiryny szybko przesunął się w kierunku dna kolumny, podczas gdy brązowe zanieczyszczenia zaadsorbowane zostały u jej szczytu. Jako środka eluującego użyto benzenu. Węglan wapniowy przed upakowaniem w kolumnie wysuszono w temp. 120°. Zebrany eluat benzenowy odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, a suchą pozostałość ponownie krystalizowano z mieszaniny chloroformu i metanolu, jak podano wyżej.

Oczyszczony preparat topił się w temp. 148°. Punkt retopliwości wyniósł 178°. Widmo absorpcyjne tak otrzymanego estru metylowego w roztworze chloroformowym przedstawia rys. 1.

Maksima absorpcji przypadają dla fal o długościach 625, 570, 534, 499,5 i 401 m $\mu$ . Intensywność pasm absorpcyjnych maleje w kierunku V, IV, III, II, I.

T a b l i c a 3

Zestawienie maksimów absorpcji dla estru czterometylowego koproporfiryny III w roztworze chloroformowym

Autorzy	P a s m a w m $\mu$ .				
	I	II	III	IV	V
Todd [35] . . . . .	623,5	567	534	498,5	
Gray i Holt [12] . . . . .	622,1	572,0	533,7	502,5	
Nasza praca . . . . .	625	570	534	499,5	401

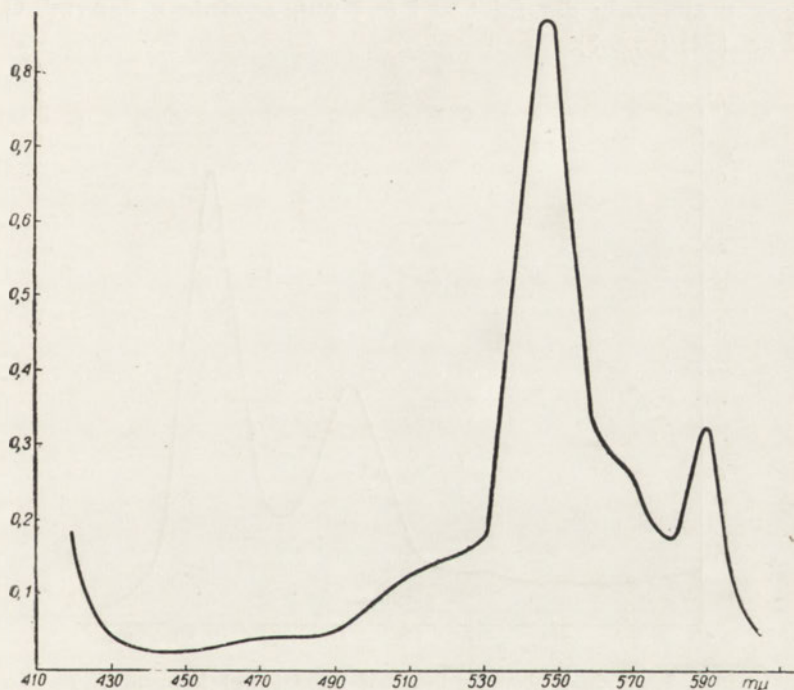
W tabelicy 3 zestawiono dane widmowe koproporfiryny III według T o d d a [35] oraz G r a y a i H o l t a [12] w porównaniu z danymi otrzymanymi w naszej pracy.

Dla dalszej identyfikacji wyodrębnionej porfiryny zhydrolizowano małą próbkę estru metylowego i wolne porfiryny przebadano metodą chromatografii bibulowej według N i c h o l a s i R i m i n g t o n a [25] w modyfikacji C h u i C h u [2]. W tym celu kilka kryształków estru metylowego porfiryn rozpuszczono w kilku kroplach kwasu solnego (1 : 1) i pozostawiono przez noc w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem nad stałym NaOH. Suchą pozostałość rozpuszczono w kilku kroplach 5 N NH<sub>4</sub>OH i roztwór naniesiono na bibułę Whatman nr 1. Chromatogram rozwijano 2,6-lutydyną (świeżo



destylowaną o t.w.  $143^{\circ}$ ) z wodą (3,3 : 2,7 v/v) w temperaturze pokojowej. Plamy porfiryn obserwowano pod lampą kwarcową zaopatrzoną w filtr Wooda. Otrzymano tylko jedną plamę porfiryn o  $R_f = 0,66 - 0,69$ .

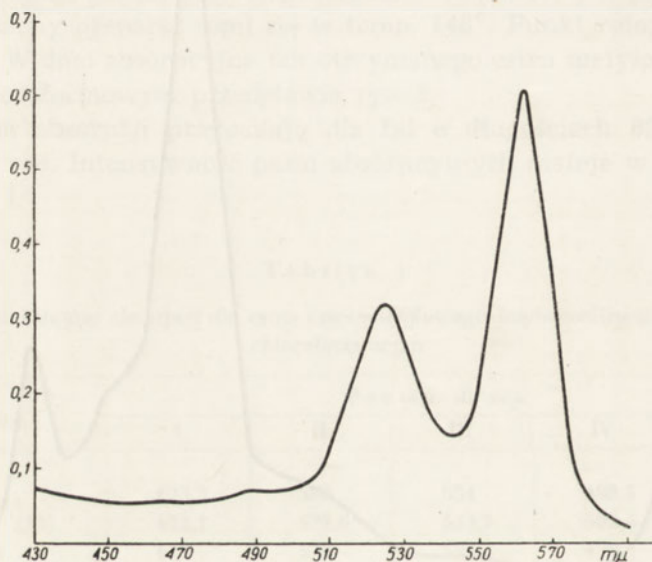
Przebadano również widmo absorpcyjne wolnej porfiryny w roztworze kwasu solnego. Kilka mg estru metylowego rozpuszczono w 2 ml kwasu solnego (1 : 1) i pozostawiono do następnego dnia. Zhydrolizowany w ten sposób roztwór porfiryn rozcieńczono w kolbce miarowej wodą do objętości 100 ml i zbadano widmo (rys. 2). Maksima absorpcji występowały dla fal 547,5 i 590  $m\mu$ .



Rys. 2. Widmo absorpcyjne koproporfiryny III wyodrębnionej z kultur *Propionibacterium shermanii* w 0,1 N HCl

Przyrządzono również kompleksową sól miedziową z oczyszczonego estru metylowego i określono jej temperaturę topliwości oraz zbadano widmo absorpcyjne. Około 20 mg estru metylowego otrzymanej porfiryny rozpuszczono w 10 ml lodowatego kwasu octowego, dodano roztworu octanu miedziowego (ok. 50 mg w 10 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) i mieszaninę gotowano na siatce w ciągu 5 minut. Po ostygnięciu płyn przelano do rozdzielacza o pojemności 150 ml, dodano około 100 ml wody i wytrąconą czerwoną sól miedziową ekstrahowano chloroformem. Połączone ekstrakty chloro-

formowe przemyto wodą i przesączono przez zwilżony chloroformem sączek do kolbki próżniowej. Po odpędzeniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, suchą pozostałość rozpuszczono w 4 ml chloroformu i na gorąco zadano wrzącym metanolem. Po oziębieniu krystalizowała sól miedziowa. Po 3 krystalizacjach temperatura topliwości soli wynosiła 210 do 211° (wartość nie korygowana). Sól miedziowa estru metylowego koproporfiryny III topi się według V ö l k e r a [36] w temp. 206°. G r a y i H o l t [12] stwierdzili dla preparatu 5-ciokrotnie krystalizowanego t.t. 218°. Analogiczna sól koproporfiryny I topi się w 284° [22]. Maksima absorpcji chloroformowego roztworu soli miedziowej estru metylowego porfiryny przypadają dla fal 526 i 563 m $\mu$ , zgodnie z danymi G r a y a i H o l t a [12] (rys. 3).



Rys. 3. Widmo absorpcyjne soli miedziowej koproporfiryny III, wyodrębnionej z kultur *Propionibacterium shermanii* w roztworze chloroformowym

Na podstawie wyżej przedstawionych danych wolną porfiryne wyodrębnioną z kultur *Propionibacterium shermanii* zidentyfikowano jako koproporfiryne III. Obok koproporfiryny III występuje w śladach dodatkowo inna porfiryne, prawdopodobnie izomer I koproporfiryny.

#### WPLYW ZELAZA I KOBALTU NA WYTWARZANIE WOLNYCH PORFIRYN W HODOWLACH *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

W trakcie przeprowadzania badań zwrócono uwagę, że w niektórych hodowlach bakterii kwasu propionowego wolne porfiryne nie pojawiały



się. Zjawisko to związane było ze stosowaniem różnych serii hydrolizatów kazeiny. Należało przyjąć, że hydrolizaty kazeiny różniły się między sobą zawartością tych składników, od których zależy pojawianie się wolnych porfiryn w hodowlach. W pracy zwrócono szczególną uwagę na wpływ zawartości żelaza w hydrolizatach oraz na wpływ dodatku kobaltu do pożywek. Pappenheimer [26] podaje, że zawartość żelaza miała decydujące znaczenie na zjawisko powstawania wolnych porfiryn w kulturach *Corynebacterium diphtheriae*.

Pappenheimer nie obserwował pojawiania się wolnych porfiryn u *C. diphtheriae* przy stężeniu żelaza powyżej 0,6 mg na 1000 ml pożywki.

Tablica 4

Wpływ zawartości  $Fe^{++}$  na wytwarzanie wolnych porfiryn w kulturach *Propionibacterium shermanii* (Stężenie  $Co^{++}$  w pożywce 0,00  $\mu\text{g/ml}$ )

Nr próby	Stężenie $Fe^{++}$ w $\mu\text{g/ml}$	Objętość pożywki w ml	Stężenie porfiryn jako koproporfiryny III w $\mu\text{g/ml}$
1	0,00*	54	6,38
2	0,005	54	6,38
3	0,010	54	5,70
4	0,020	54	5,93
5	0,030	54	5,92
6	0,040	54	6,17
7	0,060	54	5,33
8	0,080	56	5,72
9	0,10	55	5,84
10	0,20	54	5,01
11	0,30	56	4,02
12	0,40	54	3,14
13	0,50	55	2,31
14	0,60	54	2,10
15	0,80	55	1,20
16	1,00	54	0,76

\*) Stężenie żelaza niejonowego wynosiło 6,48  $\mu\text{g/ml}$

Badając używane w naszej pracy hydrolizaty kazeinowe na zawartość jonowego żelaza (przy pomocy 2,2'-dwupirydyłu) stwierdzono, że szczep *Propionibacterium shermanii* nie wytwarzał wolnych porfiryn (analogicznie jak *Corynebacterium diphtheriae*) tylko wtedy, gdy pożywki przygotowano na hydrolizatach zawierających znaczniejsze ilości żelaza jonowego. Po usunięciu żelaza jonowego, według podanej wyżej metody, badane przez nas bakterie syntetyzowały wolne porfiryny. W niektórych

próbach stężenie wolnych porfiryn osiągało wartość 9,4 mg/l, lub w przeliczeniu na suchą masę bakteryjną wynosiło 2,5 mg/g suchej masy. Jest rzeczą bardzo interesującą, że analizy hydrolizatów kazeinowych, pozabawionych jonowego żelaza, wykazywały obecność znacznych ilości żelaza związanego, nie jonowego. Tak np. w jednej serii hydrolizatu na 100 ml stwierdzono 2,7 mg żelaza związanego (Fe oznaczano w popiele hydrolizatu). Na 1 ml pożywki, do której użyto tego hydrolizatu, przypadało zatem 6,48 µg żelaza związanego. Żelazo niejonowe nie miało jednak żadnego wpływu na syntezę wolnych porfiryn.

Celem stwierdzenia w jakich granicach stężeń jony żelaza hamują syntezę wolnych porfiryn oraz dla zbadania ewentualnej stechiometrycz-

Tablica 5

Wpływ zawartości  $Fe^{++}$  na wytwarzanie wolnych porfiryn w kulturach *Propionibacterium shermanii* (Stężenie  $Co^{++}$  w pożywce 0,41 µg/ml)

Nr próby	Stężenie $Fe^{++}$ w µg/ml	Objętość pożywki w ml	Stężenie porfiryn jako koproporfiryny III w µg/ml
1	0,00*)	54	5,27
2	0,005	54	5,27
3	0,010	54	4,30
4	0,02	55	4,06
5	0,03	54	3,98
6	0,04	54	4,02
7	0,06	54	3,92
8	0,08	54	3,72
9	0,10	54	3,60
10	0,20	54	3,29
11	0,30	54	2,59
12	0,40	54	2,14
13	0,50	54	1,08
14	0,60	54	0,73
15	0,80	54	0,44
16	1,00	54	0,27

\*) Stężenie żelaza niejonowego wynosiło 6,48 µg/ml

nej zależności między ilością wytwarzanych porfiryn a ilością wprowadzonego do pożywki żelaza przeprowadzono szereg doświadczeń. W doświadczeniach tych hodowano bakterie kwasu propionowego na pożywce doświadczalnej, do której wprowadzano określone ilości soli żelazawej ( $FeSO_4$ ). Dla zbadania wpływu kobaltu przeprowadzono analogiczne doświadczenia na pożywkach bez dodatku lub z dodatkiem określonych ilo-



ści soli kobaltowych. Wyniki tych doświadczeń podaje tablica 4 i 5, oraz rys. 4.

Z przeprowadzonych badań wynika, że dla prawie zupełnego zahamowania syntezy wolnych porfiryn przez bakterie kwasu propionowego stężenie jonów żelazawych musi być wyższe od 1  $\mu\text{g/ml}$  pożywki. W granicach stężeń  $\text{Fe}^{++}$  do 0,1  $\mu\text{g/ml}$  pożywki ilość wytwarzanych porfiryn jest zmienna i zbliżona do wartości kontrolnej (próba bez żelaza). Należy przypuszczać, że fluktuacje poziomu porfiryn w tym zakresie stężeń żelaza uwarunkowane są zaburzeniami wzrostowymi bakterii. Stwierdzono bowiem, że przy bardzo małych dawkach żelaza jonowego oraz w próbie kontrolnej (w której należało się liczyć ze śladowymi ilościami  $\text{Fe}^{++}$ ) wzrost był słabszy niż w próbach bogatszych w żelazo, a badania jakościowe wykazywały wolniejszy przebieg spalania glukozy i wytwarzania się kwasów organicznych. Dane z tablicy 4 pozwalają stwierdzić, że w granicach stężeń żelaza od 0,1 do 0,5  $\mu\text{g/ml}$  istnieje prosta proporcjonalność między ilością dodanych jonów żelazawych a ubytkiem wolnej porfiryny z pożywki. Wyliczony z danych zawartych w tablicy 4 stosunek:

Ilość g-cz. znikającej koproporfiny

Ilość g-at. dodanego Fe (jako  $\text{Fe}^{++}$ )

jest praktycznie stały i wynosi, po uwzględnieniu objętości pożywki, odpowiednio:

dla stężeń  $\text{Fe}^{++}$ :

od 0,1 do 0,2  $\mu\text{g/ml}$  pożywki 0,87

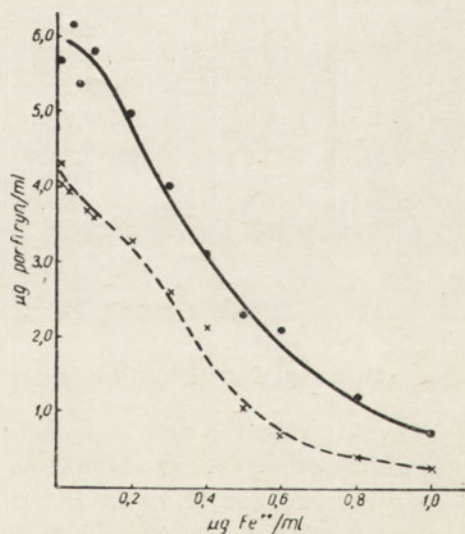
od 0,2 do 0,3 „ „ 0,78

od 0,3 do 0,4 „ „ 0,95

od 0,4 do 0,5 „ „ 0,73

Z powyższych rozważań wynika, że na każdy dodany do pożywki gramoatom żelaza (w postaci  $\text{Fe}^{++}$ ) ubywa 0,73 do 0,95 gramocząstek koproporfiny III. W pewnym przybliżeniu można więc przyjąć, że każdy g-atom Fe zapobiega tworzeniu się jednej gramocząsteczki wolnej koproporfiny.

Analogiczną zależność stwierdzali dla *Corynebacterium diphteriae* Pappenheimer [26], oraz Clarke i Clarke [3]. Z tablicy 4 i 5 wynika także, że jony kobaltowe potęgują proces hamowania syntezy wolnych porfiryn u *Propionibacterium sher-*



Rys. 4. Wpływ zawartości  $\text{Fe}^{++}$  i  $\text{Co}^{++}$  w pożywce na wytwarzanie wolnych porfiryn przez *Propionibacterium shermanii*

manii. Wykonano dalsze doświadczenia oznaczając koproporfirynę w hodowlach na pożywkach bez żelaza, a zawierających różne ilości  $\text{Co}^{++}$ . Wyniki zestawiono w tablicy 6.

Uzyskane wyniki informują mniej przejrzysto o wpływie  $\text{Co}^{++}$  na syntezę wolnych porfiryn niż doświadczenia z  $\text{Fe}^{++}$ . Dopiero znaczne stężenie soli kobaltowych, a mianowicie powyżej  $2 \mu\text{g Co}^{++}/\text{ml}$ , wyraźnie wpływało na obniżenie poziomu porfiryn. Wpływ ten można by jednak również tłumaczyć toksycznym działaniem jonów kobaltowych na bakterie kwasu propionowego.

Tablica 6

Wpływ zawartości  $\text{Co}^{++}$  na wytwarzanie wolnych porfiryn w kulturach *Propionibacterium shermanii* (Stężenie żelaza jonowego w pożywce:  $0,00 \mu\text{g}/\text{ml}^*$ )

Nr próby	Stężenie $\text{Co}^{++}$ w $\mu\text{g}/\text{ml}$	Stężenie porfiryn jako koproporfiryny III w $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	0,00	5,27
2	0,05	5,03
3	0,10	4,82
4	0,20	5,10
5	0,30	4,80
6	0,40	5,16
7	0,60	4,78
8	1,00	5,05
9	2,00	4,60
10	4,00	3,70

\*) Stężenie żelaza niejonowego wynosiło  $6,48 \mu\text{g}/\text{ml}$

#### KWAS $\delta$ -AMINOLEWULINOWY W HODOWLACH BAKTERII KWASU PROPIONOWEGO

W roku 1953 Shemin i Russel [31] stwierdzili, że kwas  $\delta$ -aminolewulinowy spełnia w tkankach zwierzęcych rolę prekursora biosyntezy porfiryn, oraz że związek ten powstaje z bursztynylo-koenzymu A i glicyny. W tym samym roku Neuberger i Scott [24], a następnie Dresel i Falk [7] dostarczyli bezpośredniego doświadczalnego dowodu dla tego twierdzenia. Wolny kwas  $\delta$ -aminolewulinowy wykrył Granick i Schrieck [11] w moczu chorych na ostrą porfiryrię. Było więc rzeczą interesującą czy kwas ten występuje w kulturach bakterii kwasu propionowego skoro są one zdolne do syntezy znacznych ilości porfiryn.

Badania nasze potwierdziły te przypuszczenia i wykazały, że kwas  $\delta$ -aminolewulinowy występuje we wszystkich przesączach hodowli ba-



danych bakterii propionowych. Stwierdzono przy tym, że więcej tego związku występuje w przesączach kultur wyrośniętych na pożywkach z dużą ilością żelaza jonowego, hamującego produkcję wolnych porfiryn niż w kulturach, w których pojawiały się porfiryny.

Do czasu naszych badań nie stwierdzono występowania wolnego kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego w kulturach bakterii.

#### WYTWARZANIE KOBALAMIN NA POŻYWKACH UBOGICH W ŻELAZO

Ponieważ niedobór jonowego żelaza w pożywce powodował zaburzenia w metabolizmie porfiryńowym u *Propionibacterium shermanii*, w pracy niniejszej zbadano czy zaburzenia te wpływają na wytwarzanie się kobalamin syntetyzowanych normalnie w dużych ilościach przez ten drobnoustrój.

W tym celu bakterie odwirowane z 28-litrowej hodowli, która posłużyła do wyodrębnienia wolnych porfiryn, zawieszono w około 5 l wody. Do zawiesiny dodano 0,4 g NaCN, doprowadzono pH do 6,0—6,5 i ogrzewano w autoklawie w temperaturze 110° przez 20 minut. Po ostudzeniu odwirowano osad, a klarowny płyn z nad osadu wysyciono stałym chlorkiem sodowym. Po wysyceniu płyn alkalizowano roztworem NaCN do pH 8,0—9,0 i wielokrotnie ekstrahowano alkoholem benzylovym aż do momentu, gdy do warstwy alkoholu przechodziły tylko ślady barwnych związków. Połączone ekstrakty alkoholowe przerobiono dalej w znany sposób [15], wyodrębniając 35,5 mg witaminu B<sub>12p</sub>.

Płyn po ekstrakcji alkoholem benzylovym wykazywał jeszcze zabarwienie brudno-różowe. Zakwaszono go 80% -owym CH<sub>3</sub>COOH do pH 3,5 i 2 razy ekstrahowano n-butanolem. Butanol wyciągał tylko zanieczyszczenia barwy żółtawej, podczas gdy różowy barwnik pozostawał w roztworze. Barwnik ten adsorbowano na węglu aktywnym „Carbopol H2” i po 2 dniach odsączono go, a następnie barwnik eluowano z węgla 75% -owym acetonem zalkalizowanym NH<sub>4</sub>OH do pH 8,0. Z eluatu odpędzono pod zmniejszonym ciśnieniem aceton, a wodny wyciąg (150 ml) po wysyceniu chlorkiem sodowym jeden raz ekstrahowano 50 ml alkoholu benzylovogo. Pewna, niewielka część barwnika przechodziła do alkoholu benzylovogo. Barwnik ten odrzucano. Ślady alkoholu benzylovogo usuwano z roztworu ekstrakcją chloroformem. Pozostały w roztworze barwnik ekstrahowano mieszaniną chloroformu i fenolu (1 : 1). Stwierdzono, że mieszanina ta lepiej ekstrahowała czerwony barwnik niż mieszanina chloroformu i o-krezolu. Ekstrakty fenolowo-chloroformowe przemyto wodą (część barwników przechodzących do wody reekstrahowano fenolem w CHCl<sub>3</sub>), następnie rozcieńczano je chloroformem i butanolem [27], a czerwony pigment reekstrahowano wodą. Po oczyszczeniu, otrzymano

16 mg barwnika o właściwościach widmowych typowych dla deznukleotydocyjanokobalaminy (wit. B<sub>12p</sub>) [16], lecz różniącego się, jak wynika z metody wyodrębnienia, innymi właściwościami rozpuszczania się w rozpuszczalnikach organicznych. Barwnik wykazuje mianowicie charakter związku bardziej hydrofilnego aniżeli witamin B<sub>12p</sub>.

Pojawienie się drugiej, hydrofilnej kobalaminy obserwowano wielokrotnie w czasie badań zwłaszcza w hodowlach, w których z powodu niedoboru Fe<sup>++</sup> bakterie wytwarzały znaczniejsze ilości wolnych porfiryn. Należy zatem sądzić, że silny niedobór żelaza jonowego wywołuje również zmiany w syntezie kobalamin. Bliższe szczegóły dotyczące wyodrębnionej hydrofilnej kobalaminy będą podane później.

Obliczono, przyjmując dla witaminu B<sub>12p</sub> i nowo wyodrębnionej kobalaminy ciężar cząsteczkowy równy 1017,1 — że około 25% dodanego do pożywki kobaltu (0,41 μg Co<sup>++</sup>/ml) znalazło się w formie pochodnych kobalaminowych w komórkach bakterii propionowych.

### Omówienie wyników

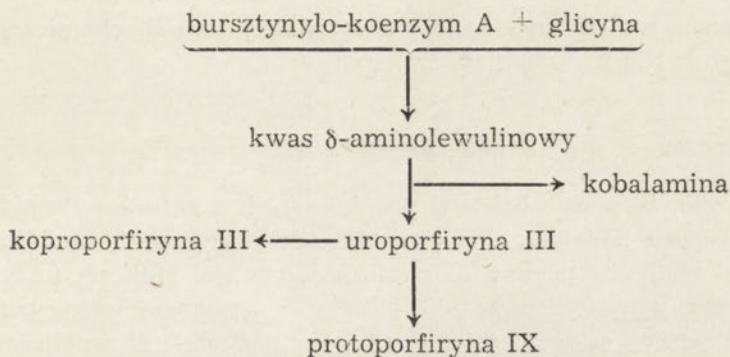
W niniejszej pracy stwierdzono, że badany przez nas szczep *Propionibacterium shermanii* wytwarza znaczne ilości wolnej koproporfiryny III na pożywkach o małym stężeniu żelaza jonowego. Natomiast żelazo niejonowe, kompleksowo związane w hydrolizacie kazeinowym nie wywiera żadnego wpływu na wytwarzanie wolnych porfiryn. Koproporfirynę III uważa się obecnie za produkt nienormalnego metabolizmu porfirynowego [8]. Wydaje się, że zaburzenia metabolizmu porfiryn pojawiają się u drobnoustrojów albo na skutek braku żelaza w pożywce, jak to występuje u *Propionibacterium shermanii*, *Corynebacterium diphtheriae* [26] oraz *Rhodopseudomonas spheroides* [21], albo też w wypadku anaerobiozy prowadzącej do zmian w układzie cytochromowym, jak to stwierdzono na przykładzie *Bacillus cereus* [30]. Dla pierwszej grupy wymienionych drobnoustrojów przyczyna zaburzeń leży w niedoborowej pożywce. W przypadku *Bacillus cereus* mamy do czynienia z zachwianiem korelacji między zapotrzebowaniem a syntezą określonego metabolitu, co również prowadzi do powstawania ślepych torów metabolicznych.

Na obniżenie się poziomu wytwarzanej przez *Propionibacterium shermanii* koproporfiryny, a zatem na normowanie się zachwianego metabolizmu porfirynowego wpływa prócz żelaza również kobalt. To samo zjawisko obserwowali u *Corynebacterium diphtheriae* Clarke i Clarke [3].

Dla wytłumaczenia wpływu kobaltu na *Propionibacterium shermanii* przyjęliśmy niżej podaną hipotezę.



Badany przez nas szczep bakterii propionowych wytwarza w obecności soli kobaltu znaczne ilości witaminu B<sub>12p</sub> (deznukleotydocyjanokobalamina) obok mniejszych ilości witaminu B<sub>12</sub> [15], [16]. Obecnie wiadomo, że w cząsteczce kobalaminowej znajduje się układ wywodzący się z 4 pierścieni pirolowych o charakterze układu pseudoporfirynowego [1], [14]. W naszej hipotezie roboczej założyliśmy, że związki porfiryne i kobalaminowe powstają ze wspólnego prekursora, którym według niżej podanego schematu może być kwas  $\delta$  aminolewulinowy:



Dodanie do pożywki soli kobaltu umożliwia powstawanie kobalaminy. Zgodnie z powyższym schematem synteza kobalamin związana jest z zapotrzebowaniem na prekursor, który prawdopodobnie jest wspólny dla syntezy kobalamin i wolnej koproporfiryny. Tworzenie się kobalamin może więc zmniejszać szybkość syntezy koproporfiryny, a więc wpływać na obniżenie się jej poziomu w pożywce. Sole kobaltu przy niedostatecznej ilości żelaza stwarzają zatem możliwość nowej drogi przemian dla tworzącego się kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego.

Doświadczenia nasze wykazały, że zdolność zmniejszania syntezy wolnej koproporfiryny przez Co<sup>++</sup> jest wyraźnie ograniczona. Zjawisko to można tłumaczyć tym, że kobalamina powstająca z kobaltu i prekursora porfiryne nigdy nie występuje w stanie wolnym, lecz jest związana z białkiem. Synteza kobalamin musi być zatem ograniczona do tych rozmiarów, do jakich dopuszcza możliwy stosunek wagowy kobalamin do białka występującego w kompleksie witaminowo-proteinowym.

Wyniki niniejszej pracy wykazują podobieństwo między *Propionibacterium shermanii* a *Corynebacterium diphtheriae* pod względem tworzenia wolnych porfiryne. Z punktu widzenia powiązań filogenetycznych grupy *Corynebacterium* z innymi grupami drobnoustrojów [17], odkrycie powyższego zjawiska można uważać za jeden z dowodów na podobieństwo biochemiczne między *Corynebacterium* a *Propionibacterium*.

Doktorowi J. J. Scottowi z St. Mary's Hospital, Medical School, Londyn — składamy podziękowanie za przesłanie preparatu chlorowodoru kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego, oraz Prof. dr Karnickiej z WSR Olsztyn za przesłanie szczepu *Propionibacterium shermanii*.

Dziękujemy również Prof. dr Janickiemu, kierownikowi Katedry Technologii Rolnej WSR w Poznaniu za umożliwienie korzystania ze spektrofotometru i wirówki, oraz Dr A. Reinholzowi, dyrektorowi Zakładów „Lechia” w Poznaniu za użyczenie nam supercentryfugi Sharplesa.

Powyższa praca została wykonana z dotacji Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk.

### Streszczenie

1. Stwierdzono, że szczep bakterii propionowych z gatunku *Propionibacterium shermanii* hodowany na pożywce półsyntetycznej, zawierającej hydrolizat kazeinowy pozbawiony żelaza jonowego, glukozę, fosforany, sole magnezu, pantotenu wapnia i biotyne, wytwarza wolne porfiryny. Poziom porfiryn osiągnął 9,4 mg na 1 litr pożywki. W przeliczeniu na suchą masę ilość wolnych porfiryn dochodziła do 2,5 mg na 1 gram suchej masy bakterii.

2. Wolną porfirynę powstającą w kulturach *Propionibacterium shermanii* zidentyfikowano metodami fizyko-chemicznymi jako koproporfirynę III. Razem z koproporfiryną III stwierdzono występowanie w ilościach śladowych innej porfiryny, prawdopodobnie koproporfiryny I.

3. Powstawanie wolnej porfiryny zależy od poziomu żelaza jonowego w pożywce. Przy zawartości jonów żelazawych powyżej 1  $\mu\text{g/ml}$  pożywki tworzą się tylko śladowe ilości wolnych porfiryn. Wolne porfiryny osiągały najwyższy poziom przy stężeniu żelaza jonowego nie przekraczającym 0,1  $\mu\text{g/ml}$  pożywki. Żelazo niejonowe, zawarte w hydrolizacie kazeinowym w ilości do 6,42  $\mu\text{g/ml}$  nie wpływa na syntezę wolnych porfiryn.

4. Ilość biosyntetyzowanej koproporfiryny III jest w określonych granicach stężeń żelaza jonowego odwrotnie proporcjonalna do stężenia  $\text{Fe}^{++}$ . Stwierdzono, że jeden mol dodanego do pożywki żelaza (w postaci  $\text{Fe}^{++}$ ) powoduje ubytek prawie jednego mola koproporfiryny III (od 0,73 do 0,95 mola).

5. Stwierdzono, że oprócz żelaza również kobalt działa hamująco na syntezę wolnych porfiryn przez *Propionibacterium shermanii*, zwłaszcza w obecności małych ilości Fe.

6. Brak żelaza w pożywce i związane z tym wytwarzanie koproporfiryny III, w obecności soli kobaltu nie wpływa hamująco na syntezę kobalamin przez *Propionibacterium shermanii*.



7. Wśród tworzonych przez *Propionibacterium shermanii* kobalamin stwierdzono nową kobalaminę, przypominającą właściwościami optycznymi deznukleotydocyjanokobalaminę (witamin B<sub>12p</sub>, czynnik B), lecz bardziej od niej hydrofilną.

8. W komórkach bakterii odwirowanych z kultur *Propionibacterium shermanii* znaleziono w postaci związków kobalaminowych około 25% kobaltu dodanego do pożywki.

9. Przedyskutowano rolę kobaltu w obniżaniu się poziomu wytwarzanej przez *Propionibacterium shermanii* koproporfiryny. Postawiono hipotezę, że w syntezie zarówno porfiryn jak i kobalamin występuje wspólny prekursor, którym może być kwas δ-aminolewulinowy.

10. W kulturach *Propionibacterium shermanii* stwierdzono występowanie kwasu δ-aminolewulinowego.

11. Opracowano nową metodę spektrofotometrycznego oznaczania porfiryn w centryfugatach kultur bakterii.

12. Opracowano nową selektywną metodę wykrywania kwasu δ-aminolewulinowego w kulturach bakterii.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A. R., Smith Lester E., *Nature* **176**, 328, 1955.
- [2] Chu T. C., Chu E. J. H., *J. Biol. Chem.* **212**, 1, 1955.
- [3] Clarke W. A., Clarke G. D., *Biochem. J.* **55**, XVI, 1953.
- [4] Coulter C. B., Stone F. M., *J. Gen. Physiol.* **14**, 583, 1931.
- [5] Delwiche E. A., *J. Bact.* **58**, 395, 1949.
- [6] Delwiche E. A., *J. Bact.* **59**, 439, 1950.
- [7] Dresel E. I. B., Falk J. E., *Nature* **172**, 1185, 1953.
- [8] Falk J. E., Dresel E. I. B., Rimington C., *Nature* **172**, 292, 1953.
- [9] Fischer H., Fink H., *Z. physiol. Chem.* **150**, 243, 1925.
- [10] Fischer H., Orth H., *Die Chemie des Pyrrols*, t. 2 cz. 1 Lipsk 1937.
- [11] Granick S., Schrieck H. G. V., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **88**, 270, 1955.
- [12] Gray C. H., Holt L. B., *Biochem. J.* **43**, 191, 1948.
- [13] Grinstein H., *J. Biol. Chem.* **167**, 515, 1947.
- [14] Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Frueblood K. N., Prosen R. J., White J. G., *Nature* **176**, 325, 1955.
- [15] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 307, 1954.
- [16] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 329, 1955.
- [17] Jensen H. L., *Ann. Rev. Microbiol.* **6**, 77, 1952.
- [18] Jope E. M., O'Brien J. R. P., *Biochem. J.* **39**, 239, 1945.
- [19] Kench J. E., Wilkinson J. F., *Nature* **155**, 579, 1945.
- [20] Kłoster H. S., *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 746, 1921.
- [21] Lascelles J., *Biochem. J.* **55**, IV, 1953.
- [22] Martens E., *Z. physiol. Chem.* **250**, 57, 1937.
- [23] Moat A. G., Delwiche E. A., *J. Bact.* **60**, 757, 1950.
- [24] Neuberger A., Scott J. J., *Nature* **172**, 1093, 1953.

- [25] Nicholas R. F. H., Rimington C., *Biochem. J.* **48**, 306, 1951.  
[26] Pappenheimer A. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 251, 1947.  
[27] Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 259, 1955.  
[28] Rapport D. A., Calvert C. R., Loeffler R. K., Gast J. H., *Anal. Chem.* **27**, 820, 1955.  
[29] Rimington C., Sveinsson S. L., *Scand. J. of Clinical and Lab. Investigation* **2**, 209, 1950.  
[30] Schaeffer P., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 261 i 362, 1952.  
[31] Shemin D., Russell C., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4873, 1953.  
[32] Sideris C. P., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **14**, 756, 1942.  
[33] Smith F. C., *Lancet* **1**, 529, 1930.  
[34] Thompson R. C., *J. Bact.* **46**, 99, 1943.  
[35] Todd C. M., *Biochem. J.* **45**, 386, 1949.  
[36] Völker O., *Z. physiol. Chem.* **258**, 1, 1939.  
[37] Werkman C. H., Wood H. G., *Advances in Enzymology* **2**, 135, 1942.

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ ПОРФИРИНОВ ПОСРЕДСТВОМ  
*PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Резюме

1. Доказано, что выращиваемый на полусинтетическом бульоне, содержащем казеиновый гидролизат, лишенный ионного железа, глюкозы, фосфоранов, солей магния пантотениана кальция и биотина, штамм пропионовой бактерии из рода *Propionibacterium shermanii* образует свободные порфирины. Количество порфирина достигло 9,4 мг, на 1 литр бульона. В расчете на сухую массу количество свободного порфирина доходило до 2,5 мг. на 1 гр. сухой массы бактерий.

2. Свободный порфирин, возникающий в культурах *Propionibacterium shermanii* был идентифицирован путем физико-химических методов как копропорфирин III. Вместе с копропорфирином III обнаружено и возникновение в микроколичествах другого порфирина, по всей вероятности, копропорфирина I.

3. Возникновение свободного порфирина обуславливается количеством ионного железа в бульоне. При содержании ионов железодиагностического калия, превышающем 1 мкг/мл бульона, образуются лишь микроколичества свободных порфиринов. Свободные порфирины достигали сомого высокого уровня при концентрации ионного железа, не превышающей 0,1 мкг/мл бульона. Неионное железо, содержащееся в казеиновом гидролизате в количестве, доходящем до 6,42 мкг/мл не оказывает воздействия на синтез свободных порфиринов.

4. Количество биосинтезированного копропорфирина III в определенных пределах концентраций ионного железа обратно-пропорционально концентрации Fe. Обнаружено, что 1 моль прибавленного к бульону железа (в виде Fe) вызывает убыль почти одной моли копропорфирина III (от 0,73 до 0,95 мол.).

5. Обнаружено, что кроме железа также и кобальт препятствует синтезу свободных порфиринов посредством *Propionibacterium shermanii* особенно при наличии незначительных количеств Fe.



6. Отсутствие железа в бульоне и связанное с этим образование копропорфирина III при наличии соли кобальта не препятствует синтезу кобаламинов посредством *Propionibacterium shermanii*.

7. Среди образуемых посредством *Propionibacterium shermanii* кобаламинов обнаружено новый кобаламин, припоминающий внешним видом дезнуклеотиодианокобаламин (витамин B<sub>12</sub>, фактор В), но более гидрофильный, чем он.

8. В клетках, выделенных при помощи центрифуги из культур *Propionibacterium shermanii* найдено, в виде кобаламиновых соединений около 25% прибавленного к бульону кобальта.

9. Обсуждена была роль кобальта в процессе уменьшения количества образуемого посредством *Propionibacterium shermanii* копропорфирина. Выдвинута была гипотеза, что как в синтезе порфиринов, так и кобаламинов выступает общий предварительный фактор, которым может быть б-аминолевулиновая кислота.

10. В культурах *Propionibacterium shermanii* обнаружено появление б-аминолевулиновой кислоты.

11. Разработан новый метод спектрофотометрического определения порфиринов в центрифугатах культур бактерий.

12. Разработан новый селекционный метод обнаружения б-аминолевулиновой кислоты в культурах бактерий.

#### THE SYNTHESIS OF FREE PORPHYRINS BY *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

#### Summary

1. It was established that a strain of propionic acid microorganisms produces free porphyrins when grown on a semi-synthetic nutrient containing an iron-ions-free casein-hydrolysate, glucose, phosphates, magnesium salts, calcium panthotenate and biotin. The level of porphyrins attained 9,4 mg per 1 litre of nutrient, or 2,5 mg when calculated per 1 g of dry mass of bacteria.

2. The free porphyrin evolving in *Propionibacterium shermanii* cultures was identified as coproporphyrin III by physico-chemical methods. Besides coproporphyrin III, there were also found traces of another porphyrin, probably coproporphyrin I.

3. Formation of free coproporphyrin depends on the level of iron-ions in the nutrient. When the iron ions content exceeds 1  $\mu\text{g/ml}$  of nutrient, there appear only traces of free porphyrins. Free porphyrins attained the highest level at ionic iron concentrations not exceeding 0,1  $\mu\text{g/ml}$  of nutrient. Non-ionic iron contained in the casein hydrolysate, in amounts of up to 6.48  $\mu\text{g/ml}$ , has no effect on the synthesis of free porphyrins.

4. Amounts of biosynthesised coproporphyrin III are, within definite limits of ionic iron concentrations, in inverse proportion to the concentra-

tion of  $\text{Fe}^{++}$ . It was established that addition to the nutrient of one mole of iron (in the form of  $\text{Fe}^{++}$ ) causes a decrease of coproporphyrin III by almost 1 mole (i.e., 0.73 to 0.95 mole).

5. It was established that also cobalt, besides iron, inhibits the synthesis of free porphyrins by *Propionibacterium shermanii*, particularly in the presence of small quantities of iron.

6. Deficiency of iron in the nutrient, and the consequent formation of coproporphyrin III, in the presence of cobalt salts, has no inhibitory effect on the synthesis of cobalamins by *Propionibacterium shermanii*.

7. Among the cobalamins produced by *Propionibacterium shermanii*, there was found a new cobalamin like desnucleotidecyanocobalamin (vitamin  $\text{B}_{12p}$ , Factor B) as regards optical properties, but was more hydrophilic.

8. About 25 per cent of the cobalt added to the nutrient was found in the form of cobalamin compounds in the bacteria cells.

9. The role of cobalt in decreasing the production of coproporphyrin by *Propionibacterium shermanii* was discussed. The hypothesis was advanced that a common precursor, probably  $\delta$ -aminolevulinic acid, appears in the synthesis of both porphyrins and cobalamins.

10.  $\delta$ -aminolevulinic acid was found to be present in cultures of *Propionibacterium shermanii*.

11. A new spectrophotometric method was developed for determining porphyrins in centrifugates of bacteria cultures.

12. A new selective method was developed for detecting aminolevulinic acid in bacteria cultures.

Otrzymano 10.1.1956 r.



J. KOWALCZYK

**PROSTY APARAT DO ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ***Centralne Laboratorium Chemiczno-Bakteriologiczne P.S.K.**przy Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: mgr inż. Jerzy Kowalczyk*

Elektroforeza bibułowa, jako prosta i często stosowana metoda badania wielu substancji, w coraz większym stopniu staje się nieodzowną zarówno dla pracowni naukowych jak i usługowych. A zatem opracowanie odpowiedniego aparatu, prostego w konstrukcji i obsłudze, może mieć duże praktyczne znaczenie. Jednak prostota konstrukcji pod żadnym względem nie powinna niekorzystnie wpływać na przebieg badania. Opracowanie takiego aparatu było celem tej pracy. W czasie pracy postarano się uwzględnić zarówno dane literatury, jak i doświadczenia nabyte w czasie wykonywania setek badań dla klinik Akademii Medycznej w Gdańsku.

**I. Źródło prądu**

Jako źródło prądu stałego korzystnie jest stosować układ prostowni- czy, którego schemat przedstawiono niżej. Otrzymany prąd jest niemal dokładnie „wygładzony” (stały). Wbudowany potencjometr pozwala na regulowanie napięcia w sposób ciągły. Układ zasilany jest z sieci prądu przemiennego (220 V).

Stosowane niekiedy układy prostsze [13], [21] dają prąd tętniący, który, naszym zdaniem, podczas rozdziału niektórych substancji może mieć niekorzystny wpływ. Jak wykazała praktyka, stosowanie układów z napięciem stabilizowanym [22], [23], [25] jest na ogół niekonieczne. Układy takie są poza tym o wiele droższe. Niektórzy autorzy celowo niekiedy stosują układy o zmiennym napięciu, gdyż w ten sposób stabilizują prąd na pasku (1). W aparatach tego typu uzyskuje się bardzo korzystne, stałe warunki rozdziału (temperatura, parowanie).





lia, wiele rozpuszczalników organicznych), dają się bardzo łatwo obra-  
biać (ciąć, zginać, piłować, kleić, spawać), jest bardzo tani i łatwo dostęp-  
ny (w każdej Centr. Handl. Przem. Chem.).

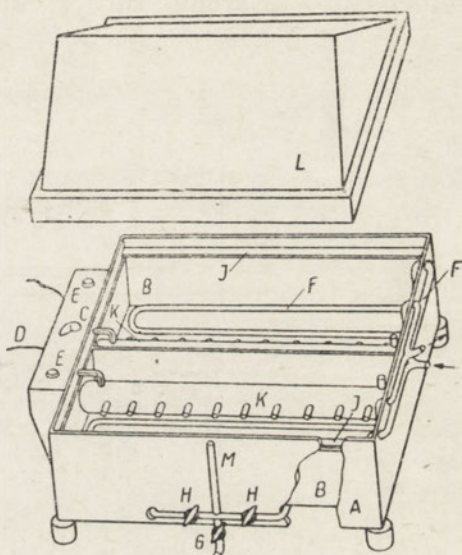
## 2. OGÓLNY OPIS KOMORY

Komora jest zbudowana z dwóch zasadniczych części (rys. 2): obudo-  
wy (A), o wymiarach  $36 \times 28 \times 15$  cm, ustawionej na nóżkach zamyka-  
nej pokrywą (L); połączonych ze  
sobą naczyń buforowych (B),  
wstawionych do obudowy, każde  
o wymiarach  $35 \times 13 \times 6,5$  cm.

Do obudowy przymocowane  
jest wyposażenie komory: skrzyn-  
ka z przełącznikiem (C), instalacja  
elektryczną (D) i sygnalizacyjną  
(E); rurki instalacji ogrzewniczej  
(F); krany: wylotowy (G) i po-  
ziomicowe (H); półeczki na ramki  
z paskami bibuły (I).

Obudowa spełnia zatem dwója-  
ką rolę: chroni wrażliwe części  
wyposażenia (F, G, H) od uszko-  
dzeń, oraz pozwala na swobodne  
umocowywanie części wyposaże-  
nia (np. wiercenie otworów) bez  
obawy nieuszczelnności, która istnia-  
łaby, gdyby wyposażenie przymo-  
cować bezpośrednio do naczyń z  
roztworem buforowym. Naczynia  
buforowe zawierają naczynia elek-  
trodowe (K). Są one połączone ze  
sobą rurką szklaną poprzez kra-  
ny (H). Umocowany na obudowie  
odcinek rurki (M) pokazuje po-  
ziom roztworu buforowego w na-  
czyniach. Całość tworzy zwartą

bryłę, o niewielkich rozmiarach, ustawną i wygodną w pracy. W stosun-  
ku do rozmiarów, komora mieści dużą ilość pasków bibuły (9 szt., każdy  
po 3 cm szeroki). W przeciwieństwie do niektórych typów komór [14],



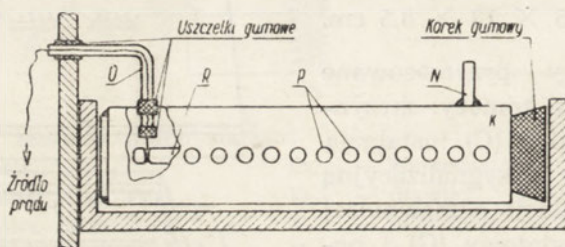
Rys. 2. Widok ogólny komory wilgotnej

- A — obudowa
- B — naczynia buforowe
- C — przełącznik
- D — przewody elektr.
- E — lampki sygnaliz.
- F — instalacja ogrzewn.
- G — kurek wylotowy
- H — kurki poziomicowe
- I — półki na ramki z bibułą
- K — naczynia elektrodowe
- L — pokrywa

[22], wszystkie paski z materiałem badanym znajdują się w identycznych warunkach. Jest to korzystne, ze względu na możliwość otrzymania wiele materiału porównawczego.

### 3. SYSTEM ELEKTRODOWY (INSTALACJA ELEKTRYCZNA)

Naczynia elektrodowe (K) wykonano z rur winidurowych o średnicy około 4,5 cm i długości 32 cm. Rury te z jednego końca szczelnie zamknięto przyspawaną płytką winidurową. Z drugiego końca zamknięto je korkiem gumowym. Korek ten opiera się silnie o ścianę w naczyniu buforowym i utrzymuje rurę w określonym położeniu (rys. 3).



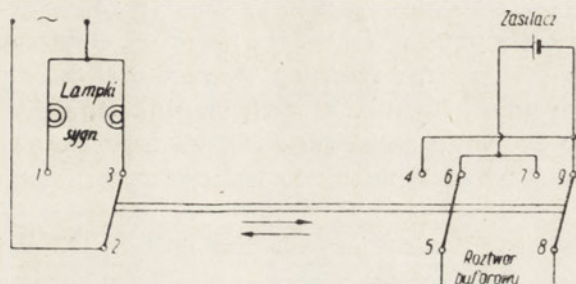
Rys. 3. Schemat naczynia elektrodowego  
 K — naczynia elektrodowe-rura winidurowa  
 N — rurka odprowadzająca gazy  
 O — rurka na przewody instalacji elektr.  
 P — rurki z ligniny  
 R — elektroda grafitowa

W górnej części naczyń elektrodowych wmontowano krótką rurkę szklaną (N), wystającą ponad poziom cieczy. Służy ona do odprowadzania gazów powstających w przestrzeni elektrodowej. Przy drugim końcu znajdują się zgięte rurki szklane (O), którymi wyprowadza się przewody instalacji elektrycznej poza komorę. Z boku naczyń elektrodowych zamontowano po 10 krótkich rurek szklanych (P) — ich przeznaczenie będzie później omówione.

Na elektrody użyto tanich, ogólnie stosowanych prętów grafitowych (R). Jednym końcem umocowano je w korku gumowym. Na drugim ich końcu zrobiono małe nacięcie i w tym miejscu owinięto elektrody drutem platynowym. Nacięcie zabezpiecza drut przed zsunięciem się z elektrody. Następnie, drut wyprowadzono przez rurki (O) z naczynia elektrodowego i przylutowano do drutu miedzianego, który jest połączony poprzez przełącznik (C) ze źródłem prądu stałego. Długie pręty grafitowe (po 32 cm) razem z zanurzonymi w roztworze buforowym odcinkami drutu platynowego dają elektrody o dość dużej powierzchni, co skutecznie zabez-



piecza je przed polaryzacją. Na trwałość roztworu buforowego korzystnie wpływa okresowa zmiana znaków elektrod np. przez zwykłe przełożenie wtyczki w gniazdku zasilacza. Jednak może to być niekiedy przyczyną pomyłek, gdyż materiał na ogół nakłada się w pobliżu jednego końca paska bibuły, zanurzonego w pobliżu elektrody o określonym znaku (katody lub anody). Pożądana jest zatem dobra orientacja w aktualnych w danej chwili znakach elektrod, tj. znajomość kierunku przesuwania się mate-



Rys. 4. Schemat przełącznika

riału badanego na pasku bibuły. W tym celu w przedstawionej komorze zainstalowano odpowiedni przełącznik elektryczny (C), który jednym ruchem gałki pozwala na zmianę znaków elektrod i równocześnie zapala światelko jednej z dwóch lampek sygnalizacyjnych (S). Zapalona lampka wskazuje określoną elektrodę (np. zawsze anodę). Lampki sygnalizacyjne (6 V) zasilane są z innego obwodu niż elektrody — prądem sieci 220 V poprzez transformatorek dzwonekowy. Schemat przełącznika podano na rys. 4. Przełącznik wbudowany jest z boku komory w obudowę winidurową, która zabezpiecza pracującego przed zetknięciem się z prądem (wysokie napięcie, prąd stały).

#### 4. SYSTEM BUFOROWY

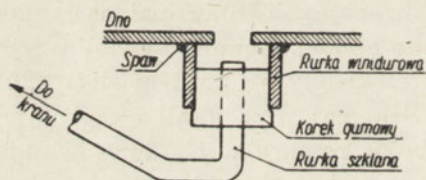
Naczynia buforowe mają dużą pojemność: razem z naczyniami elektrodowymi zawierają około 3600 ml roztworu buforowego. Uzyskuje się w ten sposób bardzo korzystne rozcieńczenie ubocznych produktów elektrolizy. Zmieniając roztwór buforowy co pewien czas, otrzymuje się warunki badania niemal takie same jak w komorach z ciągłą wymianą [1]. Sposób ten jest jednak tańszy od stosowania ciągłej wymiany. Poza tym do napełniania komór przy oznaczaniu białka w surowicy krwi stosujemy tani, rozcieńczony roztwór buforu boranowego (siła jonowa  $\mu = 0,05$ ) [1], [3], [27], zaś paski bibuły, przed nałożeniem materiału maczamy w roztworze buforu weronalowego (siła jonowa  $\mu = 0,1$ ). W ten sposób na pa-

sku bibuły uzyskujemy warunki podobne, do zalecanych przez niektórych autorów, stosujących bufor weronalowo-boranowy [3].

Dla oddzielenia produktów ubocznych wydzielających się na elektrodach w czasie trwania procesu elektroforezy, jak też dla usunięcia wpływu zanieczyszczeń z samego materiału elektrod, stosuje się różne systemy przegród półprzepuszczalnych między przestrzenią elektrodową, a pozostałą częścią komory. W omawianym aparacie użyto w tym celu krótkie rurki szklane (P) zawierające warstwę silnie ubitej ligniny. Warstwa ta bardzo dobrze zatrzymuje zanieczyszczenia: nie stanowi przy tym większego oporu dla prądu. W każdym naczyniu elektrodowym znajduje się po 10 rurek szklanych, o średnicy wewnętrznej 8 mm, zawierających 15 mm warstwę ubitej ligniny. W tych warunkach spadek napięcia wynosi 20 V, przy 250 V na zaciskach zasilacza (gdy stosowano wyżej wymieniony bufor, a napięcie mierzono woltomierzem lampowym o oporze wewnętrznym 9 M $\Omega$ ).

Zaletą stosowania ligniny jest również możliwość łatwej jej wymiany.

Celem uniknięcia ujemnego wpływu „procesów chromatograficznych” [4], [8], [25], powstających na pasku na skutek wytwarzania się lewaru, do wyrównywania poziomu cieczy służy przewód szklany łączący oba naczynia buforowe. Sposób umocowania przewodu w dnach naczyń podaje rys. 5.



Rys. 5. Sposób umocowania rurki w dnie komory

Rurka (M) zaopatrzona jest w znak, do którego napełnia się naczynia roztworem. W miarę wyparowywania roztworu ilość cieczy uzupełnia się wodą destylowaną. Pozwala to na ściśle kontrolowanie stężenia roztworu buforowego.

##### 5. UTRZYMANIE STAŁEJ TEMPERATURY I WILGOTNOŚCI

Celem otrzymania określonej temperatury i wilgotności łączy się rurki instalacji ogrzewniczej (F) z ultratermostatem Höpplera.

Między temperaturą roztworu a atmosferą komory ustala się stała różnica temperatur, którą należy uwzględnić przy nastawianiu ultrater-



mostatu. Ponieważ kondensująca się na pokrywie para wodna mogłaby, spadającymi kroplami zakłócić rozdział na bibule, powierzchnie pokrywy nachylone są pod kątem ok.  $50^\circ$  (rys. 2, L). Krople wody ściekają po pochylonych ścianach pokrywy, nie rozmywając badanej substancji.

#### 6. ZAWIESZANIE PASKÓW BIBUŁY

Z różnych sposobów zawieszania pasków bibuły jak: pionowy [12], [15], ukośny [29], w kształcie odwróconej litery „V” [4], [6], [18], [24], i poziomy [3], [8], [10], [11], [14], [16], [17], [20], [22], [25], [28], [30], — wybrano ten ostatni.

Kierowano się przy tym dwoma względami, a mianowicie tym, że przy zawieszaniu poziomym unika się wspomnianych „efektów chromatograficznych” [4], [8], [25], a także tym, że przerwa w dostawie prądu do sieci nie spowoduje zniszczenia materiału przez przesunięcie do środkowego punktu parowania oraz ewentualne zdenaturowanie białka surowicy na skutek zagęszczenia soli.

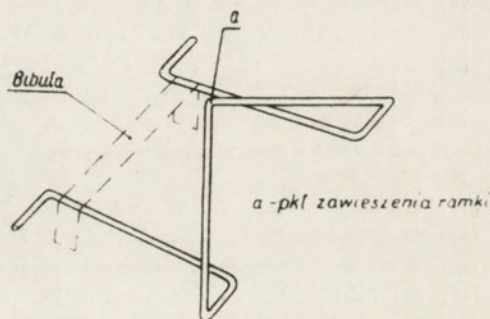
W przedstawionej komorze paski bibuły zawieszają się na ramkach, na których trzymają się one siłami adhezji. Kształt ramki podano na rys. 6.

Zmieniając proporcję wymiarów ramki można ją przystosować do pasków żądanej długości.

Zawieszanie bibuły na ramkach ma wiele zalet. W czasie nakładania materiału na bibułę komora jest zamknięta i doprowadza się ją do pożądanej temperatury. Następnie, na chwilę podnosi się pokrywę, ramkę z próbkami wkłada do komory i komorę znowu zamyka.

Duża pojemność cieczy o odpowiedniej temperaturze, oraz stosunkowo mała przestrzeń nad powierzchnią cieczy, powoduje szybkie ponowne nagrzanie (lub oziębienie) atmosfery wokół bibuły, do temperatury uprzednio nastawionej. Materiał badany przebywa wobec tego prawie cały czas w ściśle określonych warunkach wilgotności i temperatury.

Po zakończeniu procesu elektroforezy, paski bibuły razem z ramką wstawia się do suszarki, barwi (po uprzednim umocowaniu) i przemycza. Ramka jest tak wyważona, że po zawieszeniu w suszarce w punkcie „a” utrzymuje poziomą pozycję.



Rys. 6. Schemat ramki do zawieszania pasków bibuły

## Streszczenie

Podano szczegóły konstrukcyjnie prostego aparatu do elektroforezy bibułowej, składającego się z zasilacza prądu stałego i komory wilgotnej. Otrzymany prąd stały jest niestabilizowany. Komorę wybudowano z łątwo dostępczej i odznaczającej się wieloma zaletami masy polichlorowinyłowej — winidur. W aparacie można dowolnie regulować napięcie źródła prądu, temperaturę i wilgotność, szybkość parowania na pasku bibuły, długość pasków itd. Pozwala to na zastosowanie aparatu do oznaczania różnych substancji.

Aparat wypróbowano podczas wykonywania setek badań dla klinik Akademii Medycznej w Gdańsku.

## L I T E R A T U R A

- [1] Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York 1955.
- [2] Consden R., Stanier W. M., *Nature* **170**, 1069, 1952.
- [3] Consden R., Powell M. N., *J. Clin. Path.* **8**, 150, 1955.
- [4] Durrum E. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2948, 1950.
- [5] Durrum E. L., *Science* **113**, 66, 1951.
- [6] Flynn F. V., de Mayo P., *Lancet* **261**, 235, 1951.
- [7] Franglen G. F., Martin N. H., *Chem. a. Industry* **245**, 1954.
- [8] Franglen G. F., Martin N. H., Treherne J. D., *J. Clin. Path.* **8**, 144, 1955.
- [9] Grassmann W., Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.
- [10] Grassmann W., Hannig K., Knedel M., *Deutsche med. Wochenschrift* **76**, 333, 1951.
- [11] Grassmann W., Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.
- [12] Gräffits L. L., *J. Labor. Clin. Med.* **41**, 188, 1953.
- [13] Gurwicz A. E., *Laboratornoje Dielo* **3**, 1955.
- [14] Hardwicke J., *Biochem. J.* **57**, 166, 1954.
- [15] Heilmeyer L., Clotten R., Sano I., Sturm A. jr, Lipp A., *Kli. Wo.* **32**, 831, 1954.
- [16] v. Holt C., Voigt K. D., Gaede K., *Biochem. Z.* **323**, 345, 1952.
- [17] Łazarow N., *Laboratornoje Dielo* **9**, 1955.
- [18] Macheboeuf M., Rebeyrotte P., Dubert J. M., Brunerie M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 334, 1953.
- [19] Macheboeuf M., Dubert J. M., Rebeyrotte P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 346, 1953.
- [20] Moncke C., *Z. ges. inn. Med.* **11**, 523, 1953.
- [21] Oosterhuis H. K., *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 280, 1954.
- [22] Opplt J. J., Kutaček M., Loštický C. Čížimský J., *Cas. Lek. Česk.* **92**, 624 1953.
- [23] Ostrowski W., Mikucki A., *Acta Physiol. Polon.* **3**, 277, 1952.
- [24] Ostrowski W., Skarżyński B., *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 657, 1952.
- [25] Röttger H., *Z. ärztl. Fortbildung* **49**, 149, 1955.



- [26] Schneider G., Wunderly H., *Schw. med. Wochenschrift* 16, 445, 1952.  
[27] Wahab E. A., Adjutantis G., Laurence D. J. R., *Biochem. J.* 60, XIII, 1955.  
[28] Wieland Th., Fischer E., *Naturwiss.* 35, 29, 1948.  
[29] Wisznjakow A. P., Dobrowolskij D. S., Jermakow N. W., Tkaczinskij S. E., *Dokł. Ak. Nauk ZSRR* 87, 1035, 1952.  
[30] Volvius D., Verschüre J. C. M., *J. Clin. Path.* 8, 140, 1955.

## ПРОСТОЙ АППАРАТ ДЛЯ БУМАЖНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

### Резюме

Представлены конструктивные детали простого аппарата для электрофореза с применением фильтрационной бумаги; аппарат состоит из питателя постоянного тока и влажной камеры. Получается нестабилизированный постоянный ток. Камера построена из легко доступной, отличающейся многими достоинствами полихлорвиниловой массы — винидура. В аппарате можно, по желанию, регулировать напряжение источника тока, температуру и влажность, скорость испарения на полосе фильтрационной бумаги, длину полос и т.п. Это позволяет пользоваться аппаратом для определения различных веществ.

Аппарат был испытан при проведении сотен опытов для Медицинской Академии в Гданьске.

## A SIMPLE APPARATUS FOR PAPER ELECTROPHORESIS

### Summary

The paper describes construction details of a simple apparatus for paper electrophoresis; the apparatus consists of a d.c. generator and a moist chamber. The d.c. obtained is not stabilised. The chamber was made of winidur, a polychlorovinyl plastic easily available and endowed with many useful qualities. The apparatus permits an easy regulation of the current, of temperature and moisture in the chamber, of the rate of evaporation on the paper strip, of the length of the strip, etc. The apparatus is thus suitable for determining various substances.

The apparatus was tested in hundreds of analyses carried out for the Medical Academy in Gdańsk.

Otrzymano 19.1.1956





R. KLIMEK, B. SKARŻYŃSKI, T. W. SZCZEPKOWSKI

### BIOCHEMIA SAMOŻYWNYCH BAKTERII SIARKOWYCH III. CYTOCHROM W *THIOBACILLUS THIOPARUS*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie

Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Od czasu klasycznych badań Keilina [3] cytochromy a, b i c były przedmiotem niezliczonych dociekań, doprowadzających do względnie gruntownej znajomości ich roli biologicznej oraz własności fizycznych i chemicznych. Badania te z reguły przeprowadzane były nad cytochromami uzyskiwanymi z materiału pochodzenia zwierzęcego oraz cytochromami z drożdży. O egzystencji identycznych związków w świecie drobnoustrojów wnioskowano na podstawie widm absorpcyjnych, których charakter na ogół pokrywał się z cechami widmowymi cytochromów z drożdży i zwierząt.

W r. 1952 Davenport i Hill [1] stwierdzili, że w chloroplastach roślin zielonych występuje cytochrom, którego cechy spektralne podobne są do widm cytochromu c, jednak różne własności świadczą o tym, że jest on związkiem odmiennym, co spowodowało nazwanie go cytochromem f. W ostatnich latach Kamen i współpracownicy [2] stwierdzili, że w fotosyntetyzujących bakteriach (*Rhodospirillum rubrum*) oraz w chemosyntetyzujących drobnoustrojach (*Micrococcus denitrificans*, *Pseudomonas denitrificans*) występują cytochromy, których widma w świetle widzialnym cechują się położeniem głównych smug identycznych, lub bardzo zbliżonym do położenia smug absorpcyjnych cytochromu c z drożdży i z serca świńskiego. Okazało się jednak, że własności fizyczne i chemiczne tych cytochromów są odmienne od klasycznego cytochromu c. Niektóre z nich są samoutleniające i mają nieco wyższy potencjał oksydacyjno-redukcyjny niż klasyczny cytochrom c. Na podstawie swoich badań autorzy amerykańscy dochodzą do wniosku, że należy raczej mówić o grupie cytochromów c niż o jednolitym wspólnym wszystkim drobnoustrojom cytochromie tego typu. Do podobnych wniosków dochodzi Postgate [7], który wyosobnił z *Desulphovibrio desulphuricans*

cytochrom odmienny od klasycznego cytochromu c, nazywany przez tego autora cytochromem c<sub>3</sub>. Wreszcie ostatnio Keilin [4] wyosobnił z mięśnia sercowego oprócz typowego cytochromu c jeszcze jeden zbliżony do niego, ale odmienny, który nazwał cytochromem c<sub>1</sub>.

Badając swego czasu połączenia hematynowe występujące w samodzielnym bakteriach *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans* [9] stwierdziliśmy, że w *Th. thioparus* znajduje się tylko jeden cytochrom, którego widmo w świetle widzialnym było bardzo zbliżone do widma cytochromu c. Pragnąc bliżej określić charakter tego związku opracowaliśmy metodę jego wyosabniania, przy czym zachowanie się tego cytochromu wskazywało na to, że jest odmienny od cytochromu z mięśnia sercowego. Nie dawał się ekstrahować ze zmiażdżonych bakterii kwasem trójchlorooctowym lub buforem fosforanowym, natomiast przechodził w odpowiednich warunkach do acetonu. W toku dalszych naszych badań otrzymując cytochrom ten w stanie dalej posuniętej czynności, mogliśmy bliżej określić różne jego cechy przemawiające zdecydowanie za tym, że mamy do czynienia z nową odmianą cytochromu, różną zarówno od cytochromu f Davenporta i Hilla i od cytochromów opisanych przez Kamena i współpracowników. Proponujemy nazwać go cytochromem s (od sulphur), postępując według słusznej naszym zdaniem zasady wprowadzonej przez Keilina [3], który odróżnia poszczególne cytochromy literami alfabety. Zdaniem naszym, ten sposób oznaczania zdaje się być bardziej uzasadnionym, niż propozycja Scarisbricka [8], według której cytochromy winny być oznaczane nazwą organizmów, z których zostały wyodrębnione i położeniem smugi alfa.

## Metody

a) **Otrzymywanie materiału.** Bakterie *Th. thioparus* szczepiono na pożywkę o składzie podanym w poprzedniej pracy [9], zmodyfikowaną o tyle, że w miarę zakwaszania się pożywki, dodawano do niej co jakiś czas drobnymi porcjami wodorowęglan sodu. Hodowlę prowadzono w ciemności przez 6—8 dni, po czym sączono przez świecę Berkefelda, posługując się urządzeniem półautomatycznym. Odsączoną masę zawieszano w wodzie w wysokim cylindrze, pozwalając zawiesinie siarki opaść na dno naczynia, dekantując następnie płyn zawierający wolne od siarki bakterie. Z płynu tego oddzielono bakterie sącząc go ponownie przez świecę Berkefelda. W ten sposób z 300 l hodowli uzyskiwano — zależnie od warunków — 3—8 g wilgotnej masy bakteryjnej, zawierającej 18% masy suchej po wysuszeniu w temperaturze 100°. Chroniona przed obfitym dostępnym tlenu świeża zawiesina bakterii cechuje się barwą różową, uwa-



runkowaną obecnością zredukowanej postaci cytochromu. Po pewnym czasie zawiesina bakterii przybiera barwę szarą; temu stadium odpowiada rozkład cytochromu zawartego w komórkach, o czym świadczy zanik charakterystycznego widma. Dla uzyskania cytochromu należy więc poddawać przeróbce komórki bakteryjne świeże, wkrótce po oddzieleniu bakterii od pożywki.

**b) Badanie widma absorpcyjnego.** Badanie spektrometryczne przeprowadzono używając spektrometru rewersyjnego Hartridge'a, wzgl. nasadki spektroskopowej połączonej z mikroskopem (Leitz). Użycie tego sposobu pozwoliło badać drobne ilości materiału. Krzywą ekstynkcji wykreślono na podstawie pomiarów za pomocą spektrofotometru „Uvispec“.

**c) Potencjał oksydacyjno-redukcyjny** oznaczono metodą wskaźników. W rurce Thunberga umieszczano roztwór wskaźnika i cytochromu w buforze fosforanowym Sørensen'a o  $\text{pH} = 7$ . Po usunięciu powietrza wprowadzono przez ostrożny obrót zamknięcia rurki Thunberga rozcieńczony roztwór dwutioninu sodowego (DTN) redukującego zarówno roztwór wskaźnika, jak i cytochromu. Przy pomocy fotokolorymetru oznaczono stosunek postaci utlenionej wskaźnika do jego postaci zredukowanej, a jednocześnie obserwowano stopień redukcji cytochromu. Używając wskaźników o różnym znanym redoks-potencjale można było wyznaczyć potencjał, przy którym badany cytochrom występuje w 50% w postaci zredukowanej.

**d) Wydzielenie i oczyszczenie cytochromu z *Th. thioparus*.** Zastosowanie klasycznej metody wyciągania cytochromu kwasem trójchloroocetowym, podanej przez Keilina [5], lub opracowanej przez jednego z autorów metody opartej na użyciu rozc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [10] nie doprowadziło do pomyślnych wyników. Po szeregu prób ustalono sposób postępowania, pozwalającego na całkowite wydzielenie cytochromu z komórek bakteryjnych, które poniżej podajemy. Zaznaczyć jednak należy, że postępowanie to musi być dokładnie przestrzegane, gdyż już nawet drobne odchylenia wpływają niekorzystnie na wydajność metody.

Zawiesinę bakterii zawierającą w 100 ml wody około 6 g wilgotnej masy bakterii, wykazującą  $\text{pH}$  około 7—7,5, oziębia się do temperatury  $0^\circ$  i zadaje acetonem oziębionym do  $-20^\circ$ , w ilości równej  $1/8$  objętości zawiesiny oraz  $1/200$  objętości chloroformu, po czym wstawia do lodówki o temperaturze  $-20^\circ$ . W czasie dodawania acetonu zawiesinę miesza się starannie pręcikiem szklanym. Z chwilą gdy mieszanina wykaże zaczątki zamarzania dodaje się nową porcję acetonu ochłodzonego do temp.  $-20^\circ$ , w ilości równej poprzednio dodanej. Za trzecim razem dodaje się aceton w ilości równej  $1/4$  objętości pierwotnej zawiesiny, za czwartym razem znowu  $1/4$  objętości, a wreszcie uzupełnia zimnym acetonem, aż jego

ogólna objętość będzie odpowiadała 104% pierwotnej objętości zawiesiny bakterii. Po uzyskaniu tego stężenia acetonu pozostawia się mieszaninę w temperaturze  $-20^{\circ}$  na przeciąg 1—2 godzin mieszając ją od czasu do czasu.

Zawiesinę acetonową wylewa się niezbyt grubą warstwą na szalkę Petriego, wstawiając do niej zwinięty w cylindryczną rolkę arkusz bibuły chromatograficznej, wspierający się swym brzegiem o dno szalki Petriego. Całość trzyma się w otwartej przestrzeni w temperaturze możliwie nie przekraczającej  $10^{\circ}$ . Po kilku godzinach roztwór acetonowy wędruje dzięki włoskowatości na pewną wysokość arkusza bibuły, tracąc równocześnie z powodu parowania aceton. Front wędrującej na bibule i wysychającej cieczy zaznacza się czerwoną smugą cytochromu. Po wyparowaniu acetonu wycina się z bibuły zabarwiony na czerwono sektor i wmywa z niego cytochrom wodą destylowaną. Pozostałość znajdująca się na szalce Petriego poddaje się wirowaniu w wirówce kątowej przy szybkości 10 000 obr/min. Płyn pozostający nad osadem zawiera jeszcze pewną ilość cytochromu i powinien być poddany dalszym zabiegom w celu oczyszczania tej substancji.

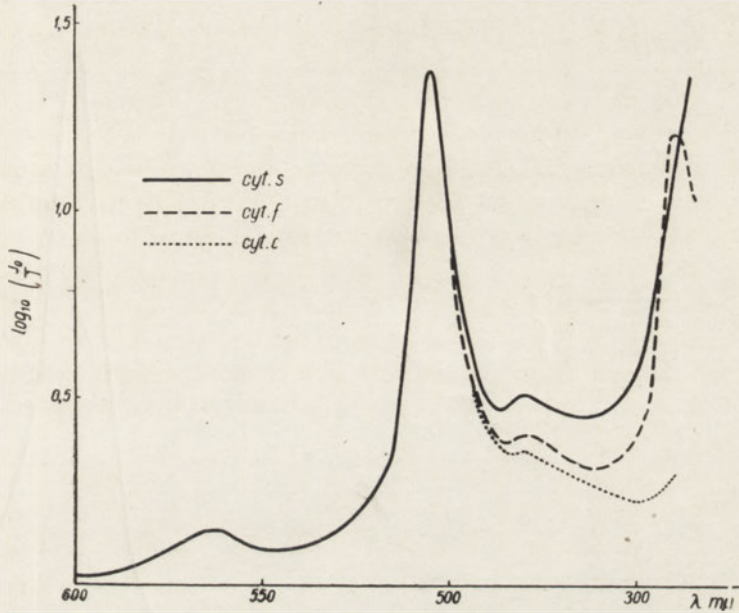
Próby oczyszczania wydzielonego w ten sposób cytochromu, oparte na użyciu adsorbentów nie doprowadziły do celu. W odróżnieniu od cytochromu *c* z mięśnia sercowego, cytochrom *Th. thioparus* nie adsorbuje się na traktowanym amoniakiem amberlicie ITC 50. Stosowana uprzednio przez jednego z nas metoda dla oczyszczania cytochromu *c* na permutycie [10] również zawiodła w tym przypadku. Procedura podana przez Keilina dla oczyszczania cytochromu *c*, nie mogła znaleźć zastosowania, gdyż cytochrom z *Th. thioparus* jest nietrwały, zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym. Najkorzystniejsze do oczyszczania tego cytochromu okazało się wysalanie siarczanem amonowym w stężeniu odpowiadającym 75—86% nasycenia. W tych warunkach wypada cytochrom jako czerwono-brunatny osad, który po rozpuszczeniu w małej ilości wody zostaje poddany jeszcze raz ponownemu wytrąceniu siarczanem amonowym. Roztwór cytochromu poddany wstępnemu oczyszczeniu siarczanem amonowym zostaje następnie siłą włoskowatości wciągnięty na wąski pasek chromatograficznej bibuły, z którego następnie oddziela się odciniek zabarwiony na czerwono i wypłukuje wodą destylowaną.

#### CECHY WIDMOWE CYTOCHROMU Z *TH. THIOPARUS*

Badany przez nas cytochrom jest związkami samoutleniającym i roztwór jego przy dostępie tlenu wykazuje tylko smugę absorpcyjną około 556 m $\mu$ . Po dodaniu DTN lub siarkowodoru pojawia się nowa intensywna smuga absorpcyjna, odpowiadająca długości fali 551 m $\mu$ . Smuga ta jest



więc przesunięta o  $1 \text{ m}\mu$  w kierunku czerwieni w porównaniu ze smugą zwierzęcego cytochromu c. Zaznaczyć jednak należy, że ta intensywna smuga zredukowanego cytochromu w nierozłożonych komórkach bakte-



Rys. 1. Rozkład ekstynkcji w widmach ferricytochromu s, ferri-cytochromu f i ferricytochromu c

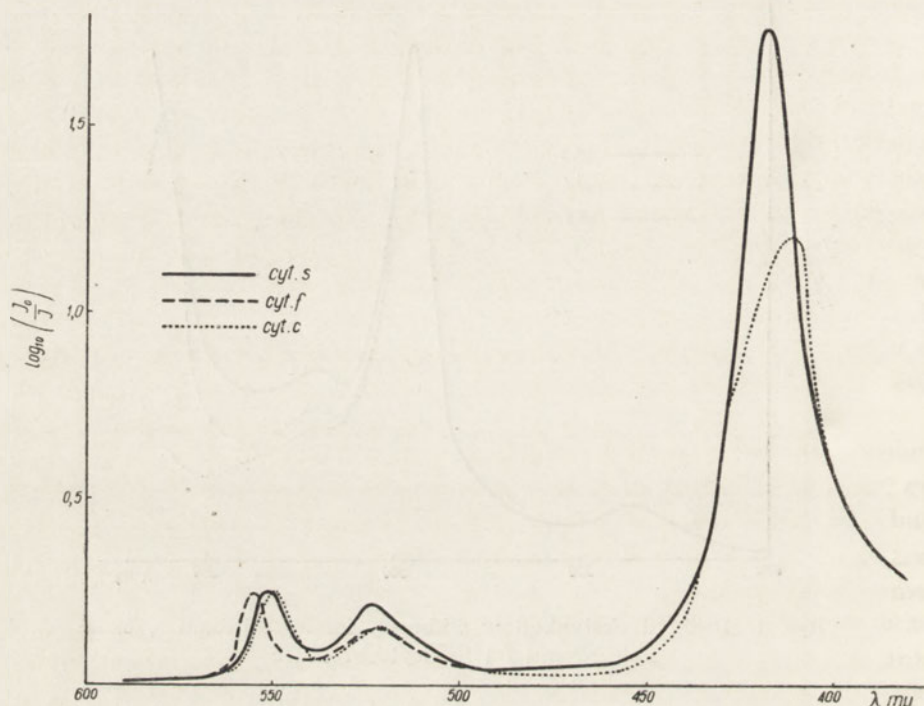
ryjnych przypada na długość fali  $552 \text{ m}\mu$ . Należy więc przypuścić, że cytochrom występuje w komórkach bakteryjnych w postaci jakiegoś kompleksu, który zmienia nieznacznie położenie jego smugi absorpcyjnej. Oprócz powyżej omówionej smugi w widmie zredukowanego cytochromu, występuje jeszcze słabsza smuga przy  $526 \text{ m}\mu$ . Rozkład ekstynkcji w widmie cytochromu utlenionego i zredukowanego przedstawiają rys. 1 i 2. Dla porównania naniesiono na rysunki te, krzywe obrazujące rozkład ekstynkcji dla zwierzęcego cytochromu c i cytochromu f.

#### INNE WŁAŚNOŚCI CYTOCHROMU Z *TH. THIOPARUS*

Badany przez nas cytochrom ulega redukcji nie tylko w obecności DTN i  $\text{H}_2\text{S}$ , ale również w obecności kwasu askorbinowego. Tiosiarczan nie redukuje tego cytochromu. Widmo zredukowanego cytochromu nie zmienia się po zadziałaniu tlenkiem węgla. Roztwór utlenionego cytochromu po zadziałaniu NO w warunkach beztlenowych wykazuje widmo

dwusmugowe o położeniu smug identycznym z widmem cytochrom c — NO, tzn. 563 i 530 m $\mu$ .

Przy zastosowaniu powyżej już opisanej metody dla oznaczania redoks-potencjału cytochromu z *Th. thioparus*, redukcja tego cytochromu



Rys. 2. Rozkład ekstynkcji w widmach ferrocytochromu s, ferrocytochromu f i ferrocytochromu c

nie następowała w zakresie uchwytnym dla 2,6-dwuchlorofenylo-indo-fenolu ( $E_0 = +0,217$ ), natomiast występowała w górnym zakresie błękitu toluidynowego ( $E_0 = +0,115$ ). Ekstrapolowany normalny potencjał oksydacyjno-redukcyjny cytochromu z *Th. thioparus* wyznaczono na  $E_0 = +0,14 - 0,15$  v (dla cyt. c + 0,26, cyt. f + 0,35 v) (pH = 7).

### Omówienie wyników

Otrzymany z *Th. thioparus* związek barwny wykazuje tak oczywiste własności charakterystyczne, jak np. widmo w postaci utlenionej i zredukowanej, smuga Soreta itd., iż nie ma wątpliwości z określeniem go jako połączenie hematynowe i to należące do typu cytochromów. Położenie smug absorpcyjnych i widmo połączenia tego związku z NO wykazują



bardzo daleko idące podobieństwo zarówno z cytochromem *c*, jak i z cytochromem *f*. Niemniej istnieją wyraźne różnice, świadczące o tym, że badany cytochrom jest związkiem odmiennym od wyżej wymienionych znanych już cytochromów. Dlatego zdecydowaliśmy się opisać go jako nowy cytochrom, nazwany przez nas *cytochromem s* (od sulphur).

Smuga  $\alpha$  cytochromu z *Th. thioparus* przypada na długość fali 551 m $\mu$ , podczas gdy ta smuga dla cytochromu *c* z drożdży i z mięśni zwierzęcych przypada na 550 m $\mu$ , a dla cytochromu *f* z chloroplastów na 555 m $\mu$ . Smugi Soreta cytochromu *s* i cytochromu *f* pokrywają się ze sobą, podczas gdy smuga Soreta dla cytochromu *c* jest nieco przesunięta w kierunku fal krótszych. Stosunek wysokości smugi Soreta postaci zredukowanej cytochromu, do jego smugi  $\alpha$  wynosi dla cytochromu *f* — 7, dla cytochromu *c* — 5,1 a dla cytochromu *s* — 7.

W odróżnieniu od cytochromu *c* cytochrom *s* nie daje się wyciągać z tkanki bezpośrednio roztworem kwasu trójchlorooctowego lub siarkowego, natomiast zostaje ekstrahowany acetonem, który nie wyciąga z komórek cytochromu *c*. Zaznaczyć również należy, że cytochrom *f*, dający się ekstrahować etanolem zostaje z roztworu etanolowego przez aceton wytracony. W odróżnieniu od cytochromu *c*, cytochrom *s* ulega wysoleńniu siarczanem amonowym przy 75—86% nasycenia. Wreszcie w odróżnieniu od cytochromu *c*, cytochrom *s* ulega rozkładowi w kwaśnym i zasadowym rozczywie.

Szczególnie wybitną cechę cytochromu *s* stanowi jego samoutlenialność, której nie wykazują przy tym zakresie pH zarówno cytochrom *c*, jak i cytochrom *f*. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny cytochromu *s* = + 0,14 v jest wyraźnie niższy od tego potencjału cytochromu *c* (+ 0,26 v) i cytochromu *f* (+ 0,35 v).

Po przeprowadzeniu ekstrakcji cytochromu *s*, z komórek *Th. thioparus* w sposób powyżej opisany, pozostałość poekstrakcyjna nie wykazuje już widma tego związku, co świadczy o tym, że ekstrakcja zostaje przeprowadzona całkowicie, lub co najmniej w znacznym stopniu. Gdyby można było oznaczyć molarne stężenie cytochromu *s* w znanej objętości wyciągu, wówczas możliwe byłoby określenie jego stężenia w komórkach bakteryjnych. Zadanie to można rozwiązać opierając się na dopuszczalnych założeniach. Wiadomo, że ekstynkcyjność molarna smugi  $\alpha$  cytochromu *c* i cytochromu *f* posiada tę samą wartość, z czego wynika, że wartość ekstynkcyjności dla tego typu połączeń od komponenty białkowej, ale od obecności odpowiednio związanej żelazoporfiryny. Ponieważ cytochrom *s* wykazuje wielkie podobieństwo zarówno do cytochromu *c*, jak i do cytochromu *f*, w pełni uzasadnione będzie przypuszczenie, że wartość ekstynkcyjności molarnej smugi  $\alpha$  tego cytochromu będzie identyczna z analogicznymi wartościami dla cytochromów *c* i *f* ( $28, 2 \times 10^3$ ). Oczywiście musimy jed-

nak przyjąć, że w przypadku cytochromu s tylko jedna żelazoporfiryna przypada w nim na jedną cząsteczkę białka.

Opierając się na powyższych założeniach obliczyliśmy na podstawie pomiarów ekstynkcji, że z 1222 mg suchej masy bakterii wyekstrahowano  $2,6 \times 10^{-10}$  mola cytochromu s. W jednej z poprzednich prac [6] obliczyliśmy, że sucha masa jednej komórki *Th. thioparus* wynosi  $0,15 \times 10^{-9}$  mg, a zatem w 1222 mg znajduje się  $81 \times 10^{11}$  komórek. Zawartość cytochromu s w jednej komórce winna wynosić 19 000 cząsteczek.

Autorzy dziękują kierownictwu Ekspertyz Sądowych w Krakowie i jego pracownikowi mgr Markiewiczowi za umożliwienie przeprowadzenia oznaczeń na spektrofotometrze „Uvispec”.

### Streszczenie

Przedstawiono sposób otrzymywania cytochromu z *Thiobacillus thioparus*. Stwierdzono, że cytochrom wyizolowany z *Th. thioparus* i w odpowiedni sposób oczyszczony wykazuje pewne wspólne cechy z cytochromami c i f, jest jednak od nich zasadniczo odmienny. Dla nowego rodzaju cytochromu zaproponowano nazwę cytochrom s. Badając własności spektralne stwierdzono, że położenie smugi alfa ferrocycyochromu s zbliżone jest do położenia smugi  $\alpha$  ferrocycyochromu c, natomiast stosunek ekstynkcji smugi  $\alpha$  do ekstynkcji smugi Soretta jest dla cytochromu s identyczny jak dla cytochromu f. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny cytochromu s różni się od potencjałów redoksy zarówno cytochromu c jak i cytochromu f.

### L I T E R A T U R A

- [1] Davenport H. E., Hill R., *Proc. Roy. Soc. London*, **139B**, 346, 1952.
- [2] Kamen M. D., Vernon L. P., *Bioch. et Bioph. Acta* **17**, 10, 1955.
- [3] Keilin D., *Proc. Roy. Soc. London*, **98B**, 312, 1925.
- [4] Keilin D., Hartree E. F., *Nature* **176**, 200, 1955.
- [5] Keilin D., Hartree E. F., *Biochem. J.* **41**, 500, 1947.
- [6] Ostrowski W., Skarżyński B., Szczepkowski T. W., *Acta Microbiol. Polonica* **3**, 351, 1954.
- [7] Postgate J., *Bioch. et Bioph. Acta* **18**, 427, 1955.
- [8] Scarisbrick R., *Ann. Rep. Progress Chem.* **44**, 226, 1947.
- [9] Szczepkowski T. W., Skarżyński B., *Acta Microbiol. Polonica* **1**, 93, 1952.
- [10] Szczepkowski T. W., *Acta Biochim. Polonica* **2**, 169, 1955.



БИОХИМИЯ АВТОТРОПНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ; III. ЦИТОХРОМ  
В *THIOBACILLUS THIOPARUS*

Резюме

Представлен способ получения цитохрома из *Thiobacillus thioparas*. Обнаружено, что цитохром, выделенный из *Th. thioparas* и соответственным образом очищенный проявляет некоторые общие свойства с цитохромами *c* и *f*, отличаясь однакоже от них коренным образом. Для новго рода цитохрома предложено новое название — цитохром *s*. При изучении спектральных свойств обнаружено, что положение полосы альфа ферроцитохрома *s* приближается к положению полосы  $\alpha$  ферроцитохрома *c*, тогда как соотношение исчезновения полосы  $\alpha$  к исчезновению полосы Сорета для цитохрома *s* аналогично с положением цитохрома *f*. Окислительно восстановительный потенциал цитохрома *s* отличается от потенциала восстановления как для цитохрома *c*, так и для цитохрома *f*.

BIOCHEMISTRY OF AUTOTROPHIC SULPHURIC BACTERIA

Summary

This work describes the method of obtaining cytochrome from *Thiobacillus thioparas*. It was ascertained that cytochrome isolated from *Th. thioparas* and properly purified has certain features equally common to cytochromes *c* and *f*, yet, it essentially differs from them. For the new kind of cytochrome, the name of cytochrome *s* is proposed. The investigation into spectral properties showed that the position of the alpha band of ferrocytochrome *s* is similar to the position of the alpha band of ferrocytochrome *c*, while the relation between the extinction of the Soret's band and the extinction of the  $\alpha$  band is identical in cytochrome *s* and cytochrome *f*. The oxidation-reduction potential of cytochrome *s* differs from the redox potentials of both cytochrome *c* and cytochrome *f*.

Otrzymano 21.1.1956

# PROPERTIES OF AUTOTROPHIC SULFURIC BACTERIA

The work described in this paper is a continuation of the work of the author in the field of autotrophic sulfuric bacteria. In the previous paper (1) the author has reported on the isolation and characterization of a new strain of autotrophic sulfuric bacteria, designated as *Sulfolobus* sp. This strain was found to be distinct from the other strains of autotrophic sulfuric bacteria which have been described in the literature. The present paper reports on the properties of this strain, including its growth characteristics, its ability to utilize sulfur as a source of energy, and its sensitivity to various environmental factors.

The strain of *Sulfolobus* sp. was isolated from a hot spring in the volcanic region of the island of Hawaii. It was found to be a Gram-negative, rod-shaped bacterium which grows in a sulfur-rich medium. The organism is able to utilize elemental sulfur as a source of energy and carbon dioxide as a source of carbon. It is able to grow at a temperature of 70°C and at a pH of 2.0. The organism is highly resistant to various environmental factors, including high temperatures, low pH, and high concentrations of sulfur.

The growth characteristics of *Sulfolobus* sp. were studied in detail. It was found that the organism grows best in a sulfur-rich medium. The rate of growth is highest at a temperature of 70°C and at a pH of 2.0. The organism is able to grow in the presence of high concentrations of sulfur, and it is highly resistant to various environmental factors, including high temperatures, low pH, and high concentrations of sulfur.

The ability of *Sulfolobus* sp. to utilize sulfur as a source of energy was studied in detail. It was found that the organism is able to utilize elemental sulfur as a source of energy and carbon dioxide as a source of carbon. The rate of growth is highest when the organism is grown in a sulfur-rich medium. The organism is able to grow in the presence of high concentrations of sulfur, and it is highly resistant to various environmental factors, including high temperatures, low pH, and high concentrations of sulfur.

The sensitivity of *Sulfolobus* sp. to various environmental factors was studied in detail. It was found that the organism is highly resistant to various environmental factors, including high temperatures, low pH, and high concentrations of sulfur. The organism is able to grow at a temperature of 70°C and at a pH of 2.0, and it is able to grow in the presence of high concentrations of sulfur.

## REFERENCES

1. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 1 (1953).

2. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 2 (1953).

3. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 3 (1953).

4. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 4 (1953).

5. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 5 (1953).

6. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 6 (1953).

7. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 7 (1953).

8. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 8 (1953).

9. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 9 (1953).

10. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 10 (1953).

11. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 11 (1953).

12. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 12 (1953).

13. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 13 (1953).

14. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 14 (1953).

15. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 15 (1953).

16. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 16 (1953).

17. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 17 (1953).

18. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 18 (1953).

19. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 19 (1953).

20. W. J. van der Meer, *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 20 (1953).



A. NARĘBSKA I W. MACKOWSKI

## WYMIANA JONÓW SODOWYCH, POTASOWYCH I WAPNIOWYCH NA WOFATYCIE P W ROZTWORACH ZBLIŻONYCH SKŁADEM JONOWYM DO SOKÓW TRAWIENNYCH CZŁOWIEKA

*Z Zakładu Chemii Fizycznej Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu  
Kierownik Zakładu: prof. dr A. Basiński*

Reakcje wymiany przebiegające pomiędzy wymienniczem a jonami roztworu zależą od własności wymiennicza i rodzaju jonów wymienianych.

Na własności wymiennicza wpływa charakter grup funkcyjnych, liczba tych grup na jednostkę masy lub objętości, stopień usieciowania przestrzennego, związana z tym skłonność do pęcznienia i inne. Zdolność wymienna jonitu, będąca cechą podstawową i najbardziej charakterystyczną, jest funkcją wymienionych własności i stężenia roztworu, z którym wymiennicz reaguje.

Z roztworu wodnego o małym stężeniu jonów izowartościowych, wymiennicz nie posiadający własności selektywnych w stosunku do żadnego z występujących jonów zaadsorbuje<sup>1)</sup> przede wszystkim jony o największym promieniu. W tych samych warunkach, z roztworu zawierającego jony o zbliżonych promieniach i różnych wartościowościach, wymiennicz nie posiadający własności selektywnych zaadsorbuje przede wszystkim jony o najwyższej wartościowości [7]. Zależności te Jenny i Giedroic tłumaczą różnicami w stopniu hydratacji jonów, a Gregor, Boyd i inni różnicami we współczynnikach aktywności jonów w fazie jonitu [1, 3, 4, 5].

Im silniejsze jest pole elektrostatyczne jonu tym silniej wiążą go przeciwnie naładowane jony wymiennicza. Równocześnie jednakże jony o małych promieniach i silnych polach ulegają hydratacji w znacznie większym stopniu niż jony o dużych promieniach i słabych polach. Wynika stąd, że zdolność reagowania z wymienniczem jest zależna nie od promie-

<sup>1</sup> Przez określenie „adsorpcja” należy rozumieć adsorpcję jonowymienną.

nia rzeczywistego jonu, a od promienia jonu uwodnionego, tzw. hydrodynamicznego, przy czym zależność jest tego rodzaju, że im większy promień hydrodynamiczny tym mniejsza „energia wejścia jonów do jonitu”<sup>2</sup>). Podaną teorię wydają się potwierdzać badania Giedroica nad zależnością „energii wejścia jonów do jonitu” od ciężaru atomowego jonów [3] i badania J e n n y nad zależnością „energii wejścia” od hydrodynamicznego promienia jonu [5].

Według interpretacji Gregora i Boyda wpływ na różnice w „energii wejścia jonów do jonitu” posiadają współczynniki aktywności jonów w fazie jonitu. Teorii tej poświęca się ciągle jeszcze wiele prac, a ostatnio znalazła ona powiązanie z teorią Debye’a — Hückela.

Z różnic we własnościach jonów i z podanych zależności wynika, że z roztworu ekwimolarnego trzech jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{++}$ , których promienie wynoszą (7):

	promień jonu nieuwodnionego	promień jonu uwodnionego
$\text{Na}^+$	0,98 Å	7,9 Å
$\text{K}^+$	1,33 Å	5,3 Å
$\text{Ca}^{++}$	1,17 Å	9,6 Å

wymieniacz zaadsorbuje najwięcej jonów wapniowych, mniej potasowych i najmniej sodowych. Co więcej, jak wskazują pomiary, z roztworu zawierającego jony sodowe i wapniowe w stosunku 10 : 1 wymieniacz zaadsorbuje je w stosunku, w przybliżeniu, 2 : 1, co oznacza, że wymiana jest przesunięta na korzyść jonów wapniowych nawet wtedy, gdy występują w niewielkim stężeniu w stosunku do stężenia jonów sodowych. W podobny sposób, chociaż w mniejszym stopniu, wymiana przesunięta jest na korzyść jonów potasowych w stosunku do sodowych.

Istnieją jednak przypadki, w których zależy na tym ażeby usunąć z roztworu jak najwięcej jonów sodowych i nie zmienić, lub jak najmniej zmienić stężenie jonów potasowych i wapniowych. Zachodzi to np. przy leczeniu obrzęków za pomocą wymieniaczy jonowych. I mimo, że usuwanie jonów sodowych bez zmniejszania stężeń jonów potasowych i wapniowych wydaje się bardzo trudne, korzystne własności jonitów takie jak:

<sup>2</sup> Termin ten, chociaż dość popularny w publikacjach poświęconych jonitom, nie jest ogólnie przyjęty. W literaturze angielskiej spotyka się często określenia: „the exchange potential”, lub „ionic exchange affinity”, (przy czym Boyd uważa, że powinowactwo to może być mierzone swobodną energią tworzenia —  $\Delta F$ ), a w języku rosyjskim: „ionoobmiennee sredstvo”, „obmiennyj potencjał”, albo „otnositielnaja energia obmiena”. W języku polskim w tej chwili wydaje się być przyjętym termin „energia wymienna”, chociaż budzi on poważne zastrzeżenia.



nierozpuszczalność, trwałość, nietoksyczność, skłoniły wielu badaczy do podjęcia prób rozwiązania tego zagadnienia.

Mniej więcej przed pięciu laty wprowadzono wymiennicze jonowe do spisu leków jako środki stosowane przy nadkwasocie żołądka, wrzodach dwunastnicy i ostatnio przy leczeniu obrzęków spowodowanych niewydolnością krążenia. Powodem występowania obrzęków jest między innymi nadmierne zatrzymywanie jonów sodowych w organizmie [9]. Ujmując zagadnienie z punktu widzenia fizyko-chemii można przypuszczać, że wzrost stężenia elektrolitów w płynach tkankowych pozanaczyniowych, w których gromadzą się jony sodowe, powoduje wzrost ciśnienia onkocznego osocza skutkiem przesączenia się płynów osocza do tkanek. W efekcie ostatecznym daje to puchlinę, która u osób ciężko chorych może sięgać do kilkunastu procent wagi ciała. Jest zrozumiałe, że podany obraz powstawania puchliny jest ogromnie uproszczony.

Ponieważ powodem bezpośrednim występowania puchliny jest jon sodowy, zatem pierwsze rozwiązanie, jakie samorzutnie nasunęło się lekarzom to — dieta bezsolna. Lecz zaburzenia chorobowe prowadzące do obrzęków mają z reguły charakter przewlekły i rygorystyczne stosowanie diety bezsolnej w ciągu lat jest praktycznie niewykonalne. Wśród różnorodnych leków, jakie z większym lub mniejszym powodzeniem stosowano i stosuje się nadal w leczeniu obrzęków, jako ostatnie pojawiły się wymiennicze jonowe. Dały one dobre rezultaty, lecz stosowanie ich budzi pewne zastrzeżenia. Chodzi o to, że prócz jonów sodowych, które w sokach trawiennych zawarte są w stężeniu średnio 140 mval/l, występują jeszcze jony potasowe 5 mval/l, wapniowe 5 mval/l, magnezowe, żelazowe, miedziowe, cynkowe i aminokwasy w ilościach mniejszych. Wszystkie te substancje wiązane są przez wymiennicze i razem z jonami sodowymi opuszczają organizm [2]. O ile usuwanie jonów sodowych jest pożądane, o tyle usuwanie pozostałych jonów i związków jest szkodliwe. Co do jonów magnezowych, żelazowych, cynkowych i miedziowych wiadomości są niepewne, a raczej niesprawdzone, natomiast wiadome jest, że nadmierne usuwanie jonów potasowych, które w konsekwencji może doprowadzić do objawów niedoboru potasu, wywołuje stany apatii, osłabienia mięśni i arytmii serca. Niedobór jonów wapniowych spowodowany stałym usuwaniem przez wymiennicze, może stać się powodem objawów tężyzki i odwapnienia układu kostnego.

Powstaje więc problem jak przygotować i w jakiej formie podawać wymiennicze jonowe, ażeby spełnić warunek zasadniczy: usunąć jony sodowe i nie zmienić stężenia jonów potasowych i wapniowych, aby przy jak największym oddziaływaniu korzystnym działanie szkodliwe było jak najmniejsze.

Próbowi rozwiązania tego zagadnienia poświęcona jest niniejsza praca.

## Część doświadczalna

### 1. CHARAKTERYSTYKA UKŁADÓW WYMIENNYCH

Ponieważ prototypem układów badanych jest przewód pokarmowy człowieka nie tylko rodzaj, ale i stężenie jonów jest ściśle określone. Soki trawienne rozcieńczone treścią pokarmową zawierają:

NaCl — około 5 g/l albo — 85,5 mval/l.

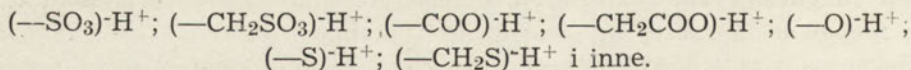
KCl — „ 0,7 g/l „ — 9,4 mval/l.

CaCl<sub>2</sub> — „ 0,4 g/l „ — 7,2 mval/l.

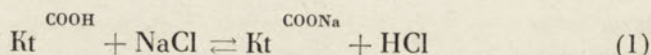
Kwasowość soków trawiennych posiada różną wartość w różnych odciśnięciach przewodu pokarmowego. pH soku żołądkowego waha się w granicach 1,8—2,2, podczas gdy sok jelitowy jest słabo alkaliczny. Zmianom pH od 1,8 do 8,0 odpowiadają zmiany stężenia jonów wodorowych od  $1,58 \cdot 10^{-2}$  g/l do  $10^{-8}$  g/l, co w przeliczeniu na kwas solny wynosi 0,57 g/l przy pH 1,8 i  $3,6 \cdot 10^{-7}$  g/l przy pH 8,0. Nie ulega wątpliwości, że jony wodorowe, występujące w takich stężeniach jak w soku żołądkowym, biorą udział w reakcji wymiany i wywierają wpływ na stan równowagi. Z drugiej strony zdolność wymienna wymienniczy jonowych zależy od wartości pH roztworu. Wobec tak wyraźnego wpływu w badaniach należało uwzględnić wpływ pH na równowagi wymienne. Było to tym bardziej konieczne, że wprowadzany wymienniczy występuje w formie kwasowej i podczas wymiany wysyła jony wodorowe do roztworu, zmieniając stężenie występujących tam jonów.

### 2. CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH WYMIENIACZY JONOWYCH

Wymiennicze kationowe posiadają następujące grupy kwasowe wbudowane w makrocząsteczkę wymiennicza:



Kationity, w których występują grupy sulfonowe  $(-\text{SO}_3)\text{-H}^+$  i metyleno-sulfonowe  $(-\text{CH}_2\text{SO}_3)\text{-H}^+$  mają charakter silnie kwasowy, a więc zdolne są do wymiany w silnie kwaśnym środowisku żołądka. Kationity o grupach karboksylowych  $(-\text{COO})\text{-H}^+$  jako słabo kwasowe wymieniają tylko w roztworach obojętnych i alkalicznych, wobec czego zakres ich działania ograniczony jest do jelit. Niektórzy autorzy twierdzą, [10] że reakcja:





w praktyce nigdy nie zachodzi ze względu na wydzielanie się mocnego kwasu, który cofa dysocjację grupy kwasowej kationitu. Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak, że reakcja ta zachodzi z małą wydajnością. Kationitom z grupami fenolowymi ( $-\text{O})\text{-H}^+$  poświęcono dotychczas stosunkowo niewiele prac, wiadome jest tylko, że grupy  $(\text{O})\text{-H}^+$  wymieniają w środowiskach alkalicznych.

Grupy kwasowe  $(-\text{COO})\text{-H}^+$  wykazują szczególnie duże powinowactwo do jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  [6], co wywołane jest tworzeniem się kompleksów słabo dysocjujących, lub związków o małej rozpuszczalności. Stąd, przy zastosowaniu wymienniaczy z grupami karboksylowymi, byłoby szczególnie trudno zmniejszyć straty wapnia. Zaletą karboksylowych wymienniaczy jonowych w stosunku do sulfonowych jest ich dwukrotnie, lub trzykrotnie większa zdolność wymienna; prawdopodobnie dlatego też były one i są stosowane.

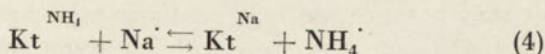
Prócz rodzaju pozostaje jeszcze zagadnienie doboru formy wymienniaczy. Niektórzy lekarze klinicyści [2] zalecają stosowanie wymienniaczy tylko w formie amonowej, lub zawierających do 80% formy amonowej. Wywołuje to pewne zastrzeżenia. Przede wszystkim w wyniku reakcji wymiany pomiędzy wymienniaczem a jonami wodorowymi kwaśnego soku żołądkowego wydziela się chlorek amonowy i to w tym większych ilościach im większa jest zdolność wymienna jonitu i im większa dawka dobową. Np. przy zastosowaniu wymienniacza o zdolności wymiennej 5 mval/g w ilości 50 g dziennie może się wydzieląć do 13 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Tymczasem według J. Roguskiego [8]: „Do powstawania kwasicy doprowadzić może stosowanie w nadmiernej ilości chlorku amonowego. Umiarkowane dawkowanie chlorku amonowego (do 3 g na dobę) rzadko sprowadza kwasicę, dawki większe natomiast wywołują kwasicę...”

Z porównania „energii wejścia jonów do jonitu“ podanych przez Giercica [3] wynika, że jon amonowy posiada „energię wejścia“ mniejszą od jonów wapniowych i potasowych, ale większą od jonów sodowych:

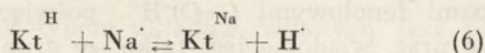
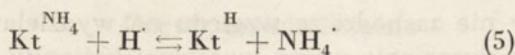
$$\text{Ca}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ \quad (2)$$

$$10,2 > 6,8 > 6,5 > 4,5 \quad (3)$$

Z tego powodu bezpośrednia wymiana jonu amonowego na sodowy w myśl reakcji:



jest wysoce utrudniona i przebiega z bardzo małą wydajnością, natomiast może przebiegać w dwóch etapach:



Jeżeli reakcja [5] zajdzie do końca, otrzymujemy kationit w formie wodorowej i nadmierne ilości chlorku amonowego; jeżeli zaś zajdzie częściowo — umiarkowane ilości chlorku amonowego, ale przy tym część kationitu w formie nieprzydatnej do usuwania jonów sodowych.

Tak więc jest niepożądane stosowanie wymiennicy tylko w formie amonowej, natomiast wskazane stosowanie wymiennicy z pewną ilością jonów amonowych, a mianowicie taką, która dawałaby w wyniku wymiany do 3 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na dobę.

Ze względu na charakter i dostępność wybraliśmy do pomiarów wofaty P — kationit dwufunkcyjny posiadający według Houwinka grupy  $(-\text{SO}_3)^-\text{H}^+$  i  $(-\text{O})-\text{H}^+$ , a według Stach'a grupy  $(-\text{SO}_3)^-\text{H}^+$  i  $(-\text{COO})-\text{H}^+$ . Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak, że wofaty P jest kationitem fenoloformaldehydowym i zawiera grupy sulfonowe i fenolowe. Całkowita zdolność wymienna wynosi 2,8 mval/g, a w środowiskach kwaśnych 1,4 mval/g. Do pomiarów wofaty P przygotowano w formie wodorowej.

### 3. METODYKA PRACY

#### a. Opis metody

Najczęściej stosowaną metodą pracy z wymiennicami jonowymi jest metoda dynamiczna polegająca na stałym przepływie roztworu badanego przez złożę wymiennicza i oznaczaniu zmian w eluacie odbieranym porcjami. Jednak ze względu na to, że czas pozostawiania wymiennicza w tym samym roztworze w warunkach ustroju trwa około dwunastu godzin, wydaje się bardziej słuszne przeprowadzenie pomiarów metodą statyczną. W metodzie tej roztwór pozostawia się z wymienniczem na przeciąg kilku godzin i całość wytrząsa celem ułatwienia wymiany.

W pracy niniejszej przeprowadzono pomiary metodą statyczną, wytrząsając próbkę wymiennicza z roztworem przez dwie godziny. Pomiary wykonano w środowiskach o pH 2, 3 i 6, za każdym razem oznaczając ilościowe zmiany stężeń występujących jonów. Wartość pH oznaczano na potencjometrze produkcji polskiej typu „2b”, a stężenia jonów sodo-



wych, potasowych i wapniowych na fotometrze płomieniowym produkcji N. R. D. typu Zeiss model III.

### b. Przygotowanie wymiennicza i roztworów

Wofatyty P przed zregenerowaniem poddano analizie sitowej; do pomiarów wybrano ziarna o średnicy  $0,5 < 2r < 1,5$  mm. Wymiennicz na przeciąg 50 godzin pozostawiono w wodzie destylowanej aby napeźniał. Odsączony wymiennicz poddano działaniu 3n HCl. Do regeneracji używany jest zazwyczaj 1n HCl, chodziło nam jednak o uwolnienie wymiennicza od jonów żelazowych, które są dosyć częstym zanieczyszczeniem jonitów produkowanych na skalę techniczną. Regenerację przeprowadzano metodą statyczną w warunkach podobnych jak pomiary. Fiaszkę z wymienniczem i kwasem wytrząsano na wytrząsarce laboratoryjnej, kwas wielokrotnie zmieniano. Po odmyciu wofatyty od żelaza wymiennicz płukano wodą destylowaną do zaniku reakcji na chlorki. Otrzymany w ten sposób wymiennicz w formie wodorowej suszono w temperaturze 30°C.

W celu ułatwienia sobie przygotowania roztworów o małych stężeniach i zmiennych wartościach pH przygotowano z odczynników chemicznie czystych roztwory podstawowe zawierające:

- |                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| 1. NaCl . . . 100 g/l | 3. CaCl <sub>2</sub> . . . 8 g/l |
| 2. KCl . . . 28 g/l   | 4. HCl . . . 0,1 n.              |

Z roztworów podstawowych przygotowano roztwory robocze o różnych wartościach pH, pobierając odpowiednie ilości roztworów podstawowych i rozcieńczając do 2000 ml. Roztwory robocze zawierały:

- |                      |                   |                                  |
|----------------------|-------------------|----------------------------------|
| 1. NaCl . . . 5 g/l, | KCl . . . 0,7 g/l | CaCl <sub>2</sub> . . . 0,4 g/l. |
|----------------------|-------------------|----------------------------------|

Po przygotowaniu roztwór poddawano fotometrycznej analizie ilościowej dla ustalenia stężenia początkowego kationu i mierzono pH roztworu.

### c. Wykonanie pomiarów

4 g uprzednio przygotowanego wofatyty P zadawano 100 ml roztworu i umieszczano we fiaszce na wytrząsarce laboratoryjnej na przeciąg 60 min. Po upływie tego czasu roztwór po zdekantowaniu oddzielano, wymiennicz jeszcze raz zadawano 100 ml roztworu i jak poprzednio, wytrząsano w ciągu 60 min. Roztwory mieszano i poddawano analizie ilościowej. Różnica stężeń roztworu początkowego i końcowego była miarą adsorpcji, a różnica pH miarą zmian stężenia jonów wodorowych. We wszystkich pomiarach stosowano te same warunki.

Dwukrotne zadawanie jonitu roztworem stosowano z tego powodu, że w warunkach statycznych, ze względu na stan równowagi pomiędzy roztworem a wymienniczem, reakcja nie zachodzi do końca i zdolność wymienna po drugim wytrząsaniu wzrasta blisko o połowę tej, jaką znaleziono po pierwszym.

Wystąpiło to bardzo wyraźnie przy oznaczaniu zdolności wymiennej wofatytu P.

Zdolność wymienna po pierwszym wytrząsaniu . . . . .	2 mval/g
po drugim wytrząsaniu . . . . .	0,8 mval/g
	razem 2,8 mval/g

(zdolność wymienną oznaczano w 0,1 n NaOH)

Wyniki pomiarów zestawiono w tablicach, poszczególne rubryki oznaczają:

Tablica 1

- rubryka 2, 3 — pH
- rubryka 4, 5 — stężenie jonów wodorowych w mval/l obliczone na podstawie pH
- rubryka 6 — różnica stężeń jonów wodorowych w mval/l przed i po adsorpcji
- rubryka 7, 8 — stężenie jonów Na w mval/l przed i po adsorpcji.
- rubryka 9 — różnica stężeń jonów sodowych w mval/l przed i po adsorpcji
- rubryka 10 — ubytek stężenia jonów sodowych w procentach obliczony w stosunku do stężenia w roztworze wyjściowym (stężenie w roztw. wyjść. = 100%)
- rubryka 11 — wykorzystanie zdolności wymiennej kationitu w procentach (ilość g wymiennicza użytego do

Tablica 5 pomiarów  $\times$  zdolność wymienna = 100%)

- rubryka 7 — stężenie jonów Na<sup>+</sup> na kationicie przed wymianą. Jonit przygotowany do pomiarów obsadzony był jonami sodowymi. Różnica stężeń roztworu NaCl, z którym reagował wymienniczak przed i po adsorpcji, jest równa stężeniu jonów sodowych na wymienniczu.

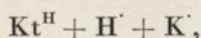
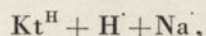
Rubryki pozostałe mają znaczenie podobne.

Uwaga! Należy pamiętać, że do pomiarów brano 200 ml roztworu a wyniki adsorpcji przeliczano na mval/l.



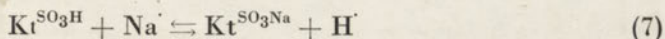
### Pomiary

Celem wyrobienia sobie poglądu na ilościowe zmiany stężeń poszczególnych jonów, pomiary rozpoczęto od badania równowag w układach prostych:

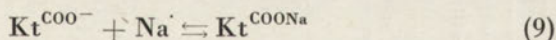
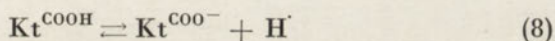


Wyniki pomiarów zestawiono w tablicach i każda z nich omówiona jest kolejno.

Pomiary ilościowe zestawione w tablicy pierwszej wskazują na to, że zgodnie z przewidywaniami, wofatył P posiadający grupy sulfonowe wymienia jony wodorowe z powierzchni na jony sodowe z roztworu w roztworze kwaśnym przy pH 1,8:



Wraz ze wzrostem pH roztworu rośnie stopień wymiany<sup>3)</sup> i stopień wykorzystania zdolności wymiennej kationitu. Wyjaśnienia tych zależności należy szukać we wzroście stopnia dysocjacji grup funkcyjnych wymiennicza kationowego i w przesuwaniu się równowagi wymiany w kierunku adsorpcji jonów sodowych wobec zmniejszającego się stężenia jonów wodorowych w roztworze.



Obydwe reakcje wskazują na to, że zmniejszenie stężenia  $\text{H}'$  i wzrost  $\text{Kt}^{\text{COO}^-}$  sprzyja powstawaniu  $\text{Kt}^{\text{COONa}}$

Na skutek wymiany wzrasta wyraźnie zakwaszenie roztworu i pH obniża się do 1,5. Zwraca uwagę różnica w stężeniu jonów desorbowanych do roztworu i adsorbowanych na powierzchnię wymiennicza. Gdyby reakcji nie towarzyszyły zjawiska uboczne stężenia te powinny być równe sobie. Ponieważ we wszystkich przypadkach stężenie jonów adsorbowanych przekracza stężenie jonów desorbowanych można przypuszczać, że adsorpcji wymiennej towarzyszy adsorpcja fizyczna.

<sup>3</sup> Przez stopień wymiany należy rozumieć stosunek ilości jonów zaadsorbowanych na wymienniczu do całkowitej ilości jonów w roztworze wyjściowym.

T a b l i c a 1

Wymiana jonów Na<sup>+</sup> z roztworów kwaśnych na ufofajcie P w formie uodorouej  
 Reakcja:  $K_1^H + H^+ + Na_1^+ = K_2^H + H_2^+ + Na_2^+$

Nr	pH		Desorpcja				Adsorpcja				Wykorzyst. zdoln. wymiennej kat-u w %
	przed wymianą	po wymianie	Stężenie jonów H <sup>+</sup> w mval/l		Wzrost stężenia jonów H <sup>+</sup> w mval/l	Stężenie jonów Na <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stężenia jonów Na <sup>+</sup> w roztworze w mval/l		w %	
			przed wymianą	po wymianie		przed wymianą	po wymianie	przed wymianą	po wymianie		
1	1,8	1,55	15,72	27,69	12,24	79,68	63,56	16,12	20,1	57,4	
2	3,1	1,8	0,79	15,72	14,93	83,88	65,17	18,71	22,4	66,8	
3	4,7	1,75	0,02	17,64	17,62	83,58	61,98	21,60	26,0	77,2	

T a b l i c a 2

Wymiana jonów K<sup>+</sup> z roztworów kwaśnych na ufofajcie P w formie uodorouej  
 Reakcja:  $K_1^H + H^+ + K_1^+ = K_2^H + H_2^+ + K_2^+$

Nr	pH		Desorpcja				Adsorpcja				Wykorzyst. zdoln. wymiennej kat-u w %
	przed wymianą	po wymianie	Stężenie jonów H <sup>+</sup> w mval/l		Wzrost stężenia jonów H <sup>+</sup> w mval/l	Stężenie jonów K <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stężenia jonów K <sup>+</sup> w roztworze w mval/l		w %	
			przed wymianą	po wymianie		przed wymianą	po wymianie	przed wymianą	po wymianie		
1	2,05	1,85	8,84	14,01	5,17	9,32	1,96	7,36	78,6	26,2	
2	3,10	2,15	0,79	7,02	6,23	9,30	1,73	7,57	83,5	27,0	
3	6,5	2,15	0,0003	7,02	7,02	9,29	0,82	8,47	91,5	30,2	



T a b l i c a 3

Wymiana jonów Ca<sup>++</sup> z roztworów kwaśnych na wofatyście P w formie wodorowej

Nr	pH			Desorpcja				Adsorpcja				Wykorzyst. zdoln. wymiennej kat-u w %
	przed wymianą		po wymianie	Stężenie jonów H <sup>+</sup> w mval/l		Wzrost stężenia jonów H <sup>+</sup> w mval/l		Stężenie Ca <sup>++</sup> w mval/l		Ubytek stężenia jonów Ca <sup>++</sup> w roztworze		
	przed wymianą	po wymianę	wymianę	przed wymianą	po wymianę	wymianę	przed wymianą	po wymianę	w mval/l	w %		
1	2,1	1,8'	15,72	7,88	7,84	7,57	0,08	7,49	98,8	26,6		
2	3,1	2,15	7,02	0,79	6,23	7,71	0,12	7,59	98,5	27,0		
3	6,4	2,2	6,26	0,0004	6,26	7,84	0,099	7,74	98,7	28,2		

T a b l i c a 4

Wymiana jonów Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> z roztworów kwaśnych na wofatyście P w formie wodorowej

Nr	pH			A d s o r p c j a															
	przed wymianą		po wymianę	Stężenie j-w H <sup>+</sup> w mval/l		Wzrost stęż. H <sup>+</sup> w roz-t-e w mval/l		Stężenie j-w Na <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów Na <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w K <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów K <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w Ca <sup>++</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów Ca <sup>++</sup> w roztworze	
	przed wymianę	po wymianę	wymianę	przed wymianę	po wymianę	wymianę	przed wymianę	po wymianę	wymianę	przed wymianę	po wymianę	wymianę	przed wymianę	po wymianę	wymianę	przed wymianę	po wymianę	w mval/l	w %
	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę	wymianę
1	2,05	1,55	8,84	27,96	19,12	83,88	73,12	10,76	12,8	10,39	7,89	2,50	24,1	8,45	2,23	6,22	73,6		
2	3,05	1,75	0,88	17,64	16,76	84,33	73,24	11,09	13,1	10,53	8,00	2,53	24,0	8,42	2,17	6,25	74,2		
3	5,85	1,85	0,0014	14,01	13,99	84,85	72,59	12,26	14,4	10,45	7,91	2,54	24,3	8,34	2,04	6,30	75,5		

Te same wnioski nasuwa przegląd wyników wymiany jonów potasowych. Stopień wymiany i stopień wykorzystania zdolności wymiennej rosną ze wzrostem pH. Wzrasta stężenie jonów wodorowych po wymianie, a kationit wykazuje własności wymiennicza i adsorbenta wiążąc większe ilości jonów na powierzchni niż wymienia do roztworu.

Nie można porównywać wartości bezwzględnych stopnia wymiany jonów sodowych i potasowych ponieważ stężenie wyjściowe jonów sodowych jest w przybliżeniu siedmiokrotnie większe niż potasowych. Między innymi z tego powodu stopień wymiany jonów potasowych — 0,84 jest znacznie większy niż jonów sodowych — 0,23. Natomiast można w pierwszym przybliżeniu porównywać wartości stopni wymiany jonów potasowych i wapniowych ze względu na to, że ich stężenia wyjściowe nie są zbyt różne: 0,00932 grówn/l  $K^+$  i 0,00757 grówn/l  $Ca^{++}$ . Stopień wymiany jonów wapniowych równy 0,98 jest nieco większy niż potasowych — 0,84, dzięki czemu przy mniejszym stężeniu jonów wapniowych w roztworze otrzymujemy ten sam stopień wykorzystania powierzchni.

Tablica 4 zawiera zestawienie wyników wymiany jonów sodowych, potasowych i wapniowych z ich roztworu wspólnego, zbliżonego składem do tego, jaki istnieje w przewodzie pokarmowym człowieka. Mimo, że analiza ilościowa roztworów poreakcyjnych wykazała największy ubytek jonów sodowych, mniejszy wapniowych, najmniejszy potasowych, wyniki są niezadowalające.

Rodzaj jonu	Stężenie w roztworze wyjściowym	Ubytek stężenia spowodowany adsorpcją	Stopień wymiany
Na <sup>+</sup>	84,35 mval/l	11,36 mval/l	0,13
K <sup>+</sup>	10,46 mval/l	2,52 mval/l	0,24
Ca <sup>++</sup>	8,4 mval/l	6,26 mval/l	0,76

Stopnie wymiany, wyliczone z przytoczonych pomiarów są stosunkowo niskie, co związane jest z tym, że w środowiskach kwaśnych wymiana jest utrudniona i wofatyt P jest wymienniczem o małej zdolności wymiennej. W środowiskach obojętnych i przy zastosowaniu wymiennicza o zdolności wymiennej 5, 8, 10 mval/g odpowiednio wzrasta stężenie jonów adsorbowanych.

Z tablicy wynika, że jony wapniowe wykazują największy stopień wymiany:

$$SW_{Na} : SW_K : SW_{Ca} = 0,13 : 0,24 : 0,74 = 1 : 1,8 : 5,6 \quad (10)$$



SW — stopień wymiany.

Przy stosunku stężeń wyjściowych:

$$[\text{Na}^+] : [\text{K}^+] : [\text{Ca}^{2+}] = 10 : 1,2 : 1, \quad (11)$$

w których stężenie jonów sodowych dziesięciokrotnie przewyższa stężenie jonów wapniowych, stopień wymiany jonów wapniowych jest 5,6 razy większy niż jonów sodowych. Jak widać, usuwanie jonów sodowych drogą wymiany jonowej bez zmiany stężenia jonów wapniowych, jest bardzo trudne do urzeczywistnienia.

Ten sam wniosek nasuwa porównanie stężeń w roztworach wyjściowych i na wymienniaczu:

$$[\text{Na}^+] : [\text{K}^+] : [\text{Ca}^{2+}] = 10 : 1,2 : 1$$

$$[\text{Na}^+]' : [\text{K}^+]' : [\text{Ca}^{2+}]' = 4,5 : 1 : 2,5 \quad (12)$$

Przy dziesięciokrotnie większym stężeniu jonów sodowych w roztworze, stężenie ich na powierzchni tylko dwukrotnie przewyższa stężenie jonów wapniowych.

Nieco prostsze wydaje się rozwiązanie zagadnienia potasu. Rozumowanie przytoczone powyżej doprowadza do wniosku, że przy ośmiokrotnie mniejszym stężeniu jonów potasowych w roztworze:

- 1) ich stopień wymiany jest 1,8 razy większy niż jonów sodowych,
- 2) stężenie na wymienniaczu jest 4,5 razy mniejsze niż jonów sodowych.

Ciekawe wnioski nasuwa porównanie tablic 1, 2, 3 z 4-a.

Rodzaj jonu	Ubytek stężenia jonu z roztworu pojedynczego	Ubytek stężenia jonu z roztworu wspólnego Na, K, Ca
Na <sup>+</sup>	22,8%	13,4%
K <sup>+</sup>	84,5%	24,0%
Ca <sup>2+</sup>	98,6%	74,4%

Porównanie stosunku stężeń jonów zaadsorbowanych z roztworów pojedynczych i z roztworu wspólnego;

$$\text{roztwory pojedyncze} \quad — \quad 22,8 : 84,5 : 98,6 = 1 : 3,7 : 4,3 \quad (13)$$

$$\text{roztwór wspólny} \quad — \quad 13,4 : 24,1 : 74,5 = 1 : 1,8 : 5,56 \quad (14)$$

wskazuje na to, że w roztworze wspólnym trzech omawianych jonów wzrasta stężenie zaadsorbowanych jonów wapniowych w stosunku do stężenia jonów sodowych i że zachodzi to kosztem jonów potasowych. Stopień wymiany jonów potasowych maleje przeszło trzykrotnie.

Pozostałe wnioski z tabl. 4 są podobne do tych, jakie podano przy omówieniu tabl. 1, 2, 3. Na skutek wymiany obniża się pH roztworu osiągając wartość 1,55. Wraz ze wzrostem pH roztworów wyjściowych rośnie stopień wymiany poszczególnych jonów i stopień wykorzystania powierzchni wymiennicza. Wreszcie, tak jak poprzednio, stężenie jonów adsorbowanych przekracza stężenie jonów desorbowanych.

Kontynuując badania należało sprawdzić, czy jony już zaadsorbowane na wymienniczu mogą wymieniać się na jony pozostałe w roztworze i jeżeli tak, to w jakich ilościach. Było to konieczne z tego względu, że na skutek wielogodzinnego przebywania wymiennicza w przewodzie pokarmowym, pierwotna równowaga ustalająca się dosyć szybko może ulegać zmianom podczas wędrówki wymiennicza przez dalsze części przewodu pokarmowego. Z drugiej strony pomiary takie powinny sprzyjać rozwiązaniu zagadnienia.

Przygotowany do pomiarów wymiennicz zawierał 11,9 mval jonów wodorowych i 16,1 mval jonów sodowych. W roztworze wyjściowym stężenie jonów wodorowych wynosiło 7,88 mval/l. Prócz tego roztwór przed wymianą zawierał jony potasowe i wapniowe i nie zawierał jonów sodowych. Należało przypuszczać, że w tych warunkach wymiana zajdzie kosztem desorpcji jonów sodowych. I rzeczywiście, w środowisku kwaśnym, przy pH 2,1 desorbowane są tylko jony sodowe a adsorbowane jony potasowe, wapniowe i w niewielkich ilościach wodorowe. Wraz ze wzrostem pH roztworów wyjściowych maleje stężenie desorbowanych jonów sodowych, a wzrasta jonów wodorowych. Po dwu godzinach stężenie jonów sodowych na wymienniczu osiąga wartość bliską temu, jakie istnieje w warunkach wymiany podanych w tabl. 4.

Wymiennicz obsadzony jest jonami potasowymi w stężeniu 7,36 mval i jonami wodorowymi w stężeniu 20,64 mval. Roztwór nie zawiera jonów potasowych, a zawiera jony sodowe, wapniowe i wodorowe. Stężenie jonów wodorowych równa się 8,84 mval/l. Wymiana jonów sodowych i wapniowych z roztworu odbywa się równolegle na jony wodorowe i potasowe z wymiennicza. Przy pH 2,05 jony wodorowe i potasowe desorbują w równych ilościach. W miarę wzrostu pH roztworu wyjściowego maleje stężenie desorbowanych jonów potasowych i wzrasta stężenie desorbowanych jonów wodorowych. Po upływie dwu godzin stężenie jonów potasowych na wymienniczu osiąga wartość bliską stężenia z tabl. 4. Należy podkreślić, że jak wynika z pomiarów, jony potasowe zdolne są do desorpcji i że ulegają jej w dużym stopniu, bo średnio w 64,7%.

Na wymienniczu znajdowało się 20,56 mvala jonów wodorowych i 7,44 mvala jonów wapniowych. Roztwór przed wymianą nie zawierał jonów wapniowych. W tych warunkach jony sodowe i potasowe z roztworu wymieniane są przede wszystkim na jony wodorowe z wymienia-



Tablica 5

Wymiana jonów K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> z roztworów kwaśnych na ufofitycie P w formie wodorowej i sodowej  
 Reakcja:  $K_1^H + K_1^{Na} + H_1 + H_1^+ + K_1 + Ca_1^{2+} = K_2^H + K_2^{Na} + K_2^K + K_2^{Ca} + H_2 + Na_2 + K_2 + Ca_2^{2+}$

Nr	pH			Desorpcja						Adsorpcja						
	przed	wy-	mianą	Wzrost stężenia H <sup>+</sup> w roztworze	Stęż. Na <sup>+</sup> na kat-e przed wym-ą	Stęż. Na <sup>+</sup> w rozt-e po wym-e	Wzrost stęż. jonów Na <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w K <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów K <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w Ca <sup>2+</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów Ca <sup>2+</sup> w roztworze	
							w	mval/l	przed	po	w	mval/l	przed	po	przed	po
1	2,1	2,15	7,88	-0,86	16,10	7,90	49,0	9,14	3,60	5,54	60,6	7,54	0,42	7,12	94,3	
2	3,1	2,95	0,79	0,32	18,70	7,36	39,3	9,30	2,56	6,68	72,4	7,70	0,46	7,24	94,0	
3	4,7	3,05	0,02	0,86	21,60	6,01	28,9	9,28	2,26	7,02	75,7	6,84	0,42	7,42	94,7	

Tablica 6

Wymiana jonów Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> z roztworów kwaśnych na ufofitycie P w formie wodorowej i potasowej  
 Reakcja:  $K_1^H + K_1^{K} + H_1 + Na_1 + Na_1^{2+} + Ca_1^{2+} = K_2^H + K_2^{Na} + K_2^{Ca} + H_2 + Na_2 + K_2 + Ca_2^{2+}$

Nr	pH			Desorpcja						Adsorpcja						
	przed	wy-	mianą	Wzrost stężenia H <sup>+</sup> w roztworze	Stęż. K <sup>+</sup> na kat-e przed wym-ą	Stęż. Na <sup>+</sup> w rozt-e po wym-e	Wzrost stęż. jonów K <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w Na <sup>+</sup> w mval/l		Wzrost stęż. jonów Na <sup>+</sup> w roztworze		Stężenie j-w Ca <sup>2+</sup> w mval/l		Wzrost stęż. jonów Ca <sup>2+</sup> w roztworze	
							w	mval/l	przed	po	w	mval/l	przed	po	przed	po
1	2,05	1,85	8,84	5,17	7,36	5,10	69,5	85,50	62,50	23,0	26,3	7,70	1,50	6,20	80,8	
2	3,10	2,05	0,79	8,05	7,58	5,02	66,2	83,88	57,28	27,0	31,7	7,70	0,94	6,67	87,8	
3	6,50	2,15	0,0003	7,02	8,48	4,93	58,3	83,58	55,60	27,98	33,5	7,84	0,96	6,88	88,0	

T a b l i c a 7

Wymiana jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  z rozтворów kwaśnych na wofatyście P w formie wodorowej i wapniowej  
 Reakcja:  $\text{Kt}_1^{\text{H}} + \text{Kt}_1^{\text{Na}} + \text{Kt}_1^{\text{Ca}} + \text{H}^+ + \text{Na}^+ + \text{K}^+ = \text{Kt}_2^{\text{H}} + \text{Kt}_2^{\text{Na}} + \text{Kt}_2^{\text{K}} + \text{Kt}_2^{\text{Ca}} + \text{H}_2 + \text{K}_2 + \text{Ca}^{++}$

Nr	pH			D e s o r p c j a					A d s o r p c j a							
	przed	wy- mianą	po wy- mianę	Wzrost stęż. $\text{H}^+$ w roz- tworze mval/l	Stęż. na kat- ie przed wym- a- w mval	Stęż. na $\text{Ca}^{++}$ w roz- t- e po wym- e w mval/l	Wzrost stęż. jonów $\text{Ca}^{++}$ w rozтворze		Stężenie j-w $\text{Na}^+$ w mval/l	Ubytek stęż. jonów $\text{Na}^+$ w rozтворze mval/l	Stężenie j-w $\text{K}^+$ w mval/l	Ubytek stęż. jonów $\text{K}^+$ w rozтворze mval/l				
							w	%					przed	po	przed	po
1	1,95	1,75	11,13	6,51	7,44	1,11	1,11	15,0	79,68	59,36	20,32	23,0	9,14	7,28	1,86	21,1
2	3,10	2,05	0,79	8,05	7,58	0,79	0,79	10,3	83,88	62,06	21,82	26,1	9,30	7,16	2,14	23,4
3	6,50	2,10	0,0003	7,88	7,74	0,74	0,74	9,5	83,58	58,80	24,78	29,6	9,28	6,70	2,58	28,4



cza i w znacznie mniejszym stopniu na jony wapniowe. Jak w dwóch omówionych przypadkach ze wzrostem pH roztworu maleje stężenie desorbowanych jonów wapniowych i wzrasta wodorowych. Desorpcja jonów wapniowych wynosi średnio 11,6% stężenia jonów wapniowych na wymienniczu przed wymianą. Po wymianie stężenie pozostałych na kationicie jonów wapniowych bliskie jest stężeniu tych jonów w tabl. 4.

Jak wynika z porównania tabl. 1—7 jony sodowe, potasowe i wapniowe mogą ulegać adsorpcji lub desorpcji w zależności od ich stężenia na wymienniczu. Oznacza to, że można mówić o pewnym „stanie równowagi” pomiędzy wymienniczem a roztworem. Nie jest to jednakże stan równowagi w ścisłym tego słowa znaczeniu, ponieważ ulega zmianom w czasie, a oprócz tego, jak wykazują dalsze pomiary, nie odnosi się do dowolnych stężeń jonów wapniowych.

Tablica 8 zawiera zestawienie wyników wymiany pomiędzy wymienniczem obsadzonym jonami sodowymi, potasowymi, wapniowymi i wodorowymi a roztworem zawierającym te same jony. Przed wymianą stężenia jonów sodowych, potasowych i wapniowych równe były stężeniom w „stanie równowagi” (tabl. 4). Stężenia tych samych jonów w roztworze wyjściowym równe były stężeniom w soku trawiennym, jak w pomiarach poprzednich.

Rodzaj jonu	Stężenie na wymienniczu przed wymianą (średnio)	Stężenie w roztworze wyjściowym (średnio)
Na <sup>+</sup>	11,37 mval	84,35 mval/l
K <sup>+</sup>	2,52 mval	10,46 mval/l
Ca <sup>++</sup>	6,26 mval	8,40 mval/l
H <sup>+</sup>	7,85 mval	zmienne

W warunkach tych, w środowisku kwaśnym, przy pH 2,05 adsorpcji ulegają jony wodorowe i wapniowe, desorpcji jony sodowe i potasowe. W środowisku mniej kwaśnym adsorbowane są tylko jony wapniowe, a pozostałe ulegają desorpcji. Chociaż ilościowe zmiany są niewielkie, równowaga reakcji wyraźnie przesuwa się w kierunku obsadzenia wymiennicza jonami wapniowymi.

Stężenie desorbowanych jonów sodowych jest znacznie większe niż stężenie jonów potasowych. Jeżeli stosunek stężeń jonów potasowych i sodowych na wymienniczu wynosi:

$$[\text{K}^+] : [\text{Na}^+] = 1 : 4,5 \quad (15)$$

to stosunek stężeń jonów desorbowanych:

$$[\text{K}^+] : [\text{Na}^+] = 1 : 14 \quad (16)$$

T a b l i c a 8

Wymiana jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  z roztworów kwasnych na wofatyce P w formie wodorowej, sodowej, potasowej i wapniowej  
 Reakcja:  $\text{Kt}_1^{\text{H}} + \text{Kt}_1^{\text{Na}} + \text{Kt}_1^{\text{K}} + \text{Kt}_1^{\text{Ca}} + \text{H}^+ + \text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} = \text{Kt}_1^{\text{H}} + \text{Kt}_1^{\text{Na}} + \text{Kt}_1^{\text{F}} + \text{Kt}_1^{\text{Ca}} + \text{H}_2 + \text{Na}_2 + \text{K}_2 + \text{Ca}_2$

Nr	pH		Stężenie j-w H <sup>+</sup> w mval/l		wzrost stęż. H <sup>+</sup> w rozł-c mval/l	Rodzaj jonu	Stęż. na kationicie		Stężenie j-w w mval/l		Wzrost stęż. jonów w roztworze		Ubytek jonu z kationitu w %	A d s o r p c j a			
	przed	po	przed	po			przed	po	przed	po	przed	po		Stęż. Ca <sup>2+</sup> na kat-c	Stężenie j-w Ca <sup>2+</sup> w mval/l	Ubytek jonów Ca <sup>2+</sup> w roztworze	Stęż. Ca <sup>2+</sup> przed wym-a
1	2,05	2,15	8,84	7,02	-1,82	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup>	10,74 2,50	83,88 10,39	85,95 10,56	2,07 0,17	2,47 -1,64	19,27 6,8	6,22	8,45	5,43	3,02	35,73
2	3,05	2,65	0,88	2,22	1,34	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup>	11,10 2,52	84,33 10,53	86,08 10,66	1,75 0,13	2,07 1,23	15,76 5,16	6,26	8,42	5,37	3,05	36,22
3	5,85	2,80	0,0014	1,57	1,57	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup>	12,26 2,45	84,85 10,45	85,54 10,48	0,69 0,03	0,81 0,29	5,63 1,18	6,30	8,34	5,25	3,09	37,05



T a b l i c a 9

Wymiana jonów Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> z roztworów kwaśnych na wofatyficye P w formie uodorowanej, potasowej i wapniowejReakcja:  $Kt_1^H + Kt_1^K + Kt_1^{Ca} + H_1 + Na_1 + K_1 + Ca^{++} = Kt_2^H + Kt_2^K + Kt_2^{Ca} + H_2 + Na_2 + K_2 + Ca^{++}$ 

Nr	pH		D e s o r p c j a										A d s o r p c j a			
	przed wymiana	po wymiana	Stężenie j-w H <sup>+</sup> w mval/l	Wzrost H <sup>+</sup> w rozt-e w mval/l	Róż- dzaj jonu	Stęż. na ka- tionicie		Stężenie j-w w mval/l		Zmiana stęż. jonów w roztworze		Ubytek jonów z ka- tionitu w %	Stężenie j-w Na <sup>+</sup> w mval/l		Ubytek stęż. jonów Na <sup>+</sup> w roztworze	
						przed wym-ą w mval	po wym-ą w mval	przed wym-ą mianę	po wym- mianę	w mval/l	w %		w mval/l	w %	przed wym- mianę	po wym- mianę
1	2,10	1,85	7,88	14,01	6,13	K <sup>+</sup>	6,08	10,44	13,40	2,96	28,35	48,7	80,33	70,33	10,0	12,45
A d s o r p c j a																
						Ca <sup>++</sup>	7,84	8,32	5,63	2,69	32,34	34,32				

Z przeglądu pomiarów zestawionych w tabl. 8 wynika, że zmiany, jakie zachodzą po ustaleniu się pierwotnej równowagi na skutek długiego przebywania wymienniacza w przewodzie pokarmowym są niekorzystne. Średnio po czterech godzinach przebywania wymienniacza w roztworze w wymianie wtórnej nie zachodzi adsorpcja jonów sodowych, lecz ich desorpcja. Desorpcji ulegają także jony potasowe, lecz w mniejszym stopniu. Poza tym, wymianę wtórną charakteryzuje adsorpcja jonów wapniowych, których stopień wymiany wynosi średnio 0,36.

Tablica 9 zawiera pomiary podsumowujące. Do wymiany przygotowano wymienniacz obsadzony w około 22% jonami potasowymi, w 28% jonami wapniowymi, w 50% jonami wodorowymi.

Stopień wymiany jonów sodowych, który powinien być możliwie największy jest taki sam, jak przy wymianie na wymienniaczu w formie wodorowej. Jony potasowe ulegają desorpcji w 48,7%. Natomiast jony wapniowe, pomimo tak wysokiego stężenia na wymienniaczu, ulegają dalszej adsorpcji. Stopień wymiany jonów wapniowych przy stężeniu 7,84 mval na powierzchni i 8,32 mval w roztworze wynosi 0,32, a więc jest duży.

Związane z wymianą zakwaszenie zmniejsza się, ponieważ część jonów adsorbowanych zajmuje miejsca jonów potasowych.

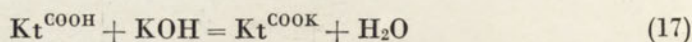
## Omówienie wyników

### 1. CHARAKTERYSTYKA GRUP KWASOWYCH

Na podstawie znajomości warunków panujących w przewodzie pokarmowym i własności grup kwasowych wymienniaczy kationowych wydaje się słuszne stosowanie wymienniaczy zawierających grupy  $(-\text{SO}_3)^-\text{H}^+$  i  $(-\text{COO})^-\text{H}^+$ .

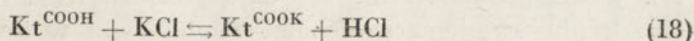
Przeciwko stosowaniu wymienniaczy tylko z grupami karboksylowymi przemawiają następujące względy:

- 1) kationit z grupami karboksylowymi wymienia jedynie w środowisku obojętnym i alkalicznym, a więc nie wymienia w kwaśnym środowisku żołądka,
- 2) szybkość reakcji wymiany pomiędzy kationitem z grupami karboksylowymi w formie wodorowej a jonami z roztworu jest bardzo mała. Według K u n i n a i M y e r s'a [7] czas trwania wymiany do osiągnięcia stanu równowagi reakcji:





wynosi 7 dni. Czas ustalania się równowagi reakcji:



jest jeszcze dłuższy, ze względu na to, że zamiast wody wydziela się kwas.

Prawdopodobnie skutkiem tego, że z jednej strony wymiana zachodzi tylko w jelitach, gdzie odbywa się wchłanianie soli z przewodu pokarmowego do krwi i stężenie elektrolitów w miarę upływu czasu maleje, a z drugiej szybkość wymiany jest bardzo mała, zdolność wymienna wymiennicza jest wykorzystywana zaledwie w 30—40%.

Przeciwno stosowaniu wymiennicy tylko z grupami sulfonowymi przemawia:

- 1) mniejsza zdolność wymienna niż kationitów karboksylowych,
- 2) zbyt gwałtowne i duże zakwaszanie soku żołądkowego.

Żywice z grupami sulfonowymi i karboksylowymi wymieniają na całej długości przewodu pokarmowego i posiadają większą zdolność wymienną niż żywice z grupami sulfonowymi.

## 2. FORMA WYMIENICZA

Jednym z środków stosowanych w leczeniu obrzęków spowodowanych niewydolnością krążenia jest chlorek amonowy. Zamiast podawać krystaliczny chlorek amonowy można wprowadzić do przewodu pokarmowego wymiennicz częściowo obsadzony jonami amonowymi, co było uzasadnione poprzednio. Na wymienniczu o zdolności wymiennej 3 mval/g, podanego w ilości 50 g dziennie, stężenie jonu amonowego może sięgać do 37%, na wymienniczu o zdolności wymiennej 6 mval/g tylko do 18%.

Jak wynika z pomiarów w stanie równowagi stężenie jonów potasowych na wymienniczu waha się w granicach 2,5—3 mval. Jeżeli stężenie jonów potasowych na wymienniczu przed reakcją było mniejsze, jony potasowe były adsorbowane (tabl. 4), jeżeli było większe — jony potasowe ulegały desorpcji (tabl. 5, 9). Oznacza to, że jeżeli chcemy uniknąć strat jonów potasowych z soków trawiennych, stężenie ich na wymienniczu powinno być co najmniej równe stężeniu w „stanie równowagi”. W przeliczeniu daje to 11% całkowitego stężenia jonów na wymienniczu. Ponieważ jednak zdolność wymienna wofatytu P w środowiskach kwaśnych jest równa 1,4 mval/g, a w obojętnych i alkalicznych 2,8 mval/g stężenie zaadsorbowanego potasu przy wykorzystaniu całkowitej zdolności wymiennej wzrośnie dwukrotnie, a więc również i stopień obsadzenia powierzchni jonami potasowymi. Stąd optymalne wyniki powinno otrzymywać się przy obsadzeniu wymiennicza jonami potasowymi w ilości 20—25% całkowitego stężenia.





Jeżeli ilość mvali jonów sodowych wprowadzanych z pokarmem do przewodu pokarmowego w ciągu jednej doby oznaczymy przez  $m$ , to dawkę dobową wymiennicza można obliczyć ze wzoru:

$$a = \frac{2,5 \cdot m}{z_w} \quad (22)$$

$$a = \frac{2,5 \cdot 68,4}{5} = 34,2 \text{ g}$$

W tym przypadku wymiennicz powinien zawierać:

1. jonów  $K^+$   $x = \frac{c}{4} = 42,8 \text{ mval} = 25\%$  całkowitego stężenia jonów na wymienniczu,
2. „  $NH_4^+$   $y = 56 \text{ mval} = 32,7\%$  całkowitego stężenia jonów na wymienniczu,
3. „  $H^+$   $z = c - (\frac{c}{4} + 56) = 72,2 \text{ mval} = 42,3\%$  całkowitego stężenia jonów na wymienniczu.

Oznacza to, że dla usuwania jonów sodowych z wprowadzanego pokarmu należałoby podawać w ciągu doby 34,2 g wymiennicza ( $z_w = 5 \text{ mval/g}$ ), zawierającego 25% jonów potasowych, 32,7% jonów amonowych i 42,3% jonów wodorowych.

Dla usuwania jonów sodowych, zawartych w płynach puchlinowych, należałoby zwiększyć dawkę wymiennicza, albo zmniejszyć ilość NaCl w podawanym pokarmie.

Wyniki niniejszej pracy zgadzają się z tymi, jakie uzyskali lekarze klinicyści, stosując cambil, carboresin, masoten, natrantit i inne wymiennicze [2, 12]. Ponieważ jednak praca zawiera pewne elementy nowe wymaga ze swej strony sprawdzenia w klinice.

Uważamy za miły obowiązek złożyć wyrazy podziękowania prof. dr Antoniemu Basińskiemu za opiekę i pomoc w opracowaniu tematu i dr Schielakowi z Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Bydgoszczy za udostępnienie fotometru płomieniowego.

### Streszczenie

Zbadano wymianę jonów sodowych, potasowych i wapniowych na wofatyce P w roztworach zbliżonych składem jonowym do soków trawiennych człowieka. Znalaziono, że wprowadzenie do roztworu wymiennicza obsadzonego jonami potasowymi w ilości 20%—25% całkowitej jego pojemności, zabezpiecza badany roztwór od strat jonów potasowych, przy niezmnieszonem usuwaniu jonów sodowych. Pomiary przeprowadzone z jonami wapniowymi wykazały, że bardzo łatwo wiążą się one

z wymienniczem i w formie związanej opuszczają roztwór. Częściowe obsadzenie jonami wapniowymi wprowadzanego wymiennicza nie obniża strat wapnia z roztworu. Autorzy przypuszczają, że można zmniejszyć ilość usuwanych jonów wapniowych przez zastosowanie wymienniczy o średnicy por i kapilar  $2r < 9,6 \text{ \AA}$ . Zaproponowano aby w leczeniu obrzęków używać kationitów z grupami sulfonowymi i karboksylowymi w formie amonowej, potasowej i wodorowej. Podano wzór dla obliczenia ilości poszczególnych form w zależności od zdolności wymiennej i dobowej dawki wymiennicza.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Boyd G. E., Schubert J., Adamson A. W., *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2816, 1947.
- [2] Fabre J., Bachmann W. *Szweiz. Medizin. Wochenschrift*. Nr 51, 1313, 1952.
- [3] Giedroic K. K. *Uczenie o poglotitelnoj sposobnosti poczw.* Sielchozgiz 1932.
- [4] Gregor H. P., Bregman J. I. *J. Colloid Sci* **6**, 323, 1951.
- [5] Jenny H., *J. Phys. Chem.* **36**, 2217—2258, 1932.
- [6] Kunin R., Barry R. E. *Ind. Eng. Chem.* **41**, 1269, 1949.
- [7] Kunin R., Myers R., *Ion Exchange Resins*, John Wiley Sons, Inc, New York 1950.
- [8] Roguski J., *Postępy Kardiologii* **2**, 7, 1953.
- [9] Semerau - Siemianowski M., Krzezińska - Ławkowiczowa, *Postępy Kardiologii* **2**, 159, 1953.
- [10] Smid J., *Chem. Promyst.* **2**, (27), 141, 1952.
- [11] Tatur H., Nowakowski W., *Jonity, teoria i zastosowanie w przemyśle* P. W. T. Warszawa 1955.
- [12] Wolff H. P., *Klin. Wochenschrift* **32**, 761, 1954.

#### ОБМЕН НАТРИЕВЫХ, КАЛИЕВЫХ И КАЛЬЦИЕВЫХ ИОНОВ НА ВОФАТИТЕ Р В РАСТВОРАХ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ПО СВОЕМУ СОСТАВУ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫМ СОКАМ ЧЕЛОВЕКА

#### Р е з ю м е

Исследован обмен натриевых, калиевых и кальциевых ионов на вофатите Р в растворах приближенных по составу к желудочным сокам человека. Было найдено что введение в раствор ионообменника содержащего калиевые ионы в числе 20% — 25% общей обменной емкости, предохраняет исследуемый раствор от потери калия, не уменьшая обмена натрия. Исследования проведенные в отношении кальция показали, что он особенно легко соединяется с ионообменником, ввиду чего он теряется в больших количествах. Введение ионообменника, содержащего некоторое количество кальциевых ионов, не ведет к уменьшению потерь. Авторы надеются, что применение ионообменников



с диаметром микропор и капилляр ниже  $9,6 \text{ \AA}$ , приведет к уменьшению потерь ионов из исследуемых растворов.

Авторы предлагают применять в лечении опухолей катионообменные смолы, содержащие аммониевые, калиевые и водородные ионы. Была дана формула, позволяющая вычислить количество отдельных вводимых ионов в зависимости от обменной емкости и суточной дозы ионообменника.

EXCHANGE OF SODIUM, POTASSIUM AND CALCIUM IONS ON VOFATITE P  
IN SOLUTIONS RESEMBLING IN IONIC COMPOSITION GASTRIC  
JUICES OF MAN

Summary

The exchange of sodium, potassium and calcium ions on vofatite P was investigated in solutions resembling in ionic composition gastric juices of man. The authors found that when an exchanger saturated up to 20—25 per cent of capacity with potassium ions is introduced into the solution, it protects the solution investigated against the loss of potassium ions without depressing exchange of sodium ions.

Readings relating to calcium ions revealed that the latter readily adsorb on the exchanger (and leave the solution in fixed form, as a compound).

When the exchanger introduced is only partly saturated with calcium ions, it does not protect the solution against loss of calcium. The authors suppose that it is possible to reduce losses in calcium ions by using exchangers with pores and capillaries less than  $9.6 \text{ \AA}$  in diameter.

It is proposed to use ion exchangers having carboxil and sulfonic acid groups containing ammonium potassium hydrogen ions in treating oedema, and a formula is presented for calculating particular groups depending on their exchange capacity and daily dose of the exchanger.

Otrzymano 22.11.1955 r.

## SPIS TREŚCI

	str.
M. Chorąży, Bilans azotowy u szczurów obarczonych mięsakiem . . . . .	131
W. Zalewski, Chromatograficzne oznaczanie cukrowców w krajowych owocach . . . . .	149
J. Janicki, J. Pawełkiewicz, K. Nowakowska, Otrzymywanie koncentratów oraz krystalicznego witaminu B <sub>12</sub> ze ścieków miejskich poddanych fermentacji metanowej . . . . .	161
W. Ostrowski, A. Niewiarowska, Połączenia witaminu B <sub>12</sub> z białkami IV. Oczyszczanie i własności kompleksu witamin B <sub>12</sub> -białko w surowicy krwi bydlęcej . . . . .	171
W. Bicz, Zastosowanie metody nurków Kartezjusza do badania przemiany gazowej komórek zwierząt stałocieplnych . . . . .	183
L. Wojtczak, Niektóre zagadnienia związane z aktywnością enzymów od- dechowych w czasie rozwoju jedwabnika morwowego, <i>Bombyx mori</i> L. . . . .	197
I. Reifer, A. Rumińska, J. Kączkowski, Wpływ żelazicyjanku potasu na <i>Datura stramonium</i> L. Plon liści, zawartość alkaloidów i niektórych innych składników . . . . .	209
J. Pawełkiewicz, K. Zodrow, Wytwarzanie wolnych porfiryn przez <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	225
J. Kowalczyk, Prosty aparat do elektroforezy bibułowej . . . . .	251
R. Klimek, B. Skarżyński T. W. Szczepkowski, Biochemia sa- możywnych bakterii siarkowych. III. Cytochrom w <i>Thiobacillus thio- parus</i> . . . . .	261
A. Narębska i W. Maćkowski, Wymiana jonów sodowych, potaso- wych i wapniowych na wofatycie P w roztworach zbliżonych składem jonowym do soków trawiennych człowieka . . . . .	271

