

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN

INSOLUBLE PROTEIN-TANNIN COMPOUNDS*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, Wrocław*

The purpose of the investigation presented in this paper was the quantitative evaluation of the interaction of protein with tannin. Characteristic conditions for precipitation of serum proteins, haemoglobin, lysozyme and gelatine, the effectiveness of this reaction in isolating microgram amounts of insoluble protein-tannin compounds had to be examined.

EXPERIMENTAL

Lysozyme was prepared according to Alderton and Fevold [1], haemoglobin according to Drabkin [2]. Commercial gelatine (Gruebler p. a.) and tannic acid (Mallinckrodt USA XII, and of Belgium origin) were used.

Stock solutions. Blood serum; 1% water solutions of lysozyme, haemoglobin and gelatine; 10% solutions of tannin in: (a) 1N-HCl containing 2% of phenol (= "tannin reagent" used also for quantitative protein determination [3]), (b) in distilled water and (c) in 0.9% NaCl.

Solvents. Stock solutions, except tannin reagent, were diluted with one of the following solvents: 0.9% NaCl, 10% NaCl, 22% Na₂SO₄, saturated and half saturated (NH₄)₂SO₄, 0.5M-veronal-acetate buffer [4] for pH 2.6 to 9.6, 1N-HCl containing 2% of phenol.

Reaction between protein and tannin was studied on stock solutions of protein and tannin diluted both with the same solvent.

The general procedure. Typical experiments were carried out as follows: into several test tubes (6 cm. high and 1 cm. diameter) 1 ml. of the examined protein solution and 1 ml. of tannin solution were pipetted. In the control sample 1 ml. of the used solvent was added to the protein. The content of the tubes was thoroughly stirred and allowed to stand at room temperature for 30 minutes or longer. All samples were then centrifuged at 2000 rev./min. for 15 min. No exemption should be made even for the samples which apparently remain clear. The supernatants were transferred to other test tubes, and the test tubes with

precipitates were allowed to stand upside-down on a sheet of filter paper to drain. After some minutes the internal walls were dried with filter paper, and the precipitates were dissolved in 2 ml. of 0.1N-NaOH. The protein in supernatants and in precipitates was estimated by the turbidimetric tannin micromethod [3]. Results are expressed in percentage of protein found in the control sample. Higher discrepancies than $\pm 10\%$ of the total protein content of the control sample may be due to the not complete dissolution of the precipitate or the presence of some substances interfering with the determination of the protein by the tannin micromethod. It has been established that: (a) 0.1 N-NaOH was suitable for dissolving the protein-tannin compounds; (b) ammonium sulphate in concentration higher than 0.1 saturation, caffeine above 0.1%, urea above 10% and ethanol may be the source of errors. The effect of these agents can be eliminated by suitable dilution of the sample before protein determination.

RESULTS

In order to establish optimal conditions for the precipitation of protein by tannin following parameters have been considered: time, temperature, weight ratio of protein to tannin, pH and the presence of salts in the reaction mixture. It has been proved that the weight ratio of protein to tannin (P : T) and pH are essential ones.

Temperature and time of reaction

Time of incubation had no influence on the precipitation of protein by tannin. The same results were obtained in samples incubated for 30 min. and for 24 hours. Temperature ranging from 15° to 30° did not influence the reaction. Therefore all experiments were carried out at room temperature.

Weight ratio of protein to tannin

Table 1 shows the results of two experiments of precipitating 0.005% solution of serum proteins by decreasing amounts of tannin (5-0.005%). In the experiment (I) the medium was 0.5N-HCl in 1% phenol, as used in the turbidimetric protein determination, and in the experiment (II) the solvent was 0.9% NaCl.

Two assays have been made parallelly, in the first the turbidity was measured, in the others the protein was determined in the precipitate and in the supernatant. In both experiments (I and II) optical density decreased with decreasing tannin concentration. In acid medium the turbidity was higher than at pH 6 (0.9% NaCl). At the lowest tannin

concentration (0.005%) turbidity was hardly visible ($E = 0.02$). After centrifugation, however, total protein was present in the precipitates of all the samples, and supernatants did not contain any protein, except the sample with the lowest tannin concentration in the experiment (I).

Table 1

Effect of tannin concentration on precipitation and turbidity of 0.005% protein solution

Exp. I, in 0.5N-HCl-1% phenol solution. Exp. II, in 0.9% NaCl solution. Incubation time 10 min., temperature 30°. Protein contents in precipitate and supernatant were determined by the turbidimetric tannin method [3]. Details see text.

Tannin (g./100 ml.)	Exp. I			Exp. II		
	Optical density* (E)	% of protein recovery in		Optical density* (E)	% of protein recovery in	
		precipitate	super- natant		precipitate	super- natant
5.000	0.54	104	0.0	0.26	107	0.0
0.500	0.31	96	0.0	0.05	100	0.0
0.050	0.13	93	3.0	0.04	93	3.0
0.005	0.02	42	58.0	0.03	93	7.0

* Turbidity was measured with Hilger's absorptiometer, red filter ROR 2 (Chance).

Table 2

Precipitation of serum proteins by varying amounts of tannin

Serum and tannin diluted with 0.9% NaCl solution. Details see text.

Series I Protein conc. 0.002%				Series II Protein conc. 0.07%				Series III Protein conc. 3.7%			
Tannin (g./100 ml.)	P:T*	% of protein recovery in		Tannin (g./100 ml.)	P:T	% of protein recovery in		Tannin (g./100 ml.)	P:T	% of protein recovery in	
		precipi- tate	super- natant			precipi- tate	super- natant			precipi- tate	super- natant
5.000	1: 2500	108	0	5.00	1: 71	103	0	5.00	1: 1.4	102	0
0.040	1: 20	100	0	1.00	1: 14	99	0	4.00	1: 1.1	104	0
0.004	1: 2	110	0	0.10	1: 1.4	102	0	3.00	1: 0.85	96	0
0.003	1: 1.5	108	0	0.04	1: 0.57	93	0	2.00	1: 0.57	101	0
0.002	1: 1	90	10	0.03	1: 0.5	40	60	1.00	1: 0.28	25	75
0.001	1: 0.5	95	6	0.02	1: 0.3	20	85	—	—	—	—
0.0008	1: 0.4	62	40	0.01	1: 0.14	0	98	—	—	—	—
				0.008	1: 0.11	0	103				

* P:T = Weight ratio of protein to tannin.

From these experiments it can be concluded that turbidity does not reflect the formation of insoluble protein-tannin compounds.

In order to check whether the insoluble compounds are of a constant composition, the precipitation reaction was investigated at known con-

centration of protein and tannin in non-buffered solution of 0.9% NaCl. In each series of experiments serum proteins of constant concentration were precipitated by varying amounts of tannin, and protein both in the precipitate and in supernatant was estimated.

Table 2 shows the results of three series of experiments in which serum proteins diluted to concentrations 0.002% (I), 0.07% (II) and 3.5% (III) have been used. For each series, the concentration of tannin in the sample, the weight ratio of protein to tannin (P:T), and percentage of protein recovered in precipitate and in supernatant are given. It may be seen that the weight ratio of protein to tannin was essential for the total protein precipitation. It is shown for serum proteins that 3.5% solution of protein was precipitated completely still by 2% solution of tannin, 0.07% solution of protein by 0.04% solution of tannin and 0.002% solution of protein by 0.001% tannin (P:T being 1:0.57, 1:0.57 and 1:0.5, respectively).

The weight ratio of protein to tannin sufficient for the complete precipitation of serum proteins was found to be about 1:0.5. At this weight ratio not all tannin was bound in the compounds since in the protein-free supernatants tannin was always present. With lower tannin concentration the protein is only partially precipitated and at concentration of tannin 10 times lower than that of protein, precipitation did not occur.

Insoluble protein-tannin compounds obtained, when weight ratio of protein to tannin is 1:0.5—1:10, are colourless, soft and voluminous, give a fine suspension with water, can be well washed to remove the excess of tannin and other contaminations. On the other hand, the insoluble protein-tannin compounds obtained at P:T = 1:1000 are brown, compact, gummy and cannot be suspended.

The experiments described above lead to the conclusion that the precipitation of protein by tannin develops in several successive reactions. The first one leads to the formation of insoluble compounds in which protein outweighs tannin. In the next ones tannin is linked to the former compounds. In this stage the turbidity increases with increasing amount of tannin, and the reaction stops at weight ratio of protein to tannin equal 1:1000. This stage of the reaction is used for the quantitative protein determination by turbidity measurements.

Effect of pH

In table 3 results obtained with lysozyme, gelatine, haemoglobin and serum proteins are given. Each sample contained 0.01% solutions of protein and tannin in 0.05M-veronal-acetate buffer of pH 7.0. At this pH and weight ratio, haemoglobin as well as lysozyme were precipitated

by tannin, but serum proteins and gelatine were not. Serum proteins do not sediment with tannin when the pH value is shifted from 6 (0.9% NaCl) to 7. Therefore, more detailed studies on the pH effect were done.

Table 3

Precipitation of proteins by tannin at pH 7.0 and with weight ratio of protein to tannin (P:T) = 1

0.01% solutions of proteins and tannin in 0.05 M-veronal-acetate buffer of pH 7.0

Protein	Recovery of protein (%)	
	precipitate	supernatant
Haemoglobin	98	0
Lysozyme	100	0
Serum	5	100
Gelatine	3	100

Fig. 1 shows the effect of pH on precipitation of serum proteins, lysozyme and gelatine by tannin at P : T = 1. All the proteins investigated were completely precipitated in the solution of 1 N-HCl. At other pH individual proteins were precipitated at certain characteristic pH range. The characteristic pH range for serum proteins was found to be 4.2 to 6.2, for gelatine 0 to 6.3 and for lysozyme 5.0 to 8.6. At pH 2.6 serum proteins and lysozyme were only partially precipitated, at pH values above 7.0 gelatine and serum proteins were not precipitated. Lysozyme was precipitated even at pH 9.6.

Quite similar results have been obtained, as formerly, by dissolving the isolated protein-tannin precipitates in buffers of the same pH range.

By increasing the protein to tannin ratio the range of characteristic pH is narrowed. By decreasing this ratio the range is enlarged. Even by using very high tannin concentration the precipitation was not obtained at pH 12 (0.01 N-NaOH).

It seems to follow from above experiments that the weight ratio of protein to tannin needed for the precipitation of the protein depends on the electric charge of the protein. Anionic protein does not react with tannin at all, isoelectric reacts with tannin at maximum weight ratio, cationic does so when this ratio is decreased.

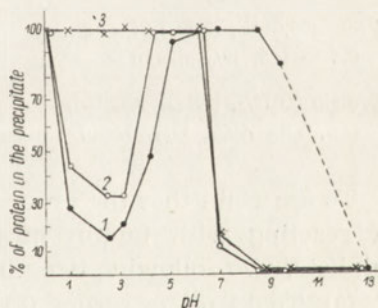


Fig. 1. Effect of pH on precipitation of 1. (●) lysozyme, 2. (○) serum protein, and 3. (×) gelatine by tannin. Protein 0.01%, tannin 0.01%, P : T = 1.

Effect of salts

Table 4 shows that saturated and half saturated ammonium sulphate did not affect the precipitation of protein by tannin from 0.01% solution of serum proteins (P:T = 1) at pH 5.6. From such diluted solutions protein was not salted out even with saturated ammonium sulphate (30 min. at room temperature), however, in 0.5N-HCl-phenol solution ammonium sulphate precipitated completely protein in absence of tannin.

Table 4

Effect of ammonium sulphate on precipitation of serum proteins by tannin at weight ratio (P:T) = 1, and at pH 5.6 and pH < 1

Composition of sample	pH	Recovery of protein in precipitate (%)	
		without tannin	with 0.01% tannin
Protein 0.01%, (NH ₄) ₂ SO ₄ sat.	5.6	5	100
Protein 0.01%, (NH ₄) ₂ SO ₄ half sat.	5.6	0	100
Protein 0.01%, (NH ₄) ₂ SO ₄ sat., 0.5 N-HCl, 1% phenol	<1	100	100
Protein 0.01%, (NH ₄) ₂ SO ₄ half sat., 0.5 N-HCl, 1% phenol	<1	100	100

To ascertain that the proteins from undiluted serum also retain ability of reacting with tannin in the presence of concentrated ammonium sulphate, two following experiments were made:

(a) To 0.1 ml. of serum, 0.1 ml. of 4% solution of tannin in 0.9% NaCl was added. The precipitate was centrifuged and washed with distilled water until removing excess of tannin, and then suspended in 0.3 ml. of saturated ammonium sulphate. The content of the tube was thoroughly stirred, and after 30 min. centrifuged again. The supernatant was free from protein. The precipitate was washed with water until the reaction for sulphate ion was negative, and then was dissolved in 0.1 N-NaOH. The protein was estimated by Kjeldahl method and by turbidimetric tannin method. The results of both estimations agreed fairly. All protein was present in the precipitate.

(b) Serum proteins were salted out with ammonium sulphate (0.1 ml. of serum and 0.3 ml. sat. (NH₄)₂SO₄). After one hour the sample was centrifuged, then to the precipitate 0.1 ml. of 4% tannin solution was added and centrifuged again. Supernatant contained tannin and sulphate but no protein. The precipitate was washed with distilled water to remove

sulphate ions. In this case, too, the recovery of protein in the precipitate estimated by both methods was found to be complete.

Tannin was found not to be released from insoluble protein-tannin compounds in the presence of concentrated ammonium sulphate solutions. Similarly, 10% NaCl and 22% Na₂SO₄ were found not to alter the precipitation of protein by tannin nor to influence the dissociation of the protein-tannin compounds.

DISCUSSION

Quantitative relationship and mechanism of interaction of protein with tannin are till now unknown. Analogically to other alkaloid reagents it is generally assumed that carboxy-group of the tannic acid and basic groups of protein take part in the above reaction, in acid medium, with an excess of tannin, insoluble salts are formed. Precipitation of the isoelectric protein by tannin at constant weight ratio (P : T = 1), but not at the excess of tannin, and independently of the presence of neutral salts, indicate, however, that the insoluble protein-tannin compounds described in this paper are not salts. The fact that isoelectric protein, as well as cationic one, combines with tannin at constant weight ratio giving insoluble products, indicates that in the formation of these compounds the electrostatic forces may be or not be involved.

General formulations of the mechanism of formation of insoluble PT-compounds discussed on the basis of the above investigations are as follows: proteins are bonding with tannin, according to certain simultaneous reactions in which insoluble products differing from each other by per cent of protein and tannin are formed.

Equilibrium point of the reaction at given pH and temperature was found to depend on weight ratio of the reacting components only. Equilibrium point may be shifted in both directions by suitably changing concentration of tannin or that of protein. Compounds of different quantitative composition are formed according to the following reactions:

- (1) $P + T = PT$ (primary compounds),
- (2) $P^+ + nT^- = P(T)_n$ (final compounds).

Between these two forms there exists also a group of intermediate protein-tannin compounds.

Primary PT-compounds are probably formed from isoelectric protein and macromolecular tannic acid independently of dissociation of its carboxy-group. Acid pH renders the formation of primary PT-compounds difficult, and favours the formation of the secondary and final ones.

Formation of the primary compounds, in which probably hydrogen bonds take part, has been till now overlooked, because the excess of tannin introduced into the reaction mixture acidifies it and facilitates the dissociation of the basic groups of protein, and hence proper conditions for including the second mechanism have been created.

Secondary and final PT-compounds (reaction No. 2) are the ones in which positive charge of cationic protein has been neutralized by negative charge of tannic acid. This reaction accounts for the additional tannin needed in precipitation of protein in acid medium, and this was the cause that the insoluble PT-compounds have been considered so long as salts merely.

The data gathered so far are not sufficient to outlay the reaction mechanism exactly, but they challenge for the consideration that hydrogen bonds may take part in the formation of insoluble protein-tannin compounds (primary compounds). In the secondary and final compounds the electric forces are involved, too.

SUMMARY

1. Conditions for the precipitation of serum proteins, lysozyme, haemoglobin and gelatine by tannin have been established. Time, temperature, weight ratio, pH and the effect of the salts present have been considered.

2. Weight ratio and pH were found to be essential for the formation of insoluble protein-tannin compounds.

3. The precipitation of protein by tannin proceeds in several successive reactions. The first reaction leads to the formation of insoluble compounds, in the next tannin is linked to the former compounds.

4. At pH close to the isoelectric point of the protein, the weight ratio of protein to tannin sufficient for the complete precipitation of the protein was found to be 1 : 0.5.

5. Weight ratio of protein to tannin, needed for precipitation of protein, depends on the electric charge of the protein. Anionic protein does not react with tannin, isoelectric reacts with tannin at maximum weight ratio, cationic does so when this ratio is decreased.

6. Neutral salts do not alter the precipitation of protein by tannin nor they influence the dissociation of the insoluble protein-tannin compounds.

REFERENCES

- [1] Alderton G., Fevold H. J. *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
- [2] Drabkin D. L. *Arch. Biochem.* **21**, 224, 1949.
- [3] Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Biochim. Polon.* **2**, 279, 1955.
- [4] Michaelis L. *Biochem. Z.* **234**, 139, 1931.

NIEROZPUSZCZALNE POŁĄCZENIA BIAŁKA Z TANINĄ

Streszczenie

1. Ustalono warunki strącania taniną lizozymu, hemoglobiny, żelatyny oraz białek surowicy. Brano pod uwagę czas, temperaturę, stosunek wagowy białka do taniny, pH i obecność soli.

2. Wykazano, że stosunek wagowy i pH decydują o powstawaniu nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych.

3. Strącanie białek taniną przebiega w szeregu reakcji pośrednich. Pierwsza z nich prowadzi do powstania nierozpuszczalnych połączeń. W następnych tanina wiąże się z powstałymi poprzednio produktami reakcji.

4. Stwierdzono, że w pobliżu punktu izoelektrycznego białka, stosunek wagowy białka do taniny, wystarczający do zupełnego wytrącenia białka z roztworu, wynosi 1 : 0,5.

5. Stosunek wagowy białka do taniny potrzebny dla strącenia białka zależy od ładunku elektrycznego cząsteczki białkowej. Białko anionowe nie reaguje z taniną, izoelektryczne reaguje przy najwyższym stosunku wagowym białka do taniny, natomiast kationowe dopiero w miarę obniżania tego stosunku.

6. Sole obojętne nie wpływają na strącanie białek taniną, ani też nie wywołują dysocjacji nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych.

Otrzymano 13.4.1959 r.

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN

STUDIES ON REGENERATION OF PROTEIN FROM INSOLUBLE PROTEIN-TANNIN COMPOUNDS

I. REMOVAL OF TANNIN FROM THE PROTEIN-TANNIN COMPOUNDS BY CAFFEINE

Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Wrocław

The regeneration of protein from insoluble protein-tannin compounds [10] would be of practical interest for preparation of proteins only unless protein is not denatured when combining with tannin. The purpose of this study is to elucidate this question.

Liberation of protein from tannin compounds is accomplished by removing tannin. This problem has not been sufficiently studied though the removal of tannin is indeed essential for estimation, e. g. of enzymes activity in plant material containing tannins. Ehrenburg [5], and Oparin and Kursanov [12] have used animal proteins or their split products for the removal of tannin. Mehlitz and Mass [9] have proposed to oxidize tannins by shaking with air at alkaline pH.

The use of alkaloids for the regeneration of protein have not as yet been reported. The method for removing tannin from protein-tannin (PT) compounds by caffeine is described in this paper.

EXPERIMENTAL

Materials and methods described in the previous paper [10] have been used. Albumin from human normal serum purified and lyophilised, according to Korner and Debro [8] was obtained. γ -Globulin from human normal serum was obtained by salting out with 0.35 satur. ammonium sulphate. Serum globulins were salted out with sodium sulphate, according to Howe [7].

Caffeine and *coffeinum natrium benzoicum* (F. P. III), and other alkaloids (Merck p. a.), were used.

Paper electrophoresis and the quantitative determination of serum protein fractions were done according to Mejbaum-Katzenellenbogen and Dobryszczyka [11].

For tannin estimation the following colorimetric technique was worked out:

Reagents stock solutions: (I) ferric ammonium sulphate, 5%, (II) arabic gum, 10%, (III) 1M-acetate buffer, pH 4.6.

The "ferric reagent" was prepared just before use from the stock solution by mixing 1 ml. of No. (I) with 10 ml. of No. (II), and making up to 100 ml. with No. (III). For the determination in the presence of protein 30 g. of urea should be added. Urea rendered PT-compounds soluble and did not influence the colour.

Test: to 1 ml. sample containing 40 — 400 μ g of tannin 4 ml. of ferric reagent are added, mixed, and the optical density is measured. In the presence of tannin (or gallic acid) a blue colour, stable for about 1 hour

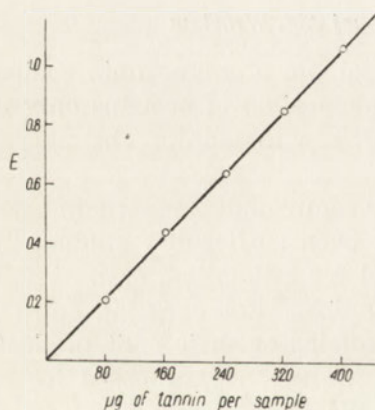


Fig. 1. Standard curve for the tannin determination. Final volume 5 ml. Details see Methods

arises. The optical density is measured in Hilger's absorptiometer with red filter ROR 2 (Chance) against a blank containing 1 ml. of distilled water and 4 ml. of ferric reagent.

Tannin concentration is calculated from the standard curve of tannin solutions ranging from 40 — 400 μ g per 1 ml. (Fig. 1). The extinction value for 100 μ g of tannin in 5 ml. of final volume was found to be 0.27.

RESULTS

Paper electrophoresis of PT-compounds

At first it was to establish whether it would be possible to get proper separation of serum proteins fractions without the removal of tannin from the compounds. The results of preliminary experiments are given in Table 1.

Table 1

Paper electrophoresis of serum proteins after PT-compounds have been dissolved in different solvents

Solvent	PT dissolved (g./100 ml.)	% of total protein in supernatant	Electrophoretic mobility
NaCl, 0.90%	1*	0	
NaOH, 0.1N	10	100	Protein on the start line
Sodium borate, 0.1N	5	100	Protein on the start line
Borate buffer, 0.1M, pH 9.2	3	100	Albumin unchanged, globulin fractions diffuse
Veronal buffer, pH 9.0, $\mu=0.06$	1*	10	Only weak peak of albumin visible
Borate buffer, 0.05M, pH 8.6	1*	0	
Borate buffer, 0.2M, pH 8.6	2*	45	Albumin and globulins unchanged
Urea, 500%	1	80	Protein on the start line

* PT-compounds have been only partly dissolved.

Buffer of pH about 9, used generally for electrophoresis of serum proteins, ensure to a certain degree the solubility of PT-compounds. The tannic acid at this pH should move towards the anode, independently of protein. The experiments were carried out with serum proteins, precipitated by tannin at pH 5.6, the ratio of protein to tannin being 1 by weight. The precipitate dried in a desiccator over CaCl_2 was found to contain protein (45%), tannin, water and some contaminations. Table 1 shows percentage of total protein released from compounds in various solvents, and the behaviour of proteins in paper electrophoresis. The examined preparation was easily soluble in 0.1 N-NaOH. During electrophoresis of this solution the protein remained on the start line, and tannin migrated towards anode, giving few fractions. The tannin fractions were dyed green and blue by the traces of metals present in solution, or red (products of oxidation).

The best separation of protein fractions was obtained after dissolving PT-compounds in 0.2 M-borate buffer of pH 8.6. At this pH and ionic strength the protein did not denature, but the solubility of PT-compounds was rather low (1 g. per 100 ml. of buffer). In more basic pH (9.2) the PT-compounds dissolved up to 5 g. per 100 ml., but a part of the protein remained on the start line. The released tannin migrated along with protein fractions. The obtained pattern was diffuse and difficult to interpret. In veronal buffer the PT-compounds dissolved with consi-

derably greater difficulty than in the borate one of the same pH. In 50% solution of urea PT-compounds dissolved, but the whole protein remained on the start line.

These experiments show that a loss of electrophoretic mobility of serum proteins fractions is due to the procedure of dissolving PT-compounds. This leads to the conclusion that the protein should be regenerated without first dissolving the PT-compounds.

Removal of tannin from protein-tannin compounds

It was to ascertain whether tannin in PT-compounds is able to react with caffeine or other alkaloids.

Table 2 summarizes results obtained from experiments aiming at regenerating protein from precipitated PT-compounds by the addition

Table 2

Regeneration of serum proteins from tannin compounds by various alkaloids

To 0.1 ml. serum (7 mg. protein) 0.1 ml. 7% tannin was added. After 15 min. the samples were centrifuged. To the precipitate 0.1 ml. 0.9% NaCl, and alkaloid were added, then mixed and centrifuged. Protein and tannin were determined in the supernatants. In the control test alkaloid was omitted, the PT-precipitate was dissolved in 0.1 ml. 0.1 M-sodium borate, and 7 mg. protein and 5 mg. tannin were found. For paper electrophoresis 0.02 ml. of supernatant or serum were applied.

Alkaloid added	Supernatant		Paper electrophoresis (% of the total protein)				
	protein %	tannin %	Albumin	Globulins			
				α_1	α_2	β	γ
Caffeine, 14 mg.	75	9	52	7	11	12	18
Caffeine, 50 mg.	75	—	Mobility of albumin and globulins unchanged; traces of tannin.				
<i>Coffeinum natr. benzoi-</i> <i>cum</i> , 20 mg.	80	28	54	6	10	10	20
<i>Coffeinum natr.* benzoi-</i> <i>cum</i> , 50 mg.*	100	100	Mobility of serum fractions unchanged, but the pattern is diffuse; high amount of tannin.				
Quinine hydrochloride, 16 mg.	18	—	Small amount of protein on the start line.				
Theobromine, 16 mg.	traces	—	Small amount of protein on the start line.				
Strychnine nitrate, 16 mg.	traces	—	Small amount of protein on the start line.				
Serum (untreated sample)			56	6	9	12	17

* PT-compounds were completely dissolved, precipitate did not form.

of various alkaloids. Serum proteins were precipitated with an equal amount of tannin (7 mg. of tannin and 7 mg. of protein), then centrifuged and the whole precipitate (about 0.1 ml.) was treated with about 0.1 ml. of 0.9% NaCl, and various alkaloids in amounts given in Table 2. After 30 minutes the samples were centrifuged, then the protein and tannin content in supernatants were estimated. The PT-precipitate dissolved in 0.1 M-sodium borate, alkaloid being omitted (control test) contained 7 mg. protein and 5 mg. tannin. Caffeine (14 mg.) added to the PT-precipitate was found to react with tannin and to give insoluble caffeine-tannin compounds. The supernatant contained 75% of protein and only 9% of tannin. 90% of tannin remained in the precipitate bound with caffeine and protein. In this experiment the serum proteins regenerated by caffeine retained unaltered mobility in paper electrophoresis. The distribution of serum protein fractions after regeneration by caffeine was found to be the same as that of the untreated sample. 50 mg. of caffeine added to the precipitate, containing 7 mg. of protein in the PT-compounds did not increase the amount of protein in the supernatant. On the other hand, if caffeine, slightly soluble in water, was replaced by 50 mg. of well soluble *caffeinum natrium benzoicum*, the precipitate was completely dissolved. An excess of *caffeinum natrium benzoicum* dissolved caffeine-tannin compounds, too. The obtained electrophoretic pattern of serum protein fractions is similar to that obtained with PT-precipitate dissolved in 0.2 M-borate buffer of pH 8.6.

Caffeine cannot be replaced by other alkaloids examined, i. e. by strychnine, theobromine or quinine, because they either do not react with tannin bound with protein in PT-compounds, or they denature protein.

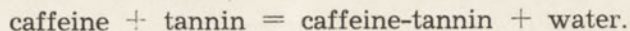
Optimal conditions for tannin precipitation by caffeine

When considering the possibility of using caffeine for the regeneration of various proteins from their PT-compounds, one of the first points is to establish the conditions of the reaction between tannin and caffeine.

Molecular weight of tannin (1700) is nearly 9 times higher than that of caffeine (194). Solubility of caffeine increases with increasing temperature, as well as in the presence of sodium benzoate or sodium salicylate. Decrease of temperature, addition of hydrochloric acid or ammonium sulphate results the precipitation of crystalline caffeine. In several experiments it was established that caffeine may be precipitated from solutions containing even below 0.1 g. per 100 ml. by using 1% tannin. The precipitate obtained was insoluble in water and in the presence of some

excess of caffeine. It dissolved after heating, in borate buffer of pH 8, or in 15% solution of *coffeinum natrium benzoicum*.

The reaction between tannin and caffeine is expected to proceed stoichiometrically, according to the following equation:



This reaction has been studied at room temperature at different pH, and at different molar ratios of reaction components. Varying amounts of caffeine were added to 1% tannin (0.006 M) solution in 0.05 M-veronal-acetate buffer. After 30 minutes the samples were centrifuged, and tannin in the supernatant was colorimetrically determined. The precipitates were dissolved in 0.1 M-sodium borate, and tannin precipitated by caffeine estimated. Table 3 shows the percentage of tannin recovered in supernatants at different pH's of the solution and at different molar ratios of caffeine to tannin. At molar ratio 0.5 and pH 4.1, the reaction proceeds stoichiometrically for half of tannin content is found in the supernatant. At other pH and the same ratio caffeine does not precipitate tannin.

Table 3

Effect of pH and molar ratio of caffeine to tannin ([C] : [T]) on formation of insoluble caffeine-tannin compounds

To 1 ml. of 0.05 M-veronal-acetate buffer of different pH, 10 mg. tannin and following amounts of caffeine were added: 0.53, 1.56, 2.5, 5, 10, 20, or 30 mg. (Tannin concentration 0.006 M, caffeine varying from 0.003 to 0.15 M). Samples were centrifuged and tannin was determined in supernatants and in precipitates dissolved in 0.1 M-sodium borate. The numbers indicate the percentage of tannin not precipitated by caffeine.

pH	[C]:[T]	% of tannin found in supernatant						
		0.5	1.4	2.25	4.5	9	18*	27*
2.6	—	—	—	28	12	18	—	—
3,2	90	—	—	28	12	9	12	12
4.1	45	—	—	24	10	9	12	12
4.7	100	—	—	24	12	9	12	12
5.3	100	56	—	28	12	9	15	14
6.4	100	—	—	30	14	10	15	14
7.0	100	—	—	32	16	16	15	—
7.4	100	—	—	30	14	16	15	—
7.9	100	—	—	46	20	32	15	—
8.6	100	—	—	40	40	28	—	—

* Caffeine has been only partly dissolved.

When the concentration of caffeine exceeded that of tannin ([C]:[T]>1) free tannin was found at all pH's examined. The best yield of insoluble caffeine-tannin compounds was obtained by using 4.5 moles of caffeine for 1 mole of tannin. Further increase of caffeine concentration remained

without effect on the equilibrium point of the reaction, however, the maximum yield of the reaction products is obtained within larger range of pH.

The reaction of tannin precipitation by caffeine is reversible, equilibrium point depending on temperature, pH, and on molar ratio of the reagents. At room temperature at neutral or acidic pH's 88 per cent of tannin may be precipitated by using 0.5 g. caffeine for 1 g. tannin, the molar ratio [C] : [T] being 4.5.

Reaction between tannin and caffeine in the presence of protein

Caffeine as well as protein reacts with tannin giving insoluble compounds. The both reactions are reversible. Formation of insoluble products depends on pH and on concentration of reactants. To recover proteins from insoluble PT-compounds such a concentration of components should be chosen, that tannin in the presence of both caffeine and protein should react first with alkaloid.

Table 4

Effect of varying amounts of caffeine on precipitation of serum proteins by tannin, at weight ratio of protein to tannin being 2, pH 5.3

20 mg. protein, 10 mg. tannin, and varying amounts of caffeine, in 1 ml. of 0.05 M-veronal-acetate buffer. [C] : [T] molar ratio of caffeine to tannin

Caffeine mg./ml. of sample	[C]:[T]	% of protein found in	
		precipitate	supernatant
0.0		100	0
2.0	1.8	73	27
4.0	3.6	55	44
6.0	5.4	45	54
8.0	7.2	26	74
10.0	9.0	15	85
12.5	11.4	12	90
15.0*	13.6	13	87
20.0*	18.0	13	87

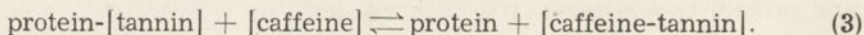
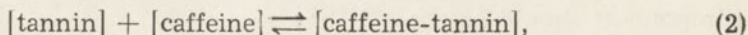
* Caffeine has been only partly dissolved.

In Table 4 data are summarized, illustrating the effect of varying caffeine concentrations on precipitation of serum protein at constant tannin concentration. Composition of samples was as follows: 20 mg. protein, 10 mg. tannin, and varying amounts of caffeine, in 1 ml. of 0.05 M-veronal-acetate buffer, pH 5.3. After 30 minutes the samples were centrifuged, and the protein was estimated both in supernatant and in the precipitate

dissolved in 0.1M-sodium borate. In the sample without caffeine total protein was found to be in the precipitate, in the form of insoluble PT-compounds. When concentration of caffeine in the reaction mixture increases, the precipitation of protein by tannin decreases, and the precipitation of tannin by caffeine increases in parallel. When concentration of caffeine reaches up the range of 9 moles per 1 mole of tannin, about 13 per cent of protein is found in the precipitate, while 87 per cent of protein remains in the supernatant. Further increase of caffeine concentration does not affect this picture.

It can be seen from the above that the concentration of caffeine is controlling the reaction occurring between protein and tannin.

Libration of protein from the PT-compounds can be understand as two-step reaction:



The PT-compounds differ one from another in their composition as well as in the way of bonding of tannin, depending on conditions under which they have been formed [10]. In the first step under certain conditions PT-compounds can dissociate in minimal extend to protein and tannin. In the second step tannin is bound into tannin-caffeine compound. When dissociation of PT-compounds is practically complete (e.g. at pH's above the isoelectric point of the protein), the equilibrium point of the reactions (2) and (3) is not influenced by concentration of the protein. In the experiment reported in Table 4, the precipitation of tannin by caffeine is inhibited by protein, since the equilibrium of the reaction (3) has been shifted to the right at the caffeine concentration of 9 moles per 1 mole of tannin, but not at that of 4.5 moles as it has been observed in the reaction without protein.

The concentration of caffeine required for liberation of about 87% of protein from PT-compounds is determined not only by tannin content but also by the way in which it is bound with protein. To establish the amount of caffeine necessary for obtaining the maximal efficiency in the removal of tannin, it is better to base on the protein content, which is constant, than by varying and only approximatively known tannin concentration.

For satisfactory yield in the regeneration of protein from the PT-compounds 1 to 2 g. of caffeine per 1 g. of protein should be used.

Concentration and purification of protein by the use of tannin and caffeine (general principle of the procedure)

The results of described experiments can be applied to concentrate protein in diluted solutions. For this purpose the following three steps are applied: precipitation of protein, removal of non-protein components, recovery of protein.

(a) *Precipitation of protein by tannin.* Various proteins can be completely precipitated by an equal amount of tannin, when pH of the reaction mixture will be lower than the isoelectric point of the most acidic protein present in the sample. Protein solutions should be diluted down to the concentration below 0.1%, and in such a case tannin concentration of below 0.05% is sufficient for the complete protein precipitation. Tannin at this concentration is not likely to react with other compounds besides protein.

(b) *Removal of non-protein components.* PT-precipitates isolated by centrifugation are practically insoluble in water in the presence of small amounts of tannin. The precipitate can be washed with water without loss and thus purified from non-protein, water soluble contaminations. It should be emphasized to wash the precipitate so thoroughly as possible to remove free tannin. When the content of non-protein compounds is exceedingly high, diluted tannin solution (below 0.04%) should be used for the prolonged washing needed in these cases.

(c) *Recovery of protein from the PT-compounds.* The washed PT-precipitate is suspended in small amount of a solution in which the PT-compounds do not dissociate, but protein present in the precipitate, after removal of tannin could be well soluble. After centrifugation the supernatant is discarded, and the precipitate added with caffeine (*in substantia*), in an amount equal to, or twice that of the protein present. The precipitate and the caffeine is stirred with glass rod. If the amount of caffeine is the adequate one, after some minutes of mixing a foaming liquid separates, the precipitate becoming granular. It is of advantage to cool the samples up to 5° and to spin off the caffeine-tannin precipitate at that temperature. After centrifugation the supernatant was found to contain on average 80% of the protein from the PT-compounds, small amounts of tannin derived from dissociation of insoluble tannin-caffeine compounds (about 12%) and caffeine not exceeding 1%.

The percent of protein regenerated by caffeine from PT-compounds depends on quality as well as on quantity of the solvent retained by the precipitate. When the volume of the PT-precipitate is too small, its

protein concentration being therefore too high, solvent should be added after caffeine but before centrifugation, to give final protein content in supernatant not exceeding 2%.

Some physico-chemical and biological properties of regenerated proteins

After the optimal conditions for the regeneration of serum protein have been established, the physico-chemical and biological properties of the regenerated protein were to be examined and compared with the properties of the native ones. It has been reported above (Tabl. 2) that protein precipitated by tannin from normal human serum and regenerated by caffeine exhibited in paper electrophoresis an unaltered pattern of serum fractions. This is, however, no evidence that proteins of diluted serum would behave in the same way.

Table 5

Determination of serum protein fractions in untreated serum as well as in reconcentrated

A/G, albumin: globulin ratio. For the electrophoresis 0.02 ml. samples were applied on paper. Details of electrophoresis and determination of serum protein fractions in text.

	Howe's method (7)			Paper electrophoresis (% of the total protein)				
	Total protein (g./100ml.)	Albumin (g./100ml.)	A/G	Albumin	Globulins			
					α_1	α_2	β	γ
Untreated serum	6.0	3.8 (63)*	1.7	59	4	6.2	14	17.8
Serum reconcentrated by tannin and caffeine, after 100 times dilution	2.3	1.44 (63)*	1.7	58	3.3	5.5	14.4	18.6

* % of total protein.

Table 5 shows the results of experiments in which proteins from the 100 times diluted serum have been reconcentrated. The reaction mixture contained: 0.06% protein, 0.04% tannin and 0.05 M-veronal-acetate buffer, pH 4.6. 120 mg. of caffeine were added to PT-compounds isolated from 100 ml. of the mixture and washed once with 0.9% NaCl. About 2 ml. of 2.3% protein solution were obtained after centrifugation of the caffeine-tannin precipitate. Thus 40-fold reconcentration of protein has been achieved. 10 mg. of protein were found in the precipitate, what represented 16% of the original amount (60 mg.). Data from the Table 5, as well as the electrophoretic patterns of proteins (Fig. 2), show that the electrophoretic mobility and percentage of protein fractions remain unchanged, as compared with untreated sample of the same serum.

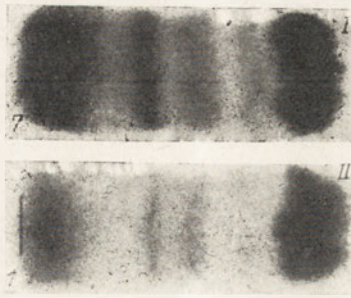


Fig. 2. Paper electrophoresis of untreated serum and after regeneration. (I) Untreated serum, 6% of protein. (II) 100 times diluted serum reconcentrated by tannin and caffeine up to the protein concentration 2.3% (quantitative determination in the Table 5)

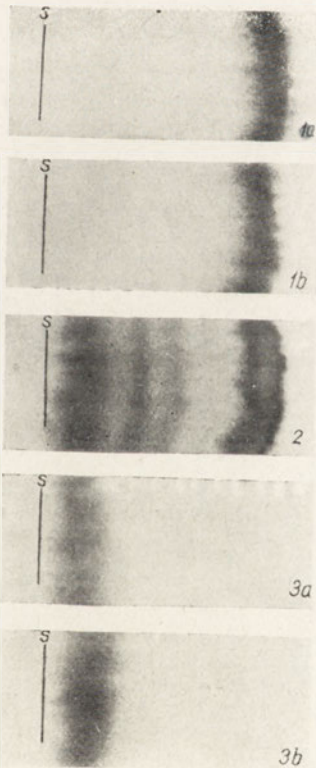


Fig. 3. Paper electrophoresis of albumin and γ -globulin from the untreated serum as well as from the regenerated one. (1) Serum albumin (a) untreated sample, conc. 1.8%, (b) 30 times diluted and then reconcentrated up to 1.8%. (2) Total serum protein conc. 7% (3) γ -globulin (a) conc. 1.8%, (b) 30 times diluted and reconcentrated up to 2.1%

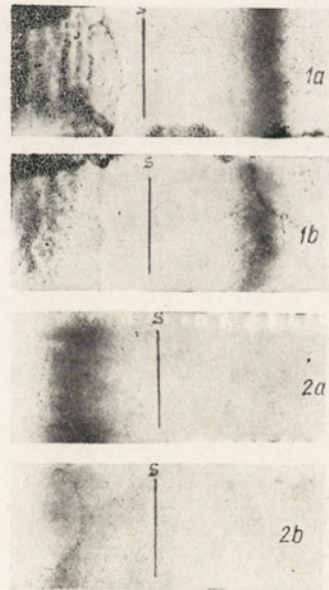


Fig. 4. Paper electrophoresis of horse haemoglobin and of lysozyme untreated and regenerated. (1) Haemoglobin (a) untreated, conc. 2.2%, (b) after 40 times dilution and reconcentration by tannin and caffeine to 2%. (2) Lysozyme (a) untreated conc. 2%, (b) 40 times diluted and reconcentrated up to 1.5%

Albumin-globulin ratio, according to Howe [7] was estimated in a sample of serum and in regenerated proteins from the same serum. 1.9 ml. of 22% Na_2SO_4 solution were added to 0.1 ml. of serum (6% protein) and to 0.1 ml. of regenerated protein (2.3%). The samples were allowed to stand for 3 hours at 35°, then filtered, and albumin was determined by tannin micromethod in 0.02 ml. of the filtrate, pipetted into 1 ml. of 0.9% NaCl. Albumin fraction in the both samples of serum (untreated and regenerated) was found to be 63%. Since in the Howe's method besides albumin, α -globulin pass also into the filtrate, the percentage of albumin obtained is higher than that found in paper electrophoresis [6].

Even some small fractions such as α_1 -globulin, giving a concentration in the reaction mixture hardly of 0.002%, were completely accounted for in the regenerated protein. Moreover, this protein retained its solubility in 22% Na_2SO_4 unaltered. The euglobulin fraction was also completely regenerated.

Preparations of purified proteins such as haemoglobin, lysozyme, γ -globulin and albumin, after regeneration and reconcentration were found not to differ in the paper electrophoresis from the untreated ones (Fig. 3 and 4).

The regenerated serum retained the ability of agglutination of A group red cells, and did not agglutinate those of B group.

Labile in their structure serum protein fractions such as euglobulin, isoagglutinins and α -globulin were found not to lose the examined physico-chemical and biological properties by the described regeneration methods.

DISCUSSION

The described procedure worked out as a model one had found a number of applications in the analyses of protein, especially when other methods are not reliable. The application of tannin and caffeine to concentrate the proteins of cerebro-spinal fluid has been described by Bogusławska-Jaworska [2], and found to yield results within the range recorded by other workers.

Dobryszczyka [3] reported that the proteins of normal urine can be concentrated by the described method. Tannin was found to precipitate also mucoproteins differing in this respect from reagents usually used. The albumin of normal urine regenerated by caffeine produced precipitation lines in agar gel electrophoresis with antiserum prepared against human serum proteins.

PT-compounds may possibly occur as natural components of plant cells. Protein incorporated into these compounds would retain their physico-chemical and biological properties. This possibility has not been

admitted till now since the conditions generally chosen for precipitation of protein by tannin used to be far different from those *in vivo*. It would be interesting to investigate whether PT-compounds are formed in living plant cells, or if not, what mechanism may prevent tannins to react with cell protein. At any rate one would admit that the inhibitory action of tannins on enzymes is reversible. Organic bases or alkaloids present in great number in plants can play the role of "regenerators" of proteins from the tannin compounds. They react with tannin like proteins and give with it insoluble compounds. Alkaloids differ, however, from proteins and tannins by being rather insoluble in water. And that is probably the reason for which the inhibitory action of tannins on enzymes appears only in water extracts, in which the alkaloids do not pass. The enzymes activity or its absence in undestroyed intracellular structure might depend on a suitable ratio of concentrations of tannin to those of alkaloids, or other compounds reacting with.

SUMMARY

1. It has been shown that the protein is regenerated from insoluble protein-tannin compounds when tannin is removed by caffeine.

2. Optimal conditions have been established for formation of insoluble compounds of caffeine with free or protein-bound tannin.

3. It has been shown that protein recovery from protein-tannin compounds can reach up 87% when suitable amount of caffeine is used.

4. Serum proteins, haemoglobin, lysozyme, albumin and γ -globulin regenerated from compounds by caffeine were found to have the same electrophoretic mobility on paper as the untreated ones.

5. Serum proteins regenerated from protein-tannin compounds do not differ from the untreated ones of the same serum in their behaviour in salting-out procedure.

The author is much indebted to Mgr. Bronisław Kupiec, Director of Photography Department of Medical Academy for performing the photographs of electrophorograms.

REFERENCES

- [1] Alderton G., Fevold H. J. *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
- [2] Bogusławska-Jaworska J. *Arch. Ter. i Med. Dośw.* **7**, 153, 1959.
- [3] Dobryszcka W. *Arch. Ter. i Med. Dośw.* **7**, 491, 1959.
- [4] Drabkin D. L. *Arch. Biochem.* **21**, 224, 1949.
- [5] Ehrenburg M. *Biochem. Z.* **325**, 102, 1954.

- [6] Gutman A. B. *Adv. in Protein Chemistry* 4, 186, 1948.
- [7] Howe P. E. *J. Biol. Chem.* 49, 93, 1923.
- [8] Korner A., Debro J. R. *Nature* 178, 1067, 1956.
- [9] Mehrlitz A., Mass H. *Biochem. Z.* 276, 85, 1935.
- [10] Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Bioch. Polon.* 6, 375, 1959.
- [11] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Dobryczycka W. *Clin. Chim. Acta.* 4, 515, 1959.
- [12] Oparin A., Kursanov A. *Biochem. Z.* 209, 181, 1929.

BADANIA NAD REGENERACJĄ BIAŁEK Z NIEROZPUSZCZALNYCH POŁĄCZEŃ BIAŁKOWO-TANINOWYCH

I. USUWANIE TANINY KOFEINĄ Z POŁĄCZEŃ BIAŁKOWO-TANINOWYCH

Streszczenie

1. Wykazano, że białko z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych można odzyskać po usunięciu taniny kofeiną.
2. Określono optymalne warunki dla powstawania nierozpuszczalnych połączeń kofeiny z taniną wolną lub związaną z białkiem.
3. Wykazano, że białko można odzyskać z połączeń z taniną stosując odpowiedni nadmiar kofeiny z 87% wydajnością.
4. Stwierdzono, że białka surowicy oraz oczyszczone preparaty hemoglobiny, lizozymu, albumin i γ -globulin regenerowane z połączeń białkowo-taninowych nie różnią się ruchliwością elektroforetyczną na bibule od białka rodzimego.
5. Stwierdzono, że białka surowicy regenerowane opisaną metodą nie różnią się rozpuszczalnością w solach od białka rodzimego.

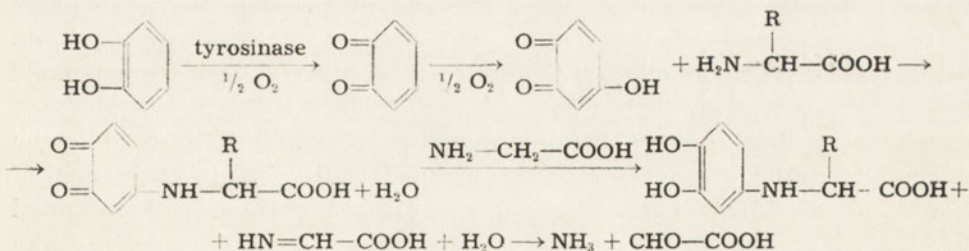
Otrzymano 13.4.1959 r.

HANNA MICHAŁEK and LUDMIŁA SZARKOWSKA

THE QUINONE-AMINO ACID COMPLEXES AND POLYPHENOLASE

Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
Kierownik: Prof. dr Józef Heller

Szent-Györgyi in 1925 [8] observed that some red substance was formed when catechol was oxidized by the fresh potato or mushroom extracts. Platt and Wormald [7] showed that the coloration appeared when the catechol oxidation was induced by tyrosinase in the presence of amino acids. The studies carried out by James and his co-workers [1,4,5] led to the conclusion that the red substance was a complex of *o*-quinone with amino acids, and moreover that this complex played some role in the oxidation of amino acids, especially of glycine, alanine and leucine. According to the reports quoted above, the following scheme might illustrate the formation of complexes and their role in the amino acids oxidation.



The authors assumed, as it is evident from the scheme, the possibility of formation of complexes in their phenolic form, and thus they explained the observed oxygen uptake by an enzymatic oxidation of the phenol groups formed. Jackson and Kendal [3] studying the complexes formed by iminoacids (proline and hydroxyproline) with the products of the enzymatic catechol oxidation suggested a similar reaction scheme, i.e. the formation of both phenolic and quinone form of the complexes, and they considered the phenolic form to be autooxidable. They demonstrated also the simultaneous liberation of hydrogen ions.

Quinones, amino acids and phenols as well as phenol oxidizing enzymes are largely distributed in plant and animal tissues. The two redox systems,

namely this of *o*-quinone-catechol and that of *p*-quinone-hydroquinone differ considerably. The former oxidizes non-enzymatically many substances while the latter acts only very slightly in this way, but on the other hand, it oxidizes enzymatically some common biological substances such as DPNH by means of quinone reductase. Thus the problem of *p*-quinone-amino acid complexes is by far more interesting for biologists than that of *orto*-complexes.

Inspired by the studies of James and of other authors on the role of tyrosinase in the formation of *orto*-complexes, we have studied the formation of *p*-quinone-amino acid complexes and the possible role of laccase in this process.

MATERIAL AND METHODS

The mushroom *Boletus badius* is known to grow rapidly livid in air due to the action of a polyphenolase called laccase. These mushrooms were homogenized with two volumes of water, centrifuged at 18 000 *g*, the sediment was discarded while the liquid was treated with solid ammonium sulphate up to 0.8 saturation and centrifuged at 3000 *g*. The precipitate was then dissolved in the volume of water equal to that of the initial extract, the insoluble proteins were discarded and the supernatant treated once more with ammonium sulphate in the same manner. The precipitate collected after centrifugation at 3 000 *g* was suspended in water (1/10 of the initial extract volume) dialyzed for 65 hours against water in order to remove phenols, quinones, amino acids and ammonium sulphate. Then water was added to the preparation until 1 ml. of the solution corresponded to 2 g. of fresh mushrooms tissue. The whole procedure was carried out at 0°. The protein content was determined by Kjeldahl method while the enzymatic activity was estimated manometrically in the presence of hydroquinone (Wosilait, Nason and Terrel [10]). The O₂ uptake amounted 94 μl. per hour and per mg. of protein. The preparation was stored in small portions at -10°, and each portion was defreezed just before the experiment. The laccase activity did not change during the whole period of investigation (4 weeks).

The estimation of oxygen uptake. The experiments were carried out in Warburg apparatus in air at 30°. The total volume of reacting mixture was 3.0 ml. The final concentrations of various components were as follows: 0.06 M-phosphate buffer, pH 7.0; 0.002 M-*p*-quinone; 0.02 M-amino acids except for tryptophan and cystine, where 0.01 M solutions were used for their slight solubility; 0.01 M-thiourea and 1 ml. of enzymatic preparation with an activity of 204 μl./hour. Sodium hydroxide was used to neutralize the solutions of hydrochlorides of arginine, histidine and lysine, ornithine

hydrobromide and of glutamic acid. There was 0.2 ml. of 10% KOH in the central vessel while *p*-quinone was placed in the side arm and the remaining components in the main vessel. Temperature was adjusted during 10 minutes, then the vessels were closed and the contents of the side arms transferred into main vessels. The readings were taken at 20 min. intervals until the last reading did not exceed 2 μ l. Usually this was attained after about 4 hours.

The determination of ammonia. Ammonia was determined by the Conway method [2] in 1 ml. of the mixture after Warburg's experiment.

Chromatography. The ascending paper chromatography was carried out on Whatman paper. No. 1 at room temperature in butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 5 v/v) for about 15 hours. Papers were sprayed with silver nitrate according to Trevelyan *et al.* [9] or with the mixture of 1% ferricyanide and 1% ferric chloride mixed just before use.

Spectrophotometry. In Unicam spectrophotometer* the hydrogen lamp was used for the wavelength from 240 to 320 m μ , while the tungsten one served for measurements made between 320 and 600 m μ . The samples were diluted so as to obtain extinction values in the range from 0.3 to 0.8, and the results were recalculated for a 1:10 dilution.

RESULTS

The oxygen uptake

When the colourless solution of anyone of the 21 amino acids examined was added to the slightly yellowish *p*-quinone solution, an orange coloration appeared changing into red subsequently. This proved the formation of a complex of both substances. In Warburg's type experiments this non-enzymatic complex formation was not accompanied by any oxygen uptake, but an oxygen uptake was observed in all experiments, where phenolase was also present. The proline and hydroxyproline complexes differed only by a deep cherry tint from complexes of other amino acids.

The oxygen uptake was measured in the system containing an amino acid, *p*-quinone and laccase. Three control tests were carried out in parallel to the proper ones: (a) without *p*-quinone, (b) with laccase inactivated by heating on boiling water bath for 15 minutes, and (c) without amino acid. The figures showing the oxygen uptake are listed in Table 1. It may be seen from it, that the rate of oxygen uptake differed from one amino acid to another. It was high, during the first hour and decreased gradually later in the presence of histidine, lysine, arginine, ornithine and glycine as well as of cytruline and proline. When other

Table 1

*The oxygen uptake by the p-quinone amino acids complexes*Values expressed in $\mu\text{l O}_2$. Experimental conditions described in the text

Amino acid	Incubation time (hrs)				Total
	1	2	3	4	
D,L-histidine	95.4	34.6	3.6	0	133.6
D,L-ornithine	84.0	25.0	3.2	0	112.2
D,L-lysine	74.9	21.4	7.5	2.3	106.1
D,L-glycine	62.0	29.2	3.6	0	94.8
L-arginine	67.4	17.5	9.4	0	94.3
D,L-cytruline	35.7	31.7	16.3	7.4	91.1
L-hydroxyproline	36.3	23.3	10.2	6.3	76.1
D,L-serine	35.5	43.2	18.3	4.2	101.2
D,L-methionine	30.0	48.4	12.0	4.0	94.4
D,L-treonine	10.2	63.5	22.2	6.0	101.9
D,L-leucine	19.8	53.1	24.3	5.2	102.4
D,L-norvaline	12.8	54.7	15.4	9.6	92.5
D,L-phenylalanine	19.3	42.0	22.1	9.2	92.6
D,L-norleucine	0	60.4	29.0	5.7	95.1
D,L-proline	24.8	33.1	7.5	4.0	69.4
D,L-valine	7.0	49.5	19.9	8.0	84.4
D,L-alanine	14.9	40.2	15.6	9.3	80.0
D,L-tryptophan	14.3	40.4	29.0	19.0	102.7
D,L-cystine	6.1	48.3	24.6	17.8	96.8
D,L-glutamic acid	13.6	33.3	10.7	8.6	66.2
D,L-asparagine	14.2	31.5	41.4	7.5	94.6

amino acids were used a lag period of different length with different amino acids was observed. The longest one was found with norleucine when no oxygen was absorbed during the first hour of incubation. The total oxygen uptake varied from 134 μl for histidine down to 66 μl for glutamic acid, what was equivalent of 1 to 2 gramatoms of oxygen per mole of *p*-quinone. In a test with active laccase 0.01 M-thiourea inhibited entirely the oxygen uptake. Since this inhibition is known to be specific for cupric enzymes and since the substrate was of *para* configuration, the obtained result indicated, that laccase is responsible for the oxygen uptake.

Chromatography

Since we could not state any oxygen uptake at all during the non-enzymatic complexes formation the schemes referred to above seemed not to be applicable. Therefore we submitted the incubated content of Warburg's vessels to paper chromatography, expecting to find some in-

intermediate or side products which might throw light on the real mechanism of the reaction.

On all chromatograms prepared both from the test with laccase and from the controls containing inactivated enzyme two spots were found. They had no reducing properties and were interpreted as corresponding to the quinone form of complexes formed by one and by two molecules of amino acid with *p*-quinone. One of the spots gave the positive reducing reaction when glycine was the amino acid used. We assumed this spot to be that of the complex of glycine and *p*-quinone in its phenolic form. Thus glycine would appear to be the only amino acid able to form complexes in their phenolic as well as quinone form.

The most significant for the understanding of the reaction mechanism under investigation was the finding — in experiments with inactivated laccase of a spot giving positive reducing reaction and having R_F 0.825, consistent with the known R_F of hydroquinone. This spot did never appear when active laccase was present in the incubation mixture.

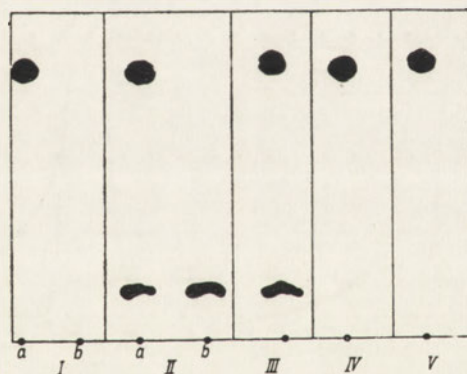


Fig. 1. The reducing spots found on chromatograms of the mixture (details see text, Warburg's experiments) incubated 4 hours containing: I. arginine, *p*-quinone and (a) inactivated enzyme, (b) active enzyme; II. glycine, *p*-quinone and (a) inactivated enzyme, (b) active enzyme; III. glycine, *o*-quinone, without enzyme; IV. hydroquinone standard; V. catechol standard.

Fig. 1 shows the chromatograms developed with silver nitrate. Arginine (I) and glycine (II) incubated 4 hours with *p*-quinone and with inactivated enzyme gave a spot of hydroquinone, while it did not so with active enzyme.

Since the occurrence of hydroquinone was of essential importance in the mechanism of complex formation, all amino acids listed in Table 1 were submitted after complexing to chromatographic analysis, and hydroquinone was stated in all cases.

After having demonstrated the formation of hydroquinone we wondered whether the same mechanism could be valuable in the case of *o*-quinone complexes. Thus the incubation mixture containing *o*-quinone and glycine was chromatographed, and the spot of catechol was found, its R_F being practically the same as that of hydroquinone (Fig. 1. III.). This indicated that the same mechanism of reaction was valuable for *o*-quinones, too.

Spectrophotometric studies

In parallel to chromatographic analysis spectrophotometric data were plotted for incubated mixture consisting of amino acid and *p*-quinone, with either active or with inactivated enzyme. Fig. 2 shows the curves

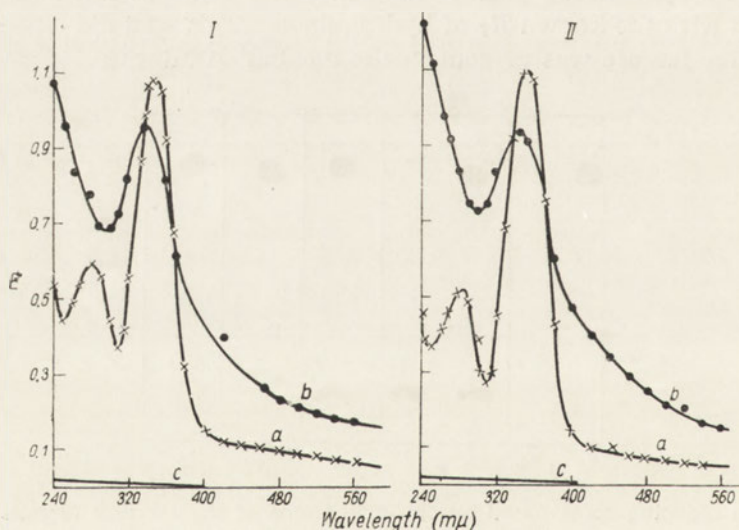


Fig. 2. Spectrophotometric curves of: I. *p*-quinone-glycine complexes and II. *p*-quinone-arginine complexes formed with a. (X) inactivated enzyme and b. (●) active enzyme, c. glycine or arginine solution, respectively. Incubation for 4 hours under the conditions described in text for Warburg's experiments.

obtained in this way for glycine and arginine complexes, respectively. The curves (a) show the absorptions with inactivated enzyme while the curves (b) present absorptions with active enzyme. The solution of enzyme in buffer has been used as blank in these measurements. The curves (c) show the absorption of glycine and arginine, respectively.

There are two peaks in curves (a), namely at 283 $m\mu$ and at 350 $m\mu$. Upon action of the enzyme the maximum at 283 $m\mu$ disappears while the

peak at $350\text{ m}\mu$ is slightly displaced towards short waves, and the absorption within the wide extent of visible rays increases considerably. This corresponds well with the increase of the intensity of the red colour as indicated by colorimetric measurements (Pulfrich Stufenphotometer, green filter S 50, vessel 0.5 cm.). The glycine complex in the presence of inactivated enzyme shows the absorption of 0.45, whereas 0.97 is found when active enzyme is present. The maximum at $283\text{ m}\mu$ is that of hydroquinone (see Fig. 3 a). The slight displacement of the peak may be attributed to the interference with the absorption due to the complex. The increase of the red colour intensity observed in the presence of active enzyme indicates that hydroquinone formed in the reaction is oxidized enzymatically to *p*-quinone; the last reacts with further amino acid molecules. It can be expected that with amino acids in excess practically the total amount of the quinone enters by this way into reaction. The disappearance of the peak at $245\text{ m}\mu$ pleads for this mechanism (see Fig. 3, b).

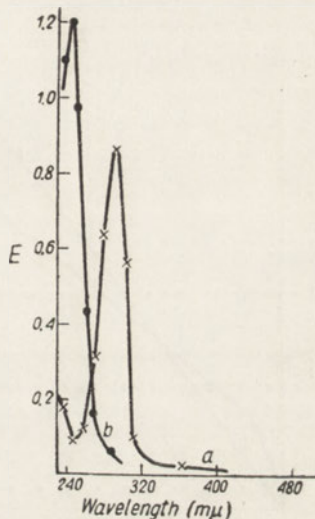


Fig. 3. Spectrophotometric curves of water solutions of a. (x) 3.66 mg% hydroquinone and b. (●) 0.81 mg% *p*-quinone.

The liberation of hydrogen ions

Jackson and Kendal [3] had observed the liberation of hydrogen ions, studying the system composed of catechol, amino acid and enzyme. We performed the similar studies by means of potentiometric titration in the mixture consisting of $42\text{ }\mu\text{moles}$ of *p*-quinone, $84\text{ }\mu\text{moles}$ of amino acid and 8 ml. of either active or inactivated enzyme at room temperature. The mixture was adjusted to pH 7.0 with 0.01 N-NaOH, the total volume was 10.5 ml., and the reaction was initiated by the addition of *p*-quinone solution. The amount of sodium hydroxide needed to keep the fixed pH was measured as the reaction proceeded.

The results are presented in Fig. 4 for glycine and hydroxyproline respectively. The curves show, that hydrogen ions are liberated during the formation of the complexes, probably due to the bounding of amino acids $-\text{NH}_2$ groups. In the absence of active enzyme the reaction stops after 3 hours evidently by the exhaustion of *p*-quinone which is partially bound in complexes with amino acids and partially reduced to hydro-

quinone. In the presence of active enzyme, however, the reaction runs further, since *p*-quinone is then reproduced by the oxidation of hydroquinone. The rather great acidification which is observed during the

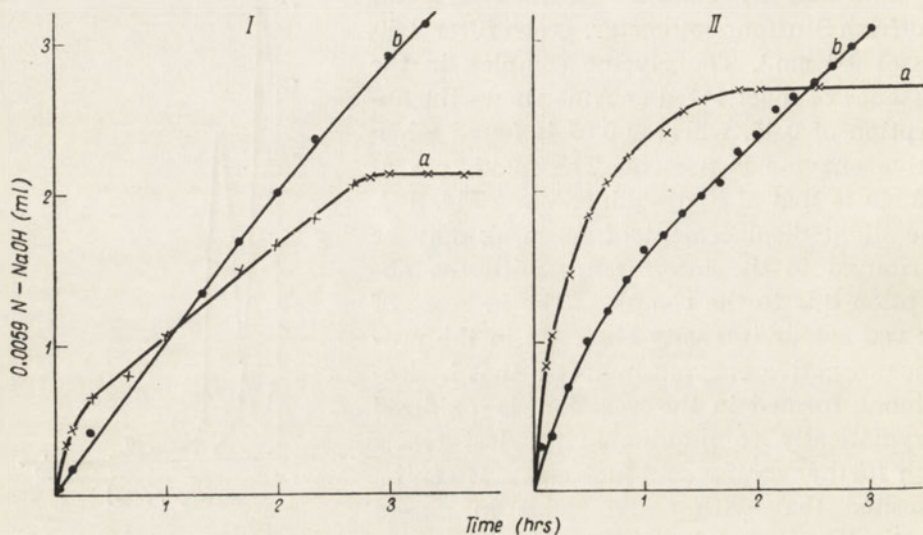


Fig. 4. Liberation of hydrogen ions during the formation of (I) *p*-quinone glycine complexes and (II) *p*-quinone hydroxyproline complexes with (x) inactivated enzyme and (●) active enzyme. Conditions of reaction described in the text.

initial stage of the reaction in the absence of active enzyme seems to be due to the accumulation of hydroquinone. In the presence of active enzyme hydroquinone is oxidized continually and so does not accumulate.

The determination of ammonia

No ammonia formation could be detected in experiments on *p*-quinone with anyone of the amino acid tested. Thus the desamination observed by James and his co-workers with *o*-quinone does not occur in this case.

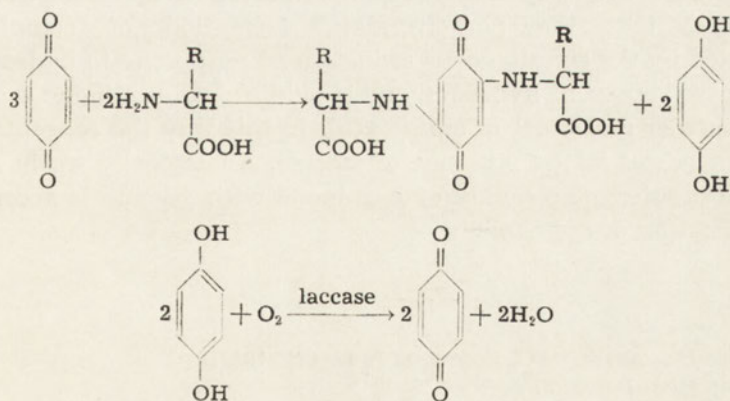
DISCUSSION

Complexes of *p*-quinone with amino acids are formed spontaneously and without any oxygen uptake in the experiments with inactivated enzyme. In the presence of active enzyme however we have stated oxygen uptake of 1 to 2 gramatoms of oxygen per 1 mole of *p*-quinone. The explanation of this oxygen uptake proposed by James *et al.* [5] as well as by Jackson and Kendal are not compatible with our results. Our

chromatographic studies have shown, that the formed complex (except that of glycine) is a non-reducing one, thus it involves a quinone form. We have found, however, the simultaneous formation of hydroquinone. The oxygen uptake in the presence of laccase can be simply explained by the oxidation of the hydroquinone formed and thus there is no need to speculate about an enzymatic oxidation of the complex. Since laccase oxidizes hydroquinone it yields *p*-quinone, and in this manner contributes to the formation of further complex molecules. This can be seen from spectrophotometric curves in which the hydroquinone's peak disappears under the influence of enzyme, while absorption due to the complex increases, simultaneously.

The acidification associated with the complex formation grows gradually during the whole observation time with an active enzyme, whereas a rapid initial increase of acidity followed by lower rate of pH changes down to a fixed level is observed when the enzyme has been inactivated. We suppose that the acidification is due to the neutralisation of amino groups bound in complex as well as to the acid reaction of the phenol formed. The latter is practically insignificant in the presence of active enzyme, thus the smooth titration curve with the active enzyme can be considered to represent only the complex formation.

The results discussed above lead us to suggest a scheme of the condensation process involving laccase. The maximal oxygen uptake indicates that the complex consists of one molecule of *p*-quinone and of two molecules of amino acid. Thus it appears necessary to introduce two further molecules of *p*-quinone into equation as hydrogen acceptors. The suggested scheme is as follows:



This scheme is analogous to that suggested by Lyons and Thomson (quoted after [6]) to explain the mechanism of formation of *p*-quinone—amines complexes.

According to our scheme every *p*-quinone molecule forming a complex is accompanied by two others being reduced to hydroquinone. Upon laccase action the last are oxidized to *p*-quinone and thus eventually give rise to further complex molecules. In such a way the maximal yield of enzymatic reaction may be three times that of non-enzymatic one. This hypothesis has found its full support in the results of spectrophotometric studies.

In our chromatograms we have also shown the presence of catechol during the formation of *o*-quinone-glycine complexes. This fact leads us to the conclusion that the oxygen uptake observed in systems: diphenol, amino acid and phenolase can be fully accounted for by the oxidative action of the enzyme on diphenols.

After this investigation has been finished and the results prepared for publication dr T. Mann F.R.S. (Cambridge) draw our attention to a paper of E. Fischer and H. Schrader (Ber. Dtsch. Chem. Ges. **43**, 525, 1910). Hydroquinone has been obtained as crystals by Fischer from the solution, where amino acid ester and *p*-quinone were reacting to form the red complex.

SUMMARY

We have studied the formation of complexes of *p*-quinone with 21 amino acids and the role of laccase in this process. In the experiments in Warburg apparatus we have stated that the complexes are formed non-enzymatically without the consumption of oxygen. In the presence of laccase (from mushrooms) the uptake of oxygen is 1 to 2 gramatoms per mole of *p*-quinone. Chromatographically and spectrophotometrically we have found that the non-enzymatic formation of complexes is accompanied by the simultaneous reduction of *p*-quinone to hydroquinone. When laccase is present hydroquinone is oxidized to *p*-quinone condensing with the further molecules of amino acid. In this way the concentration of complex increases in the presence of laccase. Analogically we have found that the formation of complex of *o*-quinone with glycine is accompanied by the formation of catechol.

REFERENCES

- [1] Beevers H., James W. O. *Biochem. J.* **43**, 636, 1948.
- [2] Conway E. J. *Biochem. J.* **29**, 2755, 1935.
- [3] Jackson H., Kendal L. P. *Biochem. J.* **44**, 477, 1949.
- [4] James W. O., Beevers H. *Biochem. J.* **43**, XI, 1948.
- [5] James W. O., Roberts E. A. H., Beevers H., de Kock P. C. *Biochem. J.* **43**, 626, 1948.
- [6] Nelson J. M., Dawson C. R. *Advances in Enzymology* **4**, 99, 1944.

- [7] Platt B. S., Wormald A. *Biochem. J.* **21**, 26, 1927.
[8] Szent-Györgyi A. *Biochem. Z.* **162**, 399, 1925.
[9] Trevelyan W. E., Procter D. P., Harris J. S. *Nature* **166**, 444, 1950.
[10] Wosilait D. W., Nason A., Terrel A. J. *J. Biol. Chem.* **206**, 271, 1954.

KOMPLEKSY CHINONO-AMINOKWASOWE A POLIFENOLAZA

Streszczenie

Przebadano wytwarzanie kompleksów *p*-chinonu z 21 aminokwasami i rolę lakazy w tym procesie. W doświadczeniach w aparacie Warburga stwierdzono, że kompleksy powstają nieenzymatycznie bez zużycia tlenu. W obecności lakazy z grzybów następuje zużycie tlenu od 1 do 2 gramoatomów na mol *p*-chinonu. Chromatograficznie i spektrofotometrycznie wykazano, że nieenzymatycznemu powstawaniu kompleksów towarzyszy redukcja części *p*-chinonu na hydrochinon. W obecności lakazy hydrochinon utlenia się na *p*-chinon, który kondensuje z dalszymi cząsteczkami aminokwasu. W ten sposób w obecności lakazy stężenie kompleksu rośnie przeszło dwukrotnie. Analogicznie wykazano powstawanie katecholu przy tworzeniu kompleksu *o*-chinonu z glicyną.

Otrzymano 19.5.1959 r.

S. ANGIELSKI and J. ROGULSKI

AMINOACIDURIA CAUSED BY MALEIC ACID

III. THE EFFECT OF SULFHYDRYL COMPOUNDS

*Pracownia Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Gdańsku
Kierownik: prof. dr Wł. Mozołowski*

Morgan and Friedmann [11] in 1938 were the first to demonstrate the reaction of sulfhydryl groups with maleic acid and to test it by the preparation of corresponding compounds. They have shown that maleic acid inhibits some reactions catalyzed by the enzymes containing SH groups [12].

The effect of injection of maleic acid, i. e. aminoaciduria in rachitic rats [7] and rats fed on diet containing lactose [1, 2] can be explained by the inhibitory action of maleic acid on some enzymatic systems in the kidney, which (besides other factors) are responsible for the reabsorption of amino acids in the kidney tubules. It was known for a long time that toxic action of inhibitors of SH groups such as arsen [15, 16] and mercury compounds [3, 5] or alloxan [9, 10, 14] can be reversed or greatly diminished when sulfhydryl compounds such as BAL, GSH, cysteine are applied simultaneously. It was shown that BAL abolished the diuresis by mercuric compounds [4, 17].

From those facts we have assumed that the administration of sulfhydryl compounds could reverse the action of maleic acid which caused aminoaciduria. We have therefore performed the experiments on rats using cysteine, glutathione and BAL.

METHODS

Experiments were performed on white male rats weighing 150-300 g. which came partly from P.Z.H. in Warszawa, partly from our own breeding. Animals were kept in metabolic cages which allowed quantitative urine collection. Before the experiments began, rats had been kept about

10 days on milk diet [2]. Food and water were allowed *ad libitum*. Amino nitrogen was estimated according to Yemm and Cocking [19] in urine collected during 24 hours.

Maleic acid (Schuchardt) was given subcutaneously in a single dose of 300 mg. (2.6 mM) per 1 kg. body weight. The solution was adjusted to pH 7.2 by sodium hydroxide. The concentration being 1M, a single dose was therefore 0.26 ml. per 100 g. rats body weight.

Glutathione (Merck) was injected subcutaneously immediately after the solution had been adjusted to pH 7.0 with sodium hydroxide. The glutathione was administered either as a single dose 800 mg. per 1 kg. body weight, given together with maleic acid, or in two portions: first 800 mg. together with maleic acid, and another 800 mg. 5 minutes afterwards. Concentration of the solution of glutathione was 0.26 or 0.52M.

Cysteine was given as 0.26 M solution of cysteine hydrochloride (Gliwice) immediately after it had been adjusted with sodium hydroxide to pH 7.0 in a dose of 400 mg. per 1 kg. body weight together with maleic acid. The content of sulfhydryl groups of glutathione and cysteine was controlled by iodometric titration, and theoretical values were found.

BAL (Hynson, Westcott and Dunning Baltimore, 10% solution in arachid oil containing 20% of benzyl benzoate) was injected intramuscularly in the whole dose 175 mg. per 1 kg. of body weight in three portions, namely: 75 mg. with maleic acid, 50 mg. 90 minutes later, and further 50 mg. after next 60 minutes. In preliminary experiments the dose of 60 mg. or 100 mg. per 1 kg. of rats body weight was given together with maleic acid.

RESULTS

The result are illustrated in the Table 1. In the previous paper it was shown that single subcutaneous administration of maleic acid in a dose of 300 mg. per 1 kg. of rats body weight causes tenfold increase in the excretion of amino nitrogen in urine. The administration of BAL, glutathione or cysteine does not increase the excretion of amino acids. Aminoaciduria is completely abolished, if, together with maleic acid, BAL is administered in such quantities that the number of sulfhydryl groups is the same as the molecules of maleic acid used. Administration of cysteine or glutathione even in an amount twice as large as the equimolar amount of maleic acid does not fully inhibit aminoaciduria but definitely decreases it.

The way of administration of BAL needs certain explanation. Initially BAL was given in a single dose of 60 mg. per 1 kg. of body weight

Table 1

Influence of sulphydryl compounds (BAL, glutathione and cysteine) on aminoaciduria caused by maleic acid in rats kept on milk diet for 10 days

The figures represent the average amounts of milligrams of α -amino-nitrogen excreted during 24 hours. The numbers in parantheses are the minimal and maximal values

Series of experiments	Doses in mmole per 1 kg. body weight	Number of rats	Before administration (mean from 2 days)	α -amino-nitrogen				
				1	2	3	4	5
I	Maleic acid 2.6	6	4.2 (2.7-5.5)	20.3 (9.1-58.0)	34.6 (22.5-54.4)	16.0 (11.2-25.5)	9.9 (6.5-17.4)	12.9 (4.7-25.1)
II	BAL 2.8	3	3.0 (2.6-3.6)	4.0 (3.0-5.0)	3.4 (1.6-4.8)	3.6 (2.7-5.0)	2.0 (1.8-2.3)	1.8 (1.7-2.0)
III	Maleic acid 2.6	8	4.5 (3.6-6.1)	5.8 (4.1-8.6)	4.3 (2.1-8.7)	3.3 (1.8-4.2)	5.3 (3.6-7.7)	6.6 (3.7-8.4)
IV	Glutathione 2.6	3	3.9 (2.8-4.6)	4.0 (3.0-4.7)	2.7 (2.6-3.1)	4.0 (2.0-6.0)	6.0 (5.6-6.7)	4.3 (2.1-6.2)
V	Maleic acid 2.6	5	3.4 (2.3-3.8)	12.6 (9.2-14.1)	8.7 (4.6-15.3)	7.8 (3.7-13.8)	8.8 (5.8-13.4)	7.4 (2.5-11.4)
VI	Maleic acid 2.6	5	3.5 (1.8-4.7)	22.4 (17.0-32.3)	9.0 (3.6-18.0)	4.7 (1.8-9.7)	3.8 (3.1-4.4)	4.9 (3.1-7.5)
VII*	Glutathione 5.2	3	2.0	2.0	2.8	2.6	2.4	—
VIII	Cysteine 2.6	9	2.2 (1.9-3.0)	8.2 (3.7-14.0)	13.4 (4.8-26.2)	6.0 (2.6-11.4)	5.3 (2.5-12.6)	—

* Rats were kept in one cage.

together with maleic acid, however, no definite inhibition of aminoaciduria was found. After the administration of 100 mg. BAL, three from total of five rats died in the first day after injection, and two which have survived showed no aminoaciduria. As was shown by Stocken and Thompson [15, 16] LD_{50} of BAL is equal 100 mg. per 1 kg of body weight. Therefore the main experiments were carried out similarly to those of Sen and Bhattacharya [14] who gave BAL in three portions to alloxan intoxicated animals.

DISCUSSION

The results of our experiments show that sulfhydryl groups play an essential role in the aminoaciduria produced by maleic acid. Administration of sulfhydryl compounds of small molecular weight abolishes completely (as is the case with BAL) or distinctly decreases (like glutathione and cysteine) aminoaciduria caused by maleic acid in rats kept on milk diet. The difference in action of physiological sulfhydryl compounds and BAL may depend on the fact that BAL forms a more stable compound with maleic acid than glutathione and cysteine. Glutathione and cysteine being the normal metabolites of organism undergo quick changes [6] and cannot so efficiently enter into reaction with maleic acid. The results described in this paper form a basis for assumption that reaction of maleic acid with sulfhydryl compounds showed by Weil Malherbe and others [18, 11, 12, 8, 13] *in vitro* can also take place *in vivo*.

We are very grateful to Prof. Wł. Mozołowski for many helpful advises and discussion.

We are much obliged to Prof. A. Szczygieł providing us with experimental animals.

SUMMARY

Maleic acid in a dose of 300 mg. (2.6 mM) per 1 kg. body weight causes aminoaciduria in rats kept on milk diet. Simultaneous administration of BAL in a whole dose of 175 mg. per 1 kg. body weight (2.8 mM of sulfhydryl groups) abolishes completely aminoaciduria. On the other hand, cysteine or glutathione in amounts equimolar or two times larger than maleic acid administered distinctly decreases aminoaciduria, but does not abolish it completely.

REFERENCES

- [1] Angielski S., Niemirowicz R., Makarewicz W. and Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* **5**, 431, 1958.
- [2] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E. and Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 295, 1959.
- [3] Aposhian H. V., Pointer M. S. *Federation Proceed.* **17**, 344, 1958.
- [4] Earle D. P., Berliner R. W. *Am. J. Physiol.* **151**, 215, 1947.
- [5] Farah A., Bender C. H., Kruse R., Cafruny E. *J. Pharmac. Experiment. Therap.* **125**, 309, 1959.
- [6] Goldzieher J. W., Besch P. K., Velez M. E., *J. Biol. Chem.* **231**, 445, 1958.
- [7] Harrison H., Harrison H. *Science* **120**, 606, 1954.
- [8] Lardy H. A., Philips P. H. *J. Biol. Chem.* **148**, 333, 1943.
- [9] Lazarow A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **61**, 441, 1946.
- [10] Lazarow A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **66**, 4, 1947.
- [11] Morgan E. J., Friedman E. *Biochem. J.* **32**, 733, 1938.
- [12] Morgan E. J., Friedmann E. *Biochem. J.* **32**, 862, 1938.
- [13] Peters R. A., Wakelin R. W. *Biochem. J.* **40**, 513, 1946.
- [14] Sen P. B., Bhattacharya G. *Science* **115**, 410, 1952.
- [15] Stocken L. A., Thompson R. H. S. *Biochem. J.* **40**, 535, 1946.
- [16] Stocken L. A., Thompson R. H. S. *Biochem. J.* **40**, 548, 1946.
- [17] Sussman R. M., Schack J. A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **66**, 247, 1947.
- [18] Weil-Malherbe H. *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.
- [19] Yemm E. W., Cocking E. L. *Analyst* **80**, 209, 1955.

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

III. WPLYW ZWIĄZKÓW SIARKOWYCH

Streszczenie

Kwas maleinowy w dawce 300 mg (2,6 mm) na 1 kg wagi wywołuje aminoacydurię u szczurów karmionych dietą mleczną. Równoczesne podanie BALu w całkowitej dawce 175 mg na 1 kg wagi (2,8 mm grup SH) całkowicie znosi aminoacydurię. Natomiast podanie cysteiny lub glutationu w ilości ekwimolarnej lub dwukrotnie większej w stosunku do kwasu maleinowego wyraźnie zmniejsza aminoacydurię wywołaną kwasem maleinowym, lecz nie znosi jej całkowicie.

Otrzymano 10.7.1959 r.

D. SHUGAR, A. ADAMIEC and EWA SZTUMPF

ROLE OF PEPTIDE BOND ABSORPTION IN PROTEIN PHOTOCHEMISTRY

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Zakład Biochemii, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

(Institute of Biochemistry and Biophysics

Department of Biochemistry, State Institute of Hygiene, Warsaw)

Most studies on the photochemistry of enzymes and proteins involve the use of mercury resonance lamps with maximum emission at 2537 Å. The extent to which peptide bond absorption contributes to photochemical effects at this, and longer, wavelengths is still a debated question. Rideal & Roberts [15], for example, calculated quantum yields according to two different assumptions: (a) that all radiation absorbed by the protein molecule is equally effective, and (b) that only radiation absorbed at the keto-imino linkages is involved. The latter assumption is subject to considerable doubts since, e. g., the inactivation of lysozyme is accompanied by the oxidation of tryptophane residues [19].

Investigations on the photolysis of model peptides and individual amino acids indicate that quantum yields for peptide bonds are too low to account for the quantum yields for enzymes [9, 12]; and the procedure followed by most observers has been to assume that all radiation absorbed acts with equal efficiency, although some evidence has been adduced for involvement of disulfide bridges in molecules with high cystine contents [18, 16].

The absorption of the peptide bond at wavelengths to the red of 2400 Å is usually quite small by comparison with that of other absorbing constituents in proteins, although there is still disagreement about its precise value, with suggestions for extinction coefficient, ϵ , ranging from 1-5 at 2537 Å [15, 13, 4]. At wavelengths below 2400 Å the peptide bond begins to absorb appreciably and to the violet of about 2200 Å represents one of the major sources of absorption of polypeptides [7, 4].

It would obviously be desirable to evaluate unequivocally the contribution of peptide bond absorption to enzyme inactivation by ultraviolet

light, but this has hitherto been difficult to achieve because of the lack of a suitable protein free from aromatic amino acids, cystine and cysteine, and exhibiting some kind of biological activity.

During the course of some studies on the degradation of apurinic acid (APA) by basic proteins [1, 10], it occurred to us that protamine, which is an aliphatic polypeptide free from cysteine and cystine, might prove suitable for this purpose. The degradation of APA by basic polypeptides hardly comes into the category of an enzymatic reaction. However, other basic proteins such as lysozyme and ribonuclease are inert towards APA if their native configuration (as determined by enzymatic activity) has been destroyed by heating. It appeared to us, therefore, that a comparison of the activity of protamine with that of lysozyme and ribonuclease against APA, following ultraviolet irradiation, might give some idea of the extent to which absorption at the keto-imino linkages is effective in producing inactivation.

MATERIALS AND METHODS

The APA used as substrate was prepared from highly polymerized DNA by two different procedures [6, 21, 22], but the results obtained were the same for both. Activity of the basic proteins against APA was measured as previously described [2] and based on the observation that degradation of APA is accompanied by (a) loss of free aldehyde groups and (b) a decrease in metachromasia against basic dyes.

Ribonuclease was a Worthington product, and lysozyme was a several times recrystallized isoelectric preparation isolated according to the procedure of Alderton & Fevold [3]. Several different protamine preparations were used, but our final results are based on those obtained with a sample kindly supplied by the late Prof. K. Linderstrom-Lang and the absorption spectrum of which has been reported upon by McLaren [11] and Claesson [5]. The optical density of this preparation at 2537 Å and at longer wavelengths is the lowest reported in the literature. Although the other protamine preparations used, kindly supplied by T. Spasowicz of the Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek (Warsaw Serum & Vaccine Plant), exhibited an optical density at 2537 Å 1.5 to 2 times higher, similar quantitative results were obtained, indicating that the absorbing impurities present were photochemically inert.

The proteins were irradiated in phosphate buffer at neutral pH and concentrations of 25-150 µg./ml. with a British Thermal Syndicate mercury resonance lamp. An aqueous acetic acid filter was used to remove traces of radiation below 2400 Å, when necessary. Incident intensities at 2537 Å were about 10^{17} quanta/cm.²/min. with the filter in place. Samples were

irradiated in 10-mm. quartz spectrophotometer cuvettes fitted with ground joints to eliminate possible interference from ozone during long irradiation periods. In effect exposures of more than several hours in open cuvettes were found to give erratic results which could be ascribed only to the ozone produced by the lamp. For some qualitative experiments an ordinary germicidal lamp was also employed.

RESULTS

The activity of protamine against APA as a function of time of irradiation is shown in Fig. 1, from which it is clear that irradiation at 2537 Å is without effect (see Discussion). At wavelengths below 2400 Å there is a gradual destruction of activity.

Fig. 2 exhibits the inactivation of protamine and lysozyme with the unfiltered lamp and of lysozyme with the filter in place. These curves

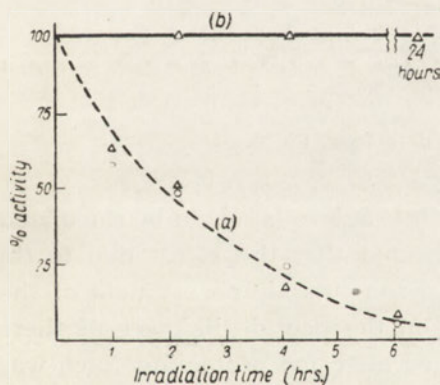


Fig. 1. Effect of ultraviolet irradiation on activity of protamine vs. APA (a) at 2537 Å plus traces of radiation below 2400 Å, (b) at 2537 Å. Activities measured by degree of metachromatic staining (Δ) and by presence of free aldehyde groups (\circ). Incident intensity of lamp about 10^{17} quanta/cm.²/min.

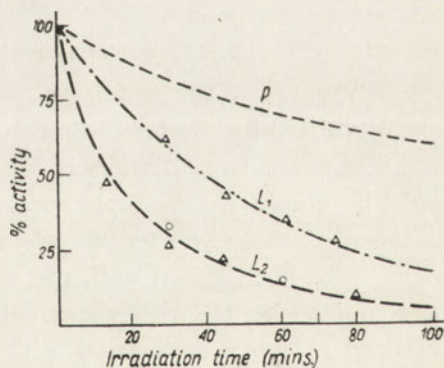


Fig. 2. Ultraviolet inactivation of protamine (P) with unfiltered source as compared to that of lysozyme with unfiltered source (L_2) and filtered source (L_1).

are therefore not strictly comparable since the protamine is affected only by radiation below 2400 Å whereas lysozyme is inactivated mainly by radiation at 2537 Å (see below). It should be mentioned that the behaviour of ribonuclease was completely analogous to that of lysozyme.

Using a filtered source it was found that the rates of inactivation of lysozyme (and ribonuclease), and hence also the quantum yields, were

similar to those previously reported for enzymatic inactivation of lysozyme [19] and ribonuclease [20, 18, 12]. In all instances inactivation followed a first-order course as for enzymatic inactivation (Fig. 3).

It was expected that removal of the filter would result in an increase in the rates of inactivation of these enzymes corresponding to (a) the increased light intensity at 2537 Å, and (b) the traces of radiation below

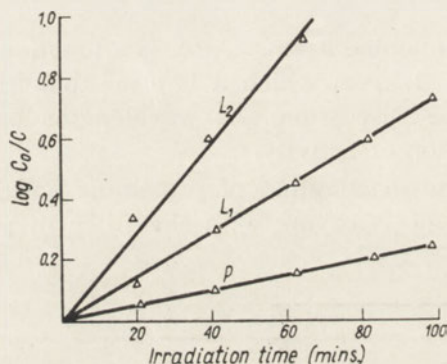


Fig. 3. Semi-log plot of data from Fig. 2

2400 Å emitted by the lamp. Since the effect due to (a) could be calculated from the filter transmission it was expected that the effect due to (b) would be obtained by simple subtraction and provide an estimate of the influence of these shorter wavelengths on the peptide linkages of these enzymes for comparison with the observed effect on protamine. Such was not found to be the case; removal of the filter resulted, indeed, in an increased rate of inactivation which, however, was found to correspond only to the increase in intensity at 2537 Å resulting from removal of the filter. This suggests that the shorter wavelengths involved are most likely in the region where the aromatic amino acids still exhibit appreciable absorption by comparison with the keto-imino linkages. In the absence of more definite information as to the wavelengths involved, little more can be said about this.

DISCUSSION

Some issue has been taken with regard to the choice of protamine as a model protein (cf. [4]), but the fact that it loses activity against APA at an appreciable rate under the influence of even traces of radiation

below 2400 Å suggests that it is, in fact, a suitable model. This argument is lent added weight by the fact that the quantum yields for inactivation of lysozyme and ribonuclease are the same for activity against either their natural substrates or apurinic acid.

The extinction coefficients of ribonuclease and lysozyme at 2537 Å are 5200 and 18 000, respectively. If we take the lower accepted limit for the extinction coefficient of the peptide bond at 2537 Å as 1 then, since each of the molecules has about 125 residues and hence about 125 peptide bonds, the % absorption of each of these proteins due to peptide bonds is 2.5% for ribonuclease and 0.7% for lysozyme. Consequently, during an exposure period of 24 hours, a given concentration of protamine will absorb 50% as much energy as a similar concentration of ribonuclease in 1 hour or 17% as much as a similar concentration of lysozyme in 1 hour. During 1 hour exposures both enzymes undergo appreciable inactivation (Fig. 2) at 2537 Å and even 17% of such inactivation would be very easily observed for protamine after 24 hours at 2537 Å which, however, is not the case (Fig. 1).

Consequently, the lack of inactivation at 2537 Å may be regarded as reasonable proof that the effect of such radiation on proteins and enzymes is manifested, not *via* peptide bond absorption in whole or in part, but rather as a result of absorption by aromatic amino acids, cystine and/or cysteine. It is worth noting in this connection that, although the % peptide absorption of ribonuclease is 3 times that of lysozyme, the quantum yields for both enzymes are practically the same, about 0.025 [19, 20].

The results obtained for irradiation below 2400 Å suggest also that protamine may be a very convenient model polypeptide for measuring quantum yields resulting from peptide absorption in this region of the spectrum. For this purpose a suitable monochromator would, of course be necessary. In view of the relatively low emission of good resonance lamps below 2400 Å, it is clear (from Figs. 1 and 2) that the quantum yields for inactivation at these shorter wavelengths must be quite high. Additional potential models for such studies include (a) the biologically active gramicidin S analogues synthesized by Katchalski, Berger, Bichowsky-Slomnicki & Kurtz [8] and some of which contain only aliphatic amino acids with chain lengths of 18 to 40 residues, (b) the synthetic tetra- and penta-aliphatic peptides exhibiting streptogenin activity reported by Merrifield & Woolley [14]. At these shorter wavelengths it is, of course, necessary to take into account the effects of irradiation on the amino acids themselves.

SUMMARY

Ultraviolet irradiation of lysozyme and ribonuclease results in a loss of ability to degrade apurinic acid. Inactivation is a first-order reaction with a quantum yield similar to that for enzymatic inactivation.

At 2537 Å (and longer wavelengths) the ability of protamine to degrade apurinic acid is unaffected by irradiation. At wavelengths below 2400 Å protamine is slowly inactivated, the reaction being first-order, but with a quantum yield which is probably very high.

It is concluded that peptide bond absorption is of negligible importance in protein and enzyme photochemistry at wavelengths above 2400 Å. Protamine and several other (biologically active) poly-peptides are suggested as suitable models for quantitative investigations on the role of peptide bond absorption in protein photochemistry at wavelengths to the violet of 2400 Å.

REFERENCES

- [1] Adamiec A. & Shugar D. *IVth Intern. Congr. Biochem.*, Vienna, Communication No. 3-14, 1958.
- [2] Adamiec A. & Shugar D. *Naturwissenschaften* **46**, 356, 1959.
- [3] Alderton G. & Fevold H. L. *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
- [4] Beaven G. H. & Holiday E. R. *Advances Prot. Chem.* **7**, 320, 1952.
- [5] Claesson I. M. *Arkiv for Kemi* **10**, 1, 1956.
- [6] Duránd M. C. & Thomas R. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 416, 1953.
- [7] Goldfarb A. R., Saidel L. J. & Mosovitch E. *J. Biol. Chem.* **193**, 397, 1951.
- [8] Katchalski E., Berger A., Bichowsky-Slomnicki L. & Kurtz J. *Nature* **176**, 118, 1955.
- [9] Mandl I., Levy B. & McLaren A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1790, 1950.
- [10] McDonald M. R. & Kaufmann B. P. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 387, 1954.
- [11] McLaren A. D. *Acta Chem. Scand.* **3**, 648, 1949.
- [12] McLaren A. D. *Enzymologia* **18**, 6, 1957.
- [13] McLaren A. D. & Waldt L. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 240, 1952.
- [14] Merrifield R. B. & Woolley D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6635, 1958.
- [15] Rideal E. K. & Roberts R. *Proc. Roy. Soc. A* **205**, 391, 1951.
- [16] Setlow R. *Ad. Biol. Med. Phys.* **5**, 37, 1957.
- [17] Setlow R. B. & Guild W. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 223, 1951.
- [18] Setlow R. & Doyle B. *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 27, 1957.
- [19] Shugar D. *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 302, 1952.
- [20] Shugar D. & Rzendowska F. *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **4**, 293, 1956; *Acta Biochim. Polon.* **3**, 595, 1956.
- [21] Tamm C., Hodes M. E. & Chargaff E. *J. Biol. Chem.* **195**, 49, 1952.
- [22] Tamm C. & Chargaff E. *J. Biol. Chem.* **203**, 689, 1953.

ROLA ABSORPCJI PRZEZ WIĄZANIE PEPTYDOWE W FOTOCHEMII BIAŁEK

Streszczenie

Promieniowanie pozafioletkowe niszczy w przypadku lizozymu i rybonukleazy ich zdolności do rozkładu kwasu apurynowego. Inaktywacja jest reakcją pierwszego rzędu o wydajności kwantowej zbliżonej do inaktywacji enzymatycznej.

Przy 2537 Å (i dłuższych falach) napromieniowanie nie powoduje u protaminy utraty zdolności rozkładu kwasu apurynowego. Przy długościach fal poniżej 2400 Å zachodzi powolna inaktywacja protaminy. Jest to reakcja pierwszego rzędu, lecz prawdopodobnie przebiega z wysoką wydajnością kwantową.

Wynika stąd, że absorpcja wiązań peptydowych odgrywa znikomą rolę w fotochemii białek i enzymów przy długościach fal powyżej 2400 Å. Przypuszcza się, że protamina i szereg innych (biologicznie czynnych) polipeptydów są odpowiednimi modelami do ilościowych badań nad rolą absorpcji wiązań peptydowych w fotochemii białek przy długościach fal poniżej 2400 Å.

Otrzymano 15.7.1959 r.

A. ADAMIEC and D. SHUGAR

TWO PROCEDURES FOR FOLLOWING THE KINETICS OF DEGRADATION OF APURINIC ACID

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Zakład Biochemii, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa
(Institute of Biochemistry and Biophysics
Department of Biochemistry, State Institute of Hygiene, Warsaw)*

Apurinic acid (APA) is of considerable interest from the point of view of the structure of the parent DNA from which it was derived, since it is devoid of purines and retains the original sequence of pyrimidine bases in fragments considerably smaller than those of DNA.

APA is degraded to still smaller fragments, not only under the influence of acid or alkali, but also by some cations [19], by basic proteins [10, 2, 3], and by heating at elevated temperatures even at neutral pH [2, 3]. The mechanisms involved in these various degradative procedure are still far from clear, although the products of degradation have been shown to be capable of yielding useful information regarding nucleotide sequences in the parent DNA from which the APA was derived [4, 5, 3].

Several methods have been developed for following the kinetics of degradation of APA. Tamm *et al.* [20] used a dialysis technique, involving the measurement of the rate of appearance of organic phosphorus or ultraviolet absorbing material outside the dialysis membrane. Durand & Thomas [7], using a different procedure for the preparation of APA, obtained a product which was insoluble in 1N-HCl, and the degradation of which could be followed by the appearance of acid-soluble ultraviolet absorbing material. This was also the technique adopted by McDonald & Kaufmann [10] for following the kinetics of degradation of APA by basic proteins. Both of these procedures are rather cumbersome and unsuitable for routine investigations.

During the course of some studies on the properties of various apurinic acids and their degradation by basic proteins and by heat, we have developed two new procedures for following the initial stage of degradation of APA. These are applicable to all apurinic acids irrespective of

the method of preparation, and the operations involved are less tedious. Furthermore, since basic proteins are active against APA only when the former are in the native state, a simplified technique for following APA degradation provides at the same time a method for following the degree of denaturation of a basic protein which does not exhibit enzymatic activity, such as protamine or cytochrome c. Advantage has already been taken of this fact to investigate the influence of ultraviolet radiation on protamine and, from this, the role of peptide bond absorption in protein photochemistry [15, 17].

One of these methods is based on the fact that, like RNA and DNA, APA exhibits appreciable metachromasia against basic dyes, an observation suggestive of the existence of uninterrupted tracts of pyrimidines [13, 3, 11]. Degradation results in a decrease in the degree of metachromatic staining in solution; a similar phenomenon has already been applied to the measurement of ribonuclease [14, 16] and desoxyribonuclease activities (F. Rzendowska & D. Shugar, unpublished).

The second method is dependent on the presence in APA of free aldehyde groups; these disappear irreversibly during the course of degradation and the rate of disappearance can be followed by means of the Schiff reagent.

MATERIALS AND METHODS

DNA was prepared according to Signer & Schwander [18], as well as from desoxyribonucleoprotein obtained by the method of Doty & Zubay [6]. The latter product was deproteinized first by the procedure of Marko & Butler [9], and finally according to Sevag *et al.* [12].

APA was prepared from the above DNA samples by three different methods [20, 7, 8]. The properties of these preparations have been described elsewhere [1].

A Bausch & Lomb Spectronic 20 colorimeter was used for measurement of metachromasia, as well as the colour produced in the Schiff reaction.

Metachromasia of APA

We have found a wide variety of basic dyes to exhibit metachromasia in the presence of APA. Only results for thionine will be presented here, since this dye is readily available and it is affected by APA to an extent equal to, and in most cases greater than that of, the other dyes tested.

Thionine is dissolved in distilled water, the solution filtered at room temperature, and is then stored in the cold room. The final solution should be diluted with distilled water, so that the optical density at 6000 Å is about 0.9. This solution may be kept for about 3 or 4 days.

The metachromasia provoked in such a solution by APA is shown in Fig. 1.

The magnitude of the metachromatic effect as a function of APA concentration, as measured by the drop in extinction of a solution of thionine at 6000 Å, is exhibited in Fig. 2. The volume of the APA

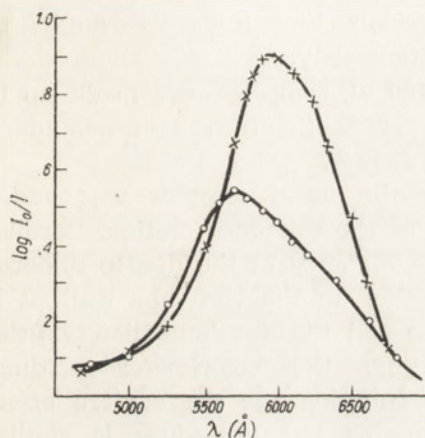


Fig. 1. Absorption spectrum of thionine (about 20 µg./ml.) in water in absence, (×), and presence, (o), of apurinic acid, 10 µg./ml.

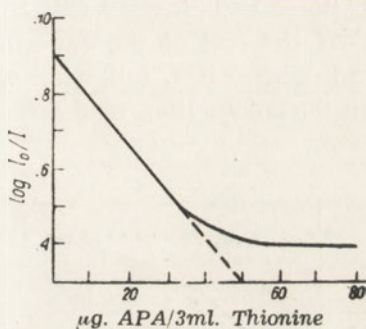


Fig. 2. Decrease in extinction of solutions of thionine in water (20 µg./ml.) at 6000 Å as a function of amount of apurinic acid (APA) added to solution

solution added to 3 ml. of thionine was 30 µl.; under these conditions any buffer contained in the APA solution is sufficiently diluted so that its influence on the degree of metachromasia is negligible.

It will be observed from the figure that the magnitude of the metachromatic effect at 6000 Å is practically linear over an APA concentration range of 0—30 µg. APA/3 ml. thionine, or 0—10 µg. APA/ml. thionine.

Aldehyde groups of APA

The Schiff reagent is prepared by the addition of 30 ml. of 0.1% basic fuchsin to 220 ml. of water saturated with SO_2 . The resulting solution is kept overnight in the cold room, following which it is colourless, and the pH is 1.5. The solution may be kept several months in the cold room.

A sample containing from 10—50 µg. of APA is made up to a volume of 1 ml. with water. To this is added 2 ml. of the Schiff reagent and the optical density of the resulting solution read at 5500 Å.

General procedure

In a typical experiment for following the thermal degradation of APA, a solution of the sodium salt (1 mg./ml.) was mixed with an equal volume of 0.02 M-phosphate buffer pH 7.2. The resulting solution was then heated in a water or oil bath (in the temperature range 70°—100°) in a stoppered container to prevent evaporation. At various time intervals samples of 100 μ l. and 60 μ l. were withdrawn, simultaneously.

At the end of the experiment the 100 μ l. samples were made up to 1 ml. with water, following which 2 ml. of the Schiff reagent was added and the colour then read after 1 hour at 5550 Å.

To the 60 μ l. samples was added 3 ml. of the thionine solution. Because of the tendency of the dye to undergo adsorption on the test tube wall, it is best to add the dye immediately prior to taking the colorimeter reading.

In studying the degradative effect of proteins the procedure is similar to the above. In a typical experiment a solution of APA (1 mg./ml.) is mixed with an equal volume of a solution of protein buffered at the appropriate pH, and the resulting solution heated at about 55°. At appropriate time intervals 100 μ l. and 60 μ l. samples are withdrawn and treated as above. The concentration of protein necessary varies from 0.50 mg./ml. for ribonuclease to 0.25 mg./ml. for lysozyme, and 0.1 mg./ml. for protamine.

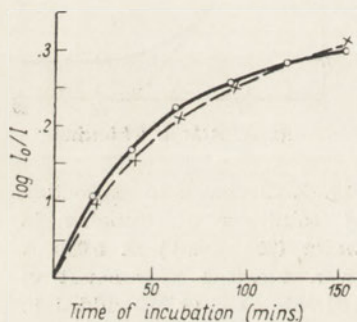


Fig. 3. Course of degradation of apurinic acid (1 mg./1 ml.) by lysozyme (0.25 mg./ml.) at 55° and pH 7.2 in 0.02M-phosphate buffer, as followed by decrease in metachromasia, (o) and loss of free aldehyde groups, (x)

Fig. 3 shows a typical curve for the degradation of APA by lysozyme. At the concentrations used, the proteins are without influence on the degree of metachromasia.

COMMENTS

It is essential to bear in mind that the above procedures apply only to the initial stages of degradation of APA. Either of the two techniques, or both, may be used for this purpose, as is clear from Fig. 3. The rate of liberation of inorganic phosphate may serve for following the subsequent stages of degradation [3].

These procedures have already proven useful in differentiating between apurinic acids prepared from thymus DNA by different methods, the differences being reflected in different activation energies for thermal degradation at approximately neutral pH [1]. They should also prove useful for examining the degradation mechanisms of APA by various agents. Finally, they make available an artificial "substrate" for such enzymes as ribonuclease and lysozyme and for non-enzymatic basic proteins such as protamine, histone, cytochrome c. Using APA as substrate, it would be interesting to examine the "behaviour" of fractionated protamines and histones.

SUMMARY

Two techniques are described for following the kinetics of initial degradation of apurinic acids by basic proteins, cations, heat, etc. They involve measurement of the disappearance of (a) metachromasia against basic dyes, such as thionine, and/or, (b) free aldehyde groups with the Schiff reagent.

These procedures make it possible to study more readily the mechanism of degradation of apurinic acids by various agents, as well as to use apurinic acid as a "substrate" for non-enzymatic basic proteins.

REFERENCES

- [1] Adamiec A. *Doctorate thesis*, 1959.
- [2] Adamiec A. & Shugar D. *IVth Intern. Congr. Biochem.*, Vienna, Communication No. 3—14, 1958.
- [3] Adamiec A. & Shugar D. *Naturwissenschaften* **46**, 356, 1959.
- [4] Brown D. M. & Todd A. R., in *The Nucleic Acids* (E. Chargaff & J. N. Davidson eds.), Vol. I, Chapt. 12, 1955, Academic Press, New York.
- [5] Cohn W. E. & Volkin E. *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 359, 1957.
- [6] Doty P. & Zubay G. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 6207, 1956.
- [7] Durand M. C. & Thomas R. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 416, 1953.
- [8] Laland S. G. *Acta Chem. Scand.* **8**, 449, 1954.
- [9] Marko A. M. & Butler G. C. *J. Biol. Chem.* **190**, 165, 1951.
- [10] McDonald M. R. & Kaufmann B. P. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 387, 1954.
- [11] Michelson A. M. *J. Chem. Soc.*, p. 1371, 1959.
- [12] Sevag M. G., Lackman D. B. & Smolens J. *J. Biol. Chem.* **124**, 425, 1938.
- [13] Shapiro H. S. & Chargaff E. *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 608, 1957.
- [14] Shugar D. *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **1**, 39, 1953.
- [15] Shugar D. *1st Intern. Symp. Lysozyme*, Milan (Italy), 1959.
- [16] Shugar D. & Rzendowska F. *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **4**, 293, 1956; *Acta Biochim. Polon.* **3**, 595, 1956.
- [17] Shugar D., Adamiec A. & Sztumpf E., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 417, 1959.
- [18] Signer R. & Schwander H. *Helv. Chim. Acta* **32**, 853, 1949.
- [19] Tamm C. & Chargaff E. *Nature* **168**, 916, 1951.
- [20] Tamm C., Hodes M. E. & Chargaff E. *J. Biol. Chem.* **195**, 49, 1952.

DWIE METODY BADANIA KINETYKI ROZKŁADU KWASU APURYNOWEGO

Streszczenie

Podano dwa sposoby śledzenia kinetyki początkowego rozkładu kwasu apurynowego pod wpływem białek zasadowych, kationów, temperatury lub innych czynników. Metody oparto na pomiarach utraty: (a) metachromazji wobec zasadowych barwników, takich jak tionina oraz (b) wolnych grup aldehydowych oznaczanych odczynnikiem Schiffa.

Ten sposób postępowania ułatwia znacznie badania mechanizmu rozkładu kwasu apurynowego pod wpływem szeregu czynników, jak również pozwala na użycie kwasu apurynowego jako "substrat" dla nieenzymatycznych białek zasadowych.

Otrzymano 15.7.1959 r.

J. PAWEŁKIEWICZ, W. WALERYCH i B. BARTOSIŃSKI

BADANIA NAD BIOSYNTEZĄ ZWIĄZKÓW KORFIRYNOWYCH***3. IDENTYFIKACJA KOBALAMINY γ_1 JAKO GUANOZYNOTDWUFOSFORANU WITAMINU B_{12P} (CZYNNIKA B)*****Katedra Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu**Kierownik Katedry: doc. dr J. Pawełekiewicz*

W roku 1956 Pawełekiewicz i Zodrow [19] wyodrębnili z kultury *Propionibacterium shermanii* hydrofilną korfiryne, którą następnie opisał bardziej szczegółowo Pawełekiewicz [16] jako kobalaminę γ_1 . Jest to związek elektroujemny, wędrujący ku anodzie również przy pH 2,7, i słabo przesuwający się z miejsca startu w metodach chromatografii bibułowej. Kobalamina γ_1 posiada widmo absorpcji z maksimami przy 272—273, 321, 355, 405, 498 i 530 m μ (forma jednocyjanowa). Po zadaniu roztworu kobalaminy γ_1 nadmiarem NaCN otrzymuje się jej formę dwucyjanową z charakterystycznym dla tych pochodnych widmem z maksimami przy 275, 312, 367, 415—420, 540 i 580 m μ (Rys. 1). Widmo absorpcyjne kobalaminy γ_1 nie różni się od widma witaminu B_{12P} . Kobalamina γ_1 jest czynna mikrobiologicznie wobec *E. coli* 113—3 [16].

Kobalamina γ_1 swymi własnościami przypomina wyodrębnione w śladowych ilościach przez Forda i Portera w 1952 r. tzw. czynniki C [6, 10]. W następnych latach izolowano z różnych źródeł cały szereg nie zidentyfikowanych bliżej korfiryn o własnościach czynników C. I tak Juillard wyodrębniła z *Bacillus megaterium* dwa takie czynniki [9]. Jeden z nich, na-

* Dla podstawowego pseudoporfirynowego pierścienia charakterystycznego dla wszystkich związków z grupy witaminu B_{12} (nazywanych dotąd związkami kobalaminowymi) zaproponowano nazwę korynu (ang. "corrin"). Podobnie całą grupę tych związków nazywamy teraz korfirynami — I.U.P.A.C., "Nomenclature of Organic Chemistry, 1957", Butterworths, Scient. Publ., 1958, str. 85 oraz Smith E. L., w "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor", H. C. Heinrich, Stuttgart, 1957, str. 554.

** Zgłoszono jako doniesienie na III Międzynarodowe Sympozjum Witaminowe, Poznań 21—24 września, 1959.

Część 2. [20].

Koszty związane z przeprowadzeniem powyższej pracy zostały pokryte z dotacji Komitetu Biochemicznego Wydz. II PAN.

zwany przez autorkę czynnikiem B traci swe elektroujemne własności w trakcie oczyszczania i stawał się elektroobojętny. Podobne kwaśne związki izolowała Neujahr ze ścieków miejskich [15], a niedawno Porter i Dollar z *Veillonella alcalescens* [22]. Jednakże mikrogramowe ilości, w jakich je otrzymano, nie pozwoliły na ustalenie ich budowy czy znaczenia. Dopiero w 1957 roku badacze włoscy Di Marco i współpracownicy [1, 5] wyodrębnili w większych ilościach z *Nocardia rugosa* elektroujemny analog o własnościach czynników C, który zidentyfikowali jako guanozynodwufosforan czynnika B.

W pracy niniejszej opisano nową i wygodną metodę izolacji kobalaminy yl z kultur *Propionibacterium shermanii*, oraz przedstawiono dane identyfikujące kobalaminę yl jako guanozynodwufosforan witaminu B_{12p} (czynnika B).

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

METODA IZOLACJI I OCZYSZCZANIA KOBALAMINY YI

Hodowlę bakterii propionowych przeprowadzano według Pawełkiewicza i Zoodrowa [21]. Do odwirowanych komórek dodawano wody w ilości odpowiadającej 1/3—1/2 objętości pożywki; całość rozbijano w homogenizatorze na równomierną suspensję, dodawano ok. 50 mg NaCN na litr zawiesiny, doprowadzano pH do 6,0—6,5 i autoklawowano 15 minut w temperaturze 110°. Po ostudzeniu próbę odwirowywano, sączono dodatkowo przez sączek z ubitej miazgi bibułowej i do klarownego przesączu dodawano 0,5% aktywowanego węgla "Carbopol H2" o pH 6—7. Po 12 godzinach węgiel odsączano, dobrze przemywano wodą, a następnie korfiryny eluowano 65% etanolem zawierającym ok. 3% benzenu [14]. Eluat zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości, koncentrat, zwykle mętny po zagęszczeniu, pozostawiano na 24—96 godzin w chłodni w temperaturze 4°. W tym czasie wytrąca się biały osad, który odsączano przez sączek z miazgi bibułowej. Klarowny roztwór zakwaszono kwasem octowym do pH 4—5 i parokrotnie ekstrahowano z niego wszystkie korfiryny 50% (v/v) fenolem w chloroformie. W razie potrzeby płyn przed rozdzieleniem faz wirowano. Połączone klarowne wyciągi fenolowe przemywano jeden raz równą objętością wody, a przechodzące w małych ilościach do wody korfiryny reekstrahowano mieszaniną fenolu w chloroformie (1:1). Roztwór korfiryn zadawano teraz 2 objętościami chloroformu i 1 objętością *n*-butanolu i ciecz ekstrahowano wielokrotnie małymi porcjami wody do całkowitego usunięcia barwnych związków z fazy organicznej. Uzyskany wodny koncentrat korfiryn ekstrahowano trzy razy chloroformem dla usunięcia śladów fenolu, po czym odparowywano go do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem.

Suchą pozostałość rozpuszczano w małej objętości 0,5% HCN, a następnie wlewano na kolumnę chromatograficzną wypełnioną dwuetyloaminoetylo-celulozą (DEAE-celuloza) przygotowaną w następujący sposób. Handlowy preparat DEAE-celulozy (F-my Schleicher i Schüll, Dassel) zawieszano w wodzie i wlewano do kolumny z płytką piankową Jena nr G2, po odcieknięciu wody kolumnę kilkakrotnie przemywano 5% roztworem NaCl zalkalizowanym amoniakiem (ok. 5 ml amoniaku, $D = 0,9$, na 100 ml 5% roztworu NaCl), a następnie wodą do całkowitego usunięcia NaCl i amoniaku. Tak przygotowany preparat DEAE-celulozy zawieszano w 0,3% HCN, wlewano do szklanej kolumny chromatograficznej i przemywano kilka razy 0,3% HCN.

Korfiryny przemywano na kolumnie najpierw 0,3% roztworem HCN, który usuwał tylko czysty witamin B_{12p} . Związek ten bowiem w formie dwucyjanowej jako elektroobojętny nie jest zatrzymywany na anionicie. Po usunięciu witaminu B_{12p} , wszystkie pozostałe korfiryny, prócz kobalaminy γ l wypłukiwano 0,01M- CH_3COOH . Kobalamina γ l pozostawała u szczytu kolumny. Wymywano ją ostatecznie 5% roztworem NaCl w 0,02 M-kwasie octowym. Roztwór kobalaminy γ l odsalano przez ekstrakcję 50% fenolem w chloroformie jak opisano wyżej, a następnie po zagęszczeniu do małej objętości наносono w formie wąskiego paska na bibułę Whatman nr 3 i poddawano elektroforezie w 0,5M- CH_3COOH z 0,01% NaCN według metody Holdswortha [8].

Pas kobalaminy γ l eluowano wodą w sposób opisany przez Pawelkiewicz i Walerycha [17], наносono na bibułę Whatman nr 2 również w formie wąskiego paska i chromatografowano techniką splywową rozpuszczalnikiem jednofazowym o składzie: butanol-1 — propanol-2 — 5% roztwór HCN—woda—kwas octowy (100:70:3:97:1, v/v). Dla lepszego oczyszczenia próbę rechromatografowano 2—3 razy na tej samej bibule tym samym rozpuszczalnikiem. Czystą kobalaminę eluowano wodą i roztwór odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. W podany sposób przerobiono 200 l kultury *P. schermanii* otrzymując 25 mg kobalaminy γ l.

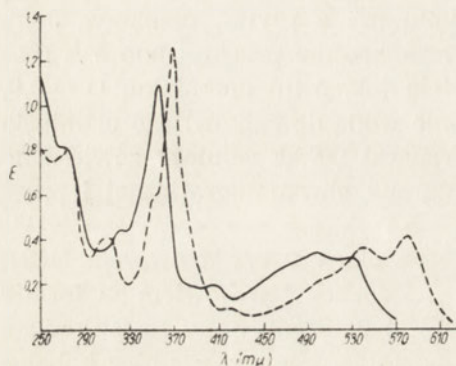
OZNACZENIE KOBALTU

Kobalt oznaczano według metody Mc Naughta [12], która polega na spektrofotometrycznym oznaczeniu trwałego w roztworze kwaśnym czerwonego kompleksowego związku kobaltu (III) z kwasem 1-nitrozo-2-hydroksy-3,6-naftalenodwusulfonowym.

Próbkę kobalaminy γ l (0,15 μmola w 1,5 ml), której stężenie oznaczano spektrofotometrycznie mierząc absorpcję przy fali 498 $\text{m}\mu$ ¹, zadawano

¹ Stężenia kobalaminy γ l określano na podstawie wartości pochłaniania przy fali 498 $\text{m}\mu$ (dla formy jednocyjanowej) lub 580 $\text{m}\mu$ (dla formy dwucyjanowej, po zada-

w platynowym tygielku jedną kroplą stężonego kwasu siarkowego i jedną kroplą 70% kwasu nadchlorowego. Po ostrożnym odparowaniu wody próbę ogrzewano do wystąpienia białych dymów, studzono, dodawano jeszcze raz



Rys. 1. Widmo absorpcyjne kobalaminy yl. Forma jednocyjanowa (—), forma dwucyjanowa (---). Pomiarów dokonywano co 5—10 μm , a w obszarze maksimów i minimów co 1 μm .

jedną kroplę kwasu nadchlorowego i ponownie ogrzewano. Czynność tę powtarzano 2—3 razy do uzyskania zupełnie jasnego roztworu. Następnie dodawano ok. 3 ml. wody i ilościowo przenoszono do kolbki miarowej o objętości 10 ml. Dodawano kolejno 0,2 ml. HCl (1:1), 0,2 ml HNO₃ (1:10), 0,50 ml 0,2% roztworu kwasu 1-nitrozo - 2 - hydroksy - 3,6 - naftalenodwusulfonowego i 1,50 ml roztworu octanu sodu (7 g CH₃COONa·3H₂O/10 ml). Po 15 minutach dodawano 1,0 ml HCl (1:1) i uzupełniano wodą do 10 ml. Po wymieszaniu mierzono absorpcję dla fali 500 μm w kiuwetach o długości 40 mm w spektrofotetrze Uvispek H 700 wobec ślepej próby zawierającej te same odczynniki, a w miejsce roztworu kobaltu — wodę. Jednocześnie wykonywano szereg pomiarów z określonymi wzorcowymi roztworami kobaltu (0,5—6,0 μg Co⁺⁺ w końcowej 10 ml objętości).

OZNACZENIE FOSFORU

Fosfor oznaczano metodą Michelsena [13], według sposobu podanego przez Delsala i Manhouriego [4]. Próbę kobalaminy yl spalano jak przy oznaczaniu kobaltu, rozcieńczano wodą do objętości ok. 5 ml i pozostawiano na 24 godzin dla zhydrolizowania polifosforanów na ortofosforany. W 1,50 ml roztworu oznaczano kobalt jak podano wyżej, a w drugiej 1,50 ml porcji oznaczano P, mierząc absorpcję przy fali długości 315 μm . Krzywą standardową robiono na znanych roztworach fosforanów w granicach 0,25—1,50 μg P/ml. Zgodność z prawem Beera stwierdzono w granicach stężeń 0,25—0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, przy czym prosta trafiała w punkt zerowy. Powyżej stężenia fosforanów 0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ krzywa standardowa odchyłała się łagodnie od linii prostej, jednakże wyniki odczytów spektrofotometrycznych

roztworu kryształkiem NaCN). Wartość molowego współczynnika ekstynkcji dla fali 580 μm i formy dwucyjanowej związku przyjęto za równy 10 707 [20]. Z pomiarów widm absorpcyjnych (Rys. 1) obliczono, że dla formy jednocyjanowej przy fali 498 μm współczynnik ten wynosi 8880.

metrycznych były dla całego badanego zakresu stężeń powtarzalne i pewne. Stwierdzono, że na wyniki odczytów spektrofotometrycznych bardzo znaczny wpływ wywiera jakość użytego molibdenianu amonowego, z którego przygotowano odczynnik. Dla innych preparatów tego związku (również o czystości analitycznej) uzyskiwano, np. krzywe o znacznie mniejszym nachyleniu. Jednakże dla tego samego preparatu molibdenianu amonu uzyskiwano zawsze te same odczyty. Zapewne preparaty molibdenianu amonowego mogą zawierać nieokreślone bliżej zanieczyszczenia, które przeszkadzają reakcji. Wyniki uzyskane w naszej pracowni z użyciem najlepszego posiadanego preparatu molibdenianu amonowego (Gliwice) tylko nieznacznie odbiegały od podanych dla tej metody przez DeLsala i Manhouriego [4].

Z danych doświadczalnych wynika, że na 1 atom Co w cząsteczce kobalaminy yl przypada 2 atomy P (doświadczalnie oznaczano $Co : P = 1 : 2,1 \pm 0,6$ (średnia trzech pomiarów)). Rzetelność metody oznaczania stosunku molowego Co : P skontrolowano oznaczając go w preparatach witaminu B₁₂. Uzyskano powtarzalne dane, z których wynika, że $Co : P = 1 : 1$ (doświadczalnie średnio znaleziono $Co : P = 1 : 1,1$).

OZNACZANIE RYBOZY

Rybozę oznaczano metodą orcynową wg. Volkina i Cohna [24]. 0,077 μM kobalaminy yl w 3,00 ml roztworu (ilość kobalaminy yl określano spektrofotometrycznie mierząc absorpcję formy dwucyjanowej dla fali 580 $m\mu$) zadawano 9,0 ml odczynnika orcynowego i ogrzewano 20 minut na wrzącej łaźni wodnej. Po ostudzeniu mierzono absorpcję dla fali 660 $m\mu$ w spektrokolorymetrze Spectronic 20. Krzywą standardową robiono na znanych roztworach rybozy.

Z danych analitycznych wynika, że 1 mol kobalaminy yl zawiera 1 mol rybozy (doświadczalnie stwierdzono 1,1 i 1,2 mola rybozy).

OZNACZENIE GUANINY

2,35 ml roztworu kobalaminy yl o zawartości 0,229 μM (oznaczone spektrofotometrycznie przy fali 498 $m\mu$) hydrolizowano 4 godziny na wrzącej łaźni wodnej w 2N-HCl. Następnie roztwór odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w małej objętości 0,1N-HCl i nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę Whatman nr 1. Następnie chromatografowano metodą spływową, używając jako rozpuszczalnika mieszaniny propanolu-2, HCl i wody. Rozpuszczalnik sporządzano następująco: do 65 ml świeżo destylowanego propanolu dodawano tyle stężonego HCl i wody by uzyskać 100 ml roztworu o stężeniu 2N-HCl [25]. Plamę guaniny wykrywano na bibule w świetle ultrafioletowym stosując

filtr 254 m μ . Plamę o $R_F = 0,22$ wycinano i eluowano 2 godziny 6 ml 0,1 N-HCl na wytrząsarce. Jednocześnie z bibuły wycinano na tej samej wysokości wycinek o tej samej powierzchni i ekstrahowano w analogiczny sposób. Ten ostatni eluat służył jako ślepa próba do pomiaru spektrofotometrycznego. Mierzono absorpcję dla fal o długości 249 i 290 m μ . Zawartość guaniny w μg wyliczano z wzoru: $21,05 \times (d_{249} - d_{290}) \mu\text{g/ml}$ [23]. W 1 molu kobalaminy y1 stwierdzono 0,83 i 0,80 mola guaniny. W hydrolizacie stwierdzono niewielkie ilości ksantyny, która mogła powstać z deaminacji guaniny.

CHEMICZNA I ENZYMATYCZNA DEGRADACJA KOBALAMINY Y1

Hydroliza przy pomocy wodorotlenku cerawego. Hydrolizę wykonywano według metody Friedricha Bernhauera [7], w sposób opisany przez Pawełkiewicza i Zodrwa [20]. Z produktów hydrolizy izolowano korfiryny ekstrahując je 50% fenolem w chloroformie, jak opisano wyżej. Otrzymano jedynie witamin B_{12p}, który identyfikowano elektroforezą bibułą w 0,5M-CH₃COOH z 0,01% NaCN i w 0,05N-buforze fosforanowym z 0,01% NaCN oraz chromatografią bibułą (bibuła Whatman nr 1 lub 2, rozpuszczalnik butanol-1—propanol-2—woda—kwas octowy-HCN jak podano wyżej).

Enzymatyczna hydroliza kobalaminy y1 jadem węża Russella. Ok. 1 mg kobalaminy y1 rozpuszczano w 0,4 ml 0,05M-buforu NaHCO₃—Na₂CO₃ o pH 9,15, dodano 2 mg preparatu jadu węża Russella (Ross Allen's Reptile Institute, USA) rozpuszczonego w 0,4 ml tegoż buforu oraz 10 μM -MgSO₄. Inkubowano 8 godzin w temperaturze 30°. Następnie mieszaninę zakwaszono kwasem octowym do pH 6, zagotowano i izolowano korfiryny jak podano wyżej. Hydrolizę enzymatyczną przeprowadzano również w rozcieńczonym roztworze amoniaku (pH 9,15) i po inkubacji roztwór zagęszczano bezpośrednio pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym produkty hydrolizy наносzono na bibułę i chromatografowano. Hydroliza jadem węża Russella dała, jako wyłączną korfirynę, elektroobojętny związek (przy pH 3) o cechach, opisanej przez Pawełkiewicza [16], kobalaminy y2. Ostatni związek hydrolizowany wodorotlenkiem cerawym dał ilościowo witamin B_{12p}.

Enzymatyczna hydroliza kobalaminy y1 preparatem drożdżowym. Preparat drożdżowy otrzymano w następujący sposób. Gęstą zawiesinę przemytych drożdży piekarskich wlewano do 20 objętości acetonu oziębionego do -15°. Mieszano 15 minut, a następnie sączono przez sączek piankowy. Osad przemywano bezwodnym acetonem (-15°) i suszono w temperaturze pokojowej. Ok. 100 mg proszku mieszano z 5 ml 0,1M-buforu fosforanowego o pH 7, dodawano ok. 1 mg kobalaminy y1 i inkubowano 6 godzin

w temperaturze 30°. Następnie próbę zakwaszono do pH 6, ogrzewano 15 minut w temperaturze 100°, wirowano i z klarownego płynu izolowano oraz identyfikowano korfiryny, jak podano wyżej. W produktach hydrolizy znaleziono witamin B_{12p} oraz elektroobojętą korfirynę, taką samą, jaką otrzymano przy hydrolizie kobalaminy yl jadem węża Russella.

Przeprowadzono również porównawcze próby hydrolizy czynnika lb Dellwega i Bernhauera [3] obydwoma preparatami enzymatycznymi. Czynniki lb okazały się odporne na enzymatyczną hydrolizę. Odnajdywano tylko nie zmieniony związek.

DYSKUSJA

Kobalamina yl należy do tych korfiryn, które są produkowane tylko w bardzo małych ilościach przez szczep *Propionibacterium shermanii*. Wprawdzie Pawelkiewicz i Zdroń [19] stwierdzili w kulturach hodowanych na półsyntetycznych pożywkach pozbawionych jonowego żelaza pojawianie się zwiększonych ilości tego związku, jednakże obecne nasze doświadczenia wskazują, że to zjawisko jest bardziej złożone i zależy od szeregu innych nie zdefiniowanych jeszcze czynników, ponieważ brak żelaza jonowego w pożywce nie zawsze daje większe ilości kobalaminy yl.

Dlatego w pracy niniejszej izolowano ten związek ze zwykłych hodowli, standardowo prowadzonych w naszej pracowni [21]. Ilości kobalaminy yl w tych hodowlach nie przekraczają na ogół 1-3% wszystkich obecnych związków korfirynowych i dlatego w pierwszym rzędzie należało wyszukać odpowiednią metodę jej izolacji. Taką wygodną i szybką metodę nadającą się dla większych ilości materiału przedstawiono w niniejszej pracy.

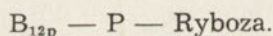
Metodę oparto na, opracowanej ostatnio w pracowniach prof. Bernhauera i naszej [18], metodzie rozdziału korfiryn na wymiennikach celulozowych. Bardzo praktyczne metody chromatograficzne z użyciem syntetycznych wymienników jonowych, mają ograniczone zastosowanie dla związków grupy witaminu B₁₂. Wymienniki te posiadają bowiem w ogólności bardziej skomplikowaną, sieciową budowę, która ma wpływ na dostęp większych cząsteczek do ich aktywnych grup. Dlatego często nie adsorbują one wcale związków korfirynowych, albo też adsorbują je w sposób nieodwracalny, to jest tak, że nie można ich po adsorpcji eluować. Wad tych nie posiadają wymienniki celulozowe i nadają się bardzo dobrze do izolacji korfiryn, w szczególności kobalaminy yl. Wizualna ocena elektroforogramów frakcji kobalaminy yl wyizolowanych z surowego materiału wykazała, że stopień ich czystości wynosi 50—80%. Głównym zanieczyszczeniem jest elektroobojętny związek o cechach kobalaminy y₂, prawdopodobnie fosforan witaminu B_{12p}. Surowy koncentrat kobalaminy yl oczyszczano zwykłymi metodami elektroforezy i chromatografii bibułowej.

Analiza czystego preparatu kobalaminy γ_1 wykazała, że zawiera ona kobalt, fosfor, rybozę i guaninę w stosunku molowym 1:2:1:1.

Dzięki uprzejmości dr Boretti i dr Migliacci otrzymaliśmy ich analog witaminu B_{12} wyizolowany z *Nocardia rugosa* o budowie guanozynodwufosforanu czynnika B, a więc posiadającego taki sam stosunek Co : P : rybozy : guaniny, jak w kobalaminie γ_1 . Bezpośrednie porównanie obu związków metodami chromatografii i elektroforezy bibułowej wykazało, że mogą to być substancje identyczne.

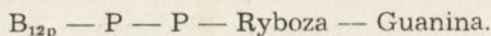
Celem potwierdzenia tej hipotezy przedsięwzięliśmy szereg doświadczeń degradacji cząsteczki kobalaminy γ_1 służących ustaleniu struktury związku.

Jak wiadomo jad węża Russella posiada własności fosfodiesterazy oraz pyrofosfatazy [2]. W doświadczeniach naszych preparat ten hydrolizował całkowicie kobalaminę γ_1 , lecz nie zmieniał zupełnie tzw. czynnika 1b. Czynnikiem 1b nazwali Dellweg i Bernhauer [3] pochodną witaminu B_{12p} o strukturze:



Podobnie zachowywały się kobalamina γ_1 i czynnik 1b wobec enzymatycznego preparatu z drożdży.

Skoro więc preparaty te nie wykazały czynności fosfodiesterazy wobec czynnika 1b, a hydrolizowały kobalaminę γ_1 , strukturę ostatniego związku może oddać wzór:



Jad węża Russella działałoby na kobalaminę jako pyrofosfataza, która rozszczepiałaby wiązanie pyrofosforanowe. Produktem takiego rozszczepienia byłby fosforan witaminu B_{12p} oraz nukleotyd guaniny, który ulegałby wtórnie hydrolizie pod działaniem enzymu na nukleozyd [11]. Otrzymana przez hydrolizę jadem węża korfiryna posiada wszelkie cechy fosforanu witaminu B_{12p} . Jak teoretycznie można przewidzieć jest ona przy pH 3 elektrobojętna, a pod katalitycznym działaniem wodorotlenku cerawego rozpada się na witamin B_{12p} i nieorganiczny fosforan. Chromatograficznie różni się od czynnika 1b, ponieważ nie zawiera rybozy. To tłumaczy jej większą hydrofilność, a tym samym niższe wartości R_F uzyskiwane w chromatografii. Preparat enzymatyczny z drożdży podobnie hydrolizuje kobalaminę γ_1 z tym, że zawiera dodatkowo fosfatę rozszczepiającą powstałą fosforan witaminu B_{12p} do wolnego witaminu i fosforanu.

Na podstawie powyższych danych przypisujemy kobalaminie γ_1 budowę guanozynodwufosforanu witaminu B_{12p} (czynnik B). Kobalamina γ_1 jest identyczna z elektroujemnym analogiem witaminu B_{12} z *Nocardia rugosa*.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie dr Boretti i dr Migliacci za użyczenie nam ich preparatu z *Nocardia rugosa* oraz prof. Bernhauerowi za próbkę DEAE-celulozy. Dziękujemy również prof. Janickiemu za preparat jadu węża Russella oraz za użyczenie filtra ultrafioletowego. Wyrażamy również wdzięczność Fundacji Rockefellera za udzieloną nam pomoc, która ułatwiła nam wykonanie niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Opracowano nową chromatograficzną metodę izolowania kobalaminy γ_1 z kultur *Propionibacterium shermanii* na DEAE-celulozie.

Kobalaminę γ_1 zidentyfikowano jako guanozyncdwufosforan witaminu B_{12p} (czynnika B). Stwierdzono, że jad węża Russella hydrolizuje kobalaminę γ_1 do fosforanu witaminu B_{21p} , lecz nie hydrolizuje rybozofosforanu witaminu B_{12p} (czynnika 1b).

LITERATURA

- [1] Barchielli R., Boretti G., Julita P., Migliacci A., Minghetti A. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 452, 1957.
- [2] Butler G. C. w *Method in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, t. 2, str. 561, New York, 1955.
- [3] Dellweg H., Bernhauer K. *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 74, 1957.
- [4] Delsal J. L., Manhoury H. *Bull. Soc. Chim. biol.* **40**, 1169, 1958.
- [5] Di Marco A., Boretti G., Migliacci A., Julita P., Minghetti A. *Boll. Soc. Ital. Biol. Speriment.* **33**, 1513, 1957.
- [6] Ford J. E., Porter J.W.G. *Biochem. J.* **51**, v, 1952.
- [7] Friedrich W., Bernhauer K. *Chem. Ber.* **89**, 2507, 1956.
- [8] Holdsworth E. S. *Nature* **171**, 148, 1953.
- [9] Juillard M. *Zbl. Bakt. Abt. II* **110**, 701, 1957.
- [10] Kon S. K. *Biochem. Soc. Symp.* **13**, 17, 1955.
- [11] Markham R. w *Method in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, t. 3, str. 743, New York, 1957.
- [12] Mc Naught K. T. *Analyst* **67**, 97, 1942.
- [13] Michelsen O. B. *Anal. Chem.* **29**, 60, 62, 1957.
- [14] Molnar I., Kelemen A. M. *Naturwissenschaften* **43**, 129, 1956.
- [15] Neujahr H. Y. *Acta Chem Scand.* **10**, 917, 1956.
- [16] Pawełkiewicz J. *Acta Biochim. Polon.* **3**, 581, 1956.
- [17] Pawełkiewicz J., Walerych W. *Acta Biochim. Polon.* **5**, 327, 1958.
- [18] Pawełkiewicz J., Walerych W., Friedrich W., Bernhauer K. *J. Chromatography* (w druku).
- [19] Pawełkiewicz J., Zodrow K. *Acta Biochim. Polon.* **3**, 225, 1956.
- [20] Pawełkiewicz J., Zodrow K. *Acta Biochim. Polon.* **4**, 203, 1957.
- [21] Pawełkiewicz J., Zodrow K. *Pat. Pol.* **84**, 431, 1956.
- [22] Porter J. W. G., Dollar A. M. *Abstr. Biol. Sci. Suppl.* **124**, 1958.
- [23] Vischer E., Chargaff E. *J. Biol. Chem.* **176**, 703, 1948.

- [24] Volkin E., Cohn U. E. w *Methods of Biochemical Analysis*, wyd. D. Glick, t. 1 str. 298, Interscience Publ. Inc., New York, 1954.
- [25] Wyatt G. R. *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.

STUDIES ON BIOSYNTHESIS OF CORPHYRIN COMPOUNDS.

3. IDENTIFICATION OF COBALAMIN γ_1 AS GUANOSINEDIPHOSPHATE OF VITAMIN B_{12p} (FACTOR B)

Summary

A new chromatographic method for the isolation of cobalamin γ_1 from *Propionibacterium shermanii* cultures on DEAE-cellulose is described. Cobalamin γ_1 was indentified as guanosinediphosphate of vitamin B_{12p} (Factor B). It has been established that the venom of Russell's viper hydrolyses cobalamin γ_1 to give vitamin B_{12p} phosphate, but it does not so with Factor B ribose phosphate.

Otrzymano 18.7.1959 r.

J. PAWEŁKIEWICZ i W. WALERYCH

**SZYBKA CHROMATOGRAFICZNA METODA ROZDZIAŁU
ZWIĄZKÓW KORFIRYNOWYCH***

*Katedra Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu
Kierownik Katedry: doc. dr J. Pawełekiewicz*

Dotychczasowe metody rozdziału związków korfirynewych polegają na zastosowaniu (a) chromatografii bibułowej lub kolumnowej [2, 3] (b) elektroforezy [5, 1] oraz (c) chromatografii kolumnowej z wymiennikami celulozowymi [8].

W pracy niniejszej przedstawiamy nową metodę rozdziału korfirynewych, opartą na ich chromatografowaniu w odwróconych fazach. W metodzie tej fazą ruchomą są wodne roztwory fenoli, a fazą nieruchomą związki fenolowe, którymi impregnowano bibułę. Metoda opiera się na istnieniu różnicy współczynników podziału związków korfirynewych między fazą wodną i fenolową. Jak wiadomo, korfirynewe tworzą ze związkami fenolowymi kompleksy [4]. Zdolność tworzenia się tych kompleksów zależy z jednej strony od struktury korfirynewych, a z drugiej od budowy związku fenolowego. Friedrich i Bernhauer [4] rozdziałali związki korfirynewe między fazą wodną i fazą fenolową (związek fenolowy rozpuszczony w trójchloroetylenie) i określali stężenie odpowiedniego fenolu w rozpuszczalniku organicznym, przy którym współczynniki podziału posiadały wartość jedności. Poszczególne korfirynewe różniły się znacznie między sobą. Tak, na przykład, witamin B₁₂ wymagał 7,9 g *p*-chlorofenolu w 100 ml trójchloroetyleny, a witamin B_{12III} 12,3 g w 100 ml dla uzyskania jednakowego rozdziału między fazą organiczną a wodę. Gdy zamiast *p*-chlorofenolu użyto *o*-krezol, wartości liczbowe wynosiły odpowiednio 16,8 g i 27,2 g w 100 ml rozpuszczalnika.

* Zgłoszono jako doniesienie na III Międzynarodowe Sympozjum Witaminowe, Poznań 21-24 wrzesień, 1959.

Koszty związane z przeprowadzeniem powyższej pracy zostały pokryte z dotacji Komitetu Biochemicznego Wydz. II PAN.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Bibułę Whatman nr 1, 2, 3 i 4 impregnowano zanurzając je w odpowiednim 4% alkoholowym roztworze: fenolu, *p*-chlorofenolu, β -naftolu i tymolu, a następnie susząc je w powietrzu. Jako rozpuszczalniki stosowano wodę nasyconą odpowiednimi fenolami. Do rozpuszczalników dodawano niekiedy chlorku sodowego, wodorotlenku amonowego, kwasu octowego, pirydyny lub cyjanowodoru. Do badań użyto następujących korfiryń: pseudowitamin B₁₂, czynnik A, witamin B₁₂₁₁₁, czynnik 1b, metylomerkaptoadenino-analog (preparaty otrzymano od prof. Bernhauera), witamin B₁₂, 5(6)-metylobenzimidazolowy analog cyjanokobalaminy [9], witamin B_{12p} (czynnik B) [6], kobalaminę y1 [10], oraz karboksylowe Pochodne witaminu B_{12p}¹. Wszystkie substancje były chromatograficznie czyste. Rozdziały przeprowadzono techniką spływową, wstępującą, krążkową i krążkowo-paskową według Matthiasa [7]. Czas rozwijania był bardzo krótki i wynosił od 10 minut do 2 godzin, w zależności od stosowanej techniki, rodzaju impregnatora i substancji rozdzielanych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Najciekawsze wyniki osiągnięto jedynie przy użyciu bibuły impregnowanej tymolem. Tablica 1 podaje wartości R_F dla różnych korfiryń, chromatografowanych każda z osobna. Przy chromatografowaniu mieszaniny tych związków wartości R_F były identyczne. Chromatogramy rozwijano metodą spływową, używając bibuły Whatman nr 2 wysyczonej tymolem. Chromatogram rozwijano 1,5—2 godzin. Osiągano wyraźne rozdziały, jednakże plamy niektórych korfiryń były rozciągnięte, nieco rozmazane. Jeszcze mniej ostre rozdziały uzyskiwano przy rozdzielaniu mieszaniny poszczególnych korfiryń.

Technika krążkowa nie dała pozytywnych wyników. Uzyskiwane rozdziały nie były wyraźne, próby rozmazywały się. Rozdział techniką wstępującą również nie był zachęcający, chociaż wyniki były lepsze niż przy stosowaniu techniki krążkowej.

Najciekawsze rezultaty dały próby, w których użyto techniki paskowo-krążkowej według Matthiasa [7]. Z bibuły Whatman nr 2 wysyczonej tymolem wycinano paski o kształcie i wymiarach podanych na rys. 1. Kropkę roztworu korfiryń наносzono w miejsce zwięzienia paska, w środku powstałego „języczka“, w ilości dającej wyraźną plamę (ok. 20 μ g) i suszono w strumieniu zimnego powietrza. Rozwijano chromatogram metodą wstępującą. Jako rozpuszczalnik stosowano wodę nasyconą tymolem, ewen-

¹ Wyizolowane przez J. Pawelkiewicza i W. Walerycha — dane nieogłoszone.

Tablica 1

Średnie wartości R_F związków korfirynowych

Chromatografowano metodą spływową na bibule Whatman nr 1 impregnowanej tymolem. Faza rozwijająca: woda wysycona tymolem z dodatkiem HCN lub kwasu octowego, jak zaznaczono w tablicy. Korfiryny: (1) witamin B_{12} ; (2) witamin B_{12p} (czynnik B); (3) czynnik A; (4) czynnik 1b; (5) pseudowitamin B_{12} ; (6) witamin B_{12III} ; (7) 5(6)-metylobenzimidazolo-analog; (8) kobalamina yl; (9) metylomerkaptoadenino-analog; (10) I-karboksylowa pochodna wit. B_{12p} ; (11) II-karboksylowa pochodna wit. B_{12p} .

Korfiryna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,1% ⁰ HCN	0,25	0,19	0,69	0,53*	0,67	0,63	0,32	0,90	0,53	0,88	0,89
0,1 M- CH ₃ COOH	0,22	0,47	0,65	*	0,63	0,63	0,30	0,89	0,50	0,52	0,61

* Plamy rozmazane.

tualnie z dodatkiem NaCl, HCN, NH₄OH, CH₃COOH lub pirydyny. Tablica 2 przedstawia średnie wartości R_F uzyskane przy zastosowaniu jako rozpuszczalnika wody nasyconej tymolem z dodatkiem 0,4%⁰ pirydyny. Czas rozwijania chromatogramu wynosił 20 minut. Dodatek pirydyny ułatwiał szczególnie rozdział witaminu B_{12p} od witaminu B_{12} . Dwie pochodne karboksylowe witaminu B_{12p} , które nie rozdzielały się przy rozwijaniu chromatogramów tą techniką, dawały się dobrze rozdzielić stosując 0,1 M-CH₃COOH nasycony tymolem (Tabl. 2). Dodatek chlorku sodowego, tak w jednym jak i drugim przypadku, wywierał wpływ raczej niekorzystny. Z uzyskanych danych najlepszy okazał się następujący sposób postępowania rozdziału korfiryn:

a) rozdział przeprowadzać techniką paskowo-krażkową według Matthiasa,

b) do rozdziału zastosować bibułę Whatman nr 2 impregnowaną 4%⁰ alkoholowym roztworem tymolu,

c) dla większości korfiryn stosować jako rozpuszczalnik wodę nasyconą tymolem z dodatkiem 0,4%⁰ pirydyny,

Tablica 2

Średnie wartości R_F związków korfirynowych

Chromatografowano techniką paskowo-krażkową wg Matthiasa, metodą wstępującą. Bibuła Whatman nr 2 impregnowana tymolem. Faza rozwijająca: woda nasycona tymolem z dodatkiem 0,4%⁰ pirydyny. Oznaczenia korfiryn jak w tablicy 1

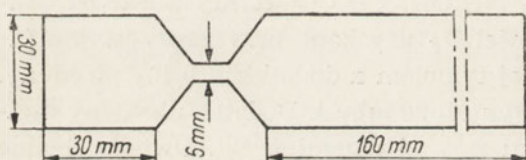
Korfiryna	1	2	3	5	6	7	8	10	11
R_F	0,16	0,14	0,38	0,48	0,49	0,25	0,72	0,28*	0,52*

* Dla próby 10 i 11 fazą rozwijającą był 0,1 M-CH₃COOH nasycony tymolem.

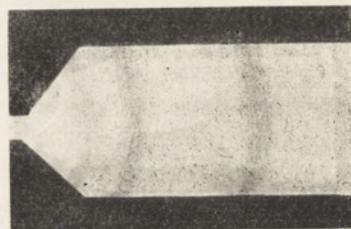
d) dla pochodnych karboksylowych witaminu B_{12p} stosować jako rozpuszczalnik 0,1 M-CH₃COOH nasycony tymolem.

Opisana metoda jest szczególnie przydatna do rozdzielania korfiryń elektrobojętnych, nie dających się rozdzielić metodami chromatografii jonowymiennej i elektroforezy. Na przykład, rozdział witaminu B₁₂, 5-metylobenzimidazolo-analogu cyjanokobalaminy i witaminu B_{12III} osiągnano już w ciągu 20 minut (Rys. 2).

Metoda nadaje się również dobrze do surowych koncentratów mieszanin korfiryń. I tak z powodzeniem rozdzielano szereg korfiryń z ekstrak-



Rys. 1. Wzór paska do chromatografii korfiryń



Rys. 2. Fotografia chromatogramu z rozdzielonymi korfiryńami, ze wzrostem wartości R_F : witamin B₁₂, 5(6)-metylobenzimidazolo-analog, i witamin B_{12III}

tów uzyskanych z komórek *Propionibacterium shermanii* i *Propionibacterium petersonii*. Istotną zaletą tej nowej metody jest bardzo krótki czas rozdzielania, nieosiągalny dotychczasowymi metodami.

STRESZCZENIE

Opracowano nową szybką metodę rozdzielania korfiryń, stosując chromatografię z odwróconymi fazami. Jako fazę nieruchomą zastosowano tymol, którym impregnowano bibułę. Fazą ruchomą był wodny nasycony roztwór tymolu. Czas rozwijania chromatogramu wynosił 15 do 20 minut przy technice paskowo-krażkowej, a do 2 godzin przy technice spływowej.

LITERATURA

- [1] Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith L. E., Stafford W. H., Todd A. R. *J. Chem. Soc.* 3849, 1953.
- [2] Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G. *Biochem. J.* 52, VIII, 1952.
- [3] Friedrich W., Gross G., Bernhauer K. *Mikrochimica Acta* 134, 1956.
- [4] Friedrich W., Bernhauer K. *Z. Naturforschung* 9b, 755, 1954.
- [5] Holdsworth E. S. *Nature* 171, 148, 1953.

- [6] Janicki J., Pawełkiewicz J. *Acta Biochim. Polon.* **2**, 239, 1955.
[7] Matthias W. *Naturwiss.* **41**, 17, 1954.
[8] Pawełkiewicz J., Walerych W., Friedrich W., Bernhauer K. *J. Chromatography* (w druku).
[9] Pawełkiewicz J. *Acta Biochim. Polon.* **1**, 313, 1954.
[10] Pawełkiewicz J., Walerych W., Bartosiński B. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 431, 1959.

A QUICK CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE SEPARATION OF
CORPHYRIN COMPOUNDS

S u m m a r y

A new paper chromatographic method for the separation of corphyrins with reversed phases is described. A stationary phase is thymol, and a mobile one is thymol saturated water. The time needed to develop the circular-strip chromatograms is 15 to 20 minutes, and it does not exceed 2 hours when descending technic is applied.

Otrzymano 18.7. 1959 r.

S. BURACZEWSKI

ENZYMY CYKLU PENTOZOWEGO W BURAKU CUKROWYM

Katedra Biochemi Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa
Kierownik: prof. dr Ignacy Reifer

Cykl pentozy, względnie niektóre jego przemiany, wykazano w różnych roślinach [2, 3, 4, 16]. Stwierdzono ponadto powiązanie cyklu z fotosyntezą poprzez fosfopentozy i fosfotriozy, oraz z syntezą sacharozy poprzez fosfoheksozy [5, 8, 16]. Barchasz i Timofiejewa [3] stwierdzili utlenianie się kwasu 6-fosfoglikonowego (kwasu 6-PG) i powstawanie pentozy, między innymi także w obecności ekstraktu z proszku acetonowego liści buraka cukrowego. Uzyskali oni również nieznaczne przyspieszenie utleniania kwasu 6-PG w obecności piocyjaniny.

W założeniu niniejszej pracy przyjęto, że w buraku cukrowym jako roślinie gromadzącej duże ilości sacharozy można by oczekiwać wysokiej aktywności enzymów cyklu pentozy. Zwrócono przy tym uwagę na te enzymy, które katalizują wzajemne przekształcenia jednostek 5- i 6-ciowęglowych, a zatem mogą mieć znaczenie w biosyntezie sacharozy.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto liści buraków cukrowych AJ2, z których preparaty enzymatyczne otrzymywano w sposób podany przez Axelroda i współprac. [2]. Do badań nad dehydrogenazami użyto wyciągu wodnego z proszku acetonowego w stosunku wagowym 20 : 1 (stage I), zawierającego 210 μg azotu ogólnego w 1 ml. Przy oznaczaniu przemian rybozo-5-fosforanu (R-5-P) preparaty enzymatyczne (stage II) zawierały 220 μg azotu ogólnego w 1 ml. Dehydrogenazę glikozo-6-fosforanu otrzymywano z drożdży metodą Kornberga i Horeckera [13].

R-5-P otrzymano z adenylozotryfosforanu według Hellera i Szafran-skiego [11]. Czystość preparatu obliczona na podstawie zawartości fosforu organicznego wynosiła ok. 62%. Glikozo-6-fosforan (G-6-P) i kwas 6-PG otrzymano według metody Seemillera i Horeckera [15]. Jako czynnika

fosforylującego użyto kwas pyrofosforowy uzyskując wydajność G-6-P ok. 10% w stosunku do wyjściowej ilości glikozy. Czystość preparatu według zawartości fosforu organicznego wynosiła ok. 96%, a obliczona na podstawie specyficznej reakcji enzymatycznej z dehydrogenazą G-6-P [12] wynosiła 46%. Kwas 6-PG wykazywał według zawartości fosforu organicznego czystość 87%. Zawierał on kilka procent G-6-P.

Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla w modyfikacji Reifera i Tarnowskiej [14]. Mieszaninę do spalań przygotowywano bez kwasu nadchlorowego, który w niektórych przypadkach powoduje obniżenie wartości azotu. Fosfor oznaczano metodą Fiske i SubbRow [10]. Pentozy oznaczano według Mejsbaum w modyfikacji Dischego [1]. Oznaczenia kolorymetryczne wykonywano w fotokolorymetrze Leitza przy filtrze czerwonym B. Sedoheptulozę oznaczano metodą Dischego CyR I w modyfikacji Axelroda i współprac. [2]. Heksozy oznaczano metodą Dischego i współprac. [9] na podstawie różnic ekstynkcji między 380 a 415 m μ długości fali, po 2 godz. reakcji cysteinowej. Aktywność dehydrogenaz G-6-P i kwasu 6-PG oznaczano mierząc absorpcję 2,6-dwuchlorofenolindofenolu przy 540 m μ wobec próby kontrolnej nie zawierającej substratów [2]. Sól sodowa nukleotydu trójfosfopirydynowego (TPN) firmy Sigma miała 99% czystości. Do pomiarów używano spektrofotometru „Algerie“ firmy A. Jobin i G. Yvon.

WYNIKI

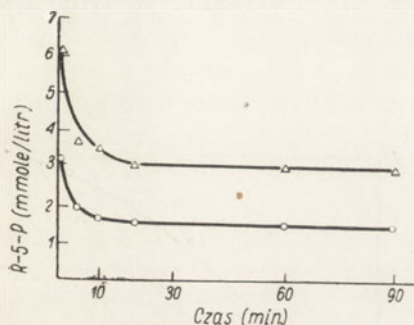
Enzymatyczna przemiana R-5-P. Dla porównania wpływu stężenia R-5-P na szybkość jego przemian użyto w doświadczeniach 672 i 1480 μ g fosfopentozy na 1 ml inkubatu. Szybkość przemian przedstawiona jest na rys. 1. Równowaga reakcji ustaliła się niezależnie od ilości R-5-P po ok. 20 min. przy ok. 50% ubytku dodanego substratu. W dalszym czasie zawartość R-5-P obniżała się nieznacznie.

Wpływ stężenia enzymu na szybkość przemian R-5-P podana jest na rys. 2. Przy najniższym stężeniu enzymu (ok. 11 μ g azotu ogólnego) równowaga reakcji nie została osiągnięta jeszcze po 90 min. Przy stężeniach enzymu 22 i 44 μ g azotu ogólnego równowaga reakcji ustalała się po ok. 20 min. Różnic w szybkości przemiany R-5-P przy tych ilościach enzymu już nie stwierdzono.

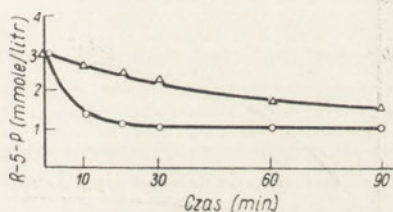
Przemiany R-5-P w obecności preparatu enzymatycznego z liści buraka przebiegały z jednakową szybkością w porównaniu z preparatem enzymatycznym z liści szpinaku, zawierającego w przybliżeniu tę samą ilość azotu ogólnego (Rys. 3).

Produkty przemian R-5-P. Ubytkom R-5-P w obecności preparatów enzymatycznego towarzyszy pojawianie się nowych cukrowców. Wyniki

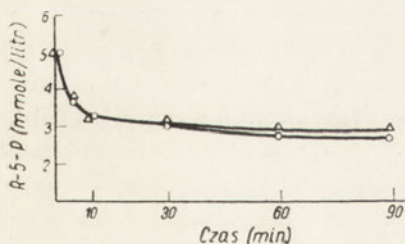
spektrofotometrycznego oznaczania heksoz podane są w tablicy 1. Heksozy pojawiały się w okresie dalszych przemian, nie zaś jednocześnie w okresie ustalania się równowagi reakcji, w którym to czasie pojawia się sedoheptuloza (Rys. 4).



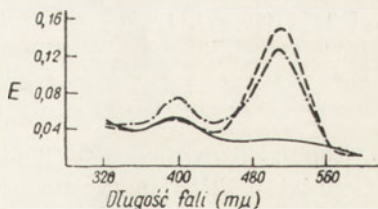
Rys. 1. Szybkość przemian R-5-P przy różnym jego stężeniu. 0,6 ml roztworu R-5-P, 0,45 ml preparatu enzymatycznego, 0,45 ml 0,2 M-buforu „tris“ o pH 7,5, temp. 38°. Do 0,2 ml mieszaniny inkubowanej dodawano 6% kwas trójchlorooctowy do 2,5 ml, po odwirowaniu białka oznaczano pentozy w 0,5 ml. (○) 672 μg R-5-P. (Δ) 1480 μg R-5-P



Rys. 2. Szybkość przemian R-5-P przy różnym stężeniu preparatu enzymatycznego. (Δ) 11 μg N-cał. (○) 22 lub 44 μg N-cał. 0,4 ml R-5-P (672 μg), 0,2 ml 0,2 M buforu „tris“ o pH 7,5, preparat enzymatyczny, do objętości 1 ml uzupełniano wodą. Temp. 38°



Rys. 3. Przemiany R-5-P w obecności preparatów enzymatycznych z (○) liści buraka i (Δ) szpinaku. Warunki jak w rys. 1, ilość R-5-P wynosiła 1600 μg

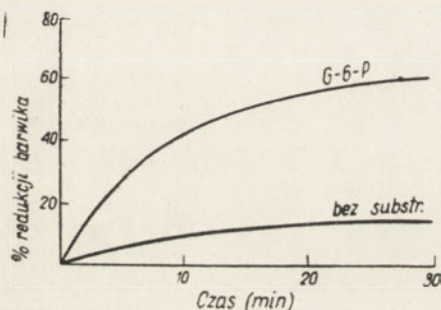


Rys. 4. Krzywe absorpcyjne produktów przemiany R-5-P. 0,5 ml R-5-P (840 μg), 0,3 ml preparatu enzymatycznego (stage II), 0,2 ml 0,2 M-buforu „tris“ o pH 7,5, temp. 38°. Inkubacja (—) 0 min., (- -) 30 min. (- . -) 20 godz. Krzywe wykreślone na podstawie reakcji cysteinowej Dischego w modyfikacji Axelroda i współprac. [2].

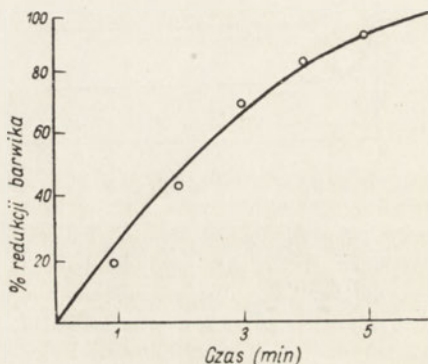
Dehydrogenaza G-6-P. W preparacie enzymatycznym (stage II) nie wykryto aktywności dehydrogenaz. Czynne są one w surowym wyciągu z proszku acetonowego (stage I). Jak widać na rys. 5, barwnik po 30 min.

inkubacji z wyciągiem, G-6-P i TPN został zredukowany w ok. 60%, a w próbie kontrolnej bez substratu w ok. 14%.

Dehydrogenaza kwasu 6-PG. Wyniki oznaczenia dehydrogenazy 6-PG (Rys. 6) świadczą o tym, że aktywność jej jest wyższa w porównaniu z dehydrogenazą G-6-P. Próba kontrolna nie wykazała w tym czasie zmiany absorpcji.



Rys. 5. Aktywność dehydrogenaz w wyciągu wodnym z proszku acetonowego w obecności G-6-P. 0,2 ml G-6-P (1 mg), 0,5 ml 0,2 M- buforu „tris“ o pH 7,5, 0,5 ml wyciągu enzymatycznego, 0,3 ml 2,6-dwuchlorofenoloidofenolu (60 µg), 0,2 ml TPN (50 µg), 1,5 ml wody. Pomiarów dokonywano co 1 minutę.



Rys. 6. Aktywność dehydrogenazy kwasu 6-PG w wyciągu wodnym z proszku acetonowego. Warunki jak w objaśnieniu do rys. 5. Jako substrat dano 1 mg kwasu 6-PG

Wykonano również oznaczenia pentoz powstających z kwasu 6-PG w obecności błękitu metylenowego. Obecność błękitu metylenowego nie przeszkadza w metodzie oznaczania pentoz. Jak wynika z danych (Tabl. 2), błękit metylenowy powodował dwukrotne zwiększenie zawartości pentoz już po upływie 25 min.

Tablica 1

Zawartość heksoz w mieszaninie inkubowanej, powstałych w wyniku przemian R-5-P 0,5 ml R-5-P (840 µg), 0,3 ml preparatu enzymatycznego, 0,2 ml 0,2 M-buforu „tris“ o pH 7,5, temp. 38°. Zawartość heksoz w µg obliczono według wzorca fruktozy.

Czas przemian		0	30 min.	75 min.	20 godz.
Heksozy (µg)	I	0	0	0	91
	II	0	0	0	81

Tablica 2

Wpływ błękitu metylenowego na powstawanie pentoz z kwasu 6-fosfoglikonowego
2,0 ml kwasu 6-PG (1380 μg), 0,5 ml wyciągu enzymatycznego, 0,5 ml 0,2 M-buforu „tris”
o pH 7,5, 1,0 ml wody lub podanych w tablicy roztworów, temp. 38°

Dodatek	μg pentoz po czasie:			
	0	10 min.	25 min.	60 min.
—	0	0	0	0
TPN 208 μg	0	84	104	116
TPN 208 μg i błękit metylenowy 20 μg	0	120	220	220

DYSKUSJA

Wyciągi wodne z proszku acetonowego liści buraka cukrowego zawierają dehydrogenazy G-6-P oraz kwasu 6-PG, współdziałające z TPN. Aktywność dehydrogenazy kwasu 6-PG była wielokrotnie wyższa od aktywności dehydrogenazy G-6-P. Podczas gdy dehydrogenaza kwasu 6-PG redukowała dodany 2,6-dwuchlorofenolindofenol całkowicie w ciągu 6 min., w obecności G-6-P jako substratu dehydrogenazy zredukowały w tym czasie tylko ok. 25% barwnika. Podobnie przedstawia się aktywność dehydrogenaz w liściach szpinaku, badana przez Axelroda i współprac. [2]. Działanie dehydrogenazy kwasu 6-PG było przyspieszane obecnością błękitu metylenowego prawie dwukrotnie. Spostrzeżenie to jest zgodne z wynikami badań na innym materiale biologicznym [6, 7].

R-5-P w obecności preparatu enzymatycznego z liści buraka cukrowego ulegał szybkim przemianom, w których po upływie ok. 20 min. osiągał równowagę z innymi fosforanami cukrowców. W dalszym czasie zawartość R-5-P zmniejszała się nieznacznie. W doświadczeniu z różną ilością R-5-P, ulegał on przemianie w ok. 50% w ciągu 20 min., niezależnie od stężenia.

Z badanych produktów przemiany R-5-P sedoheptuloza pojawiała się w dużych ilościach po 30 min., a heksozy dopiero po upływie 20 godz.

W świetle tych danych działanie cyklu pentozowego w liściach buraka cukrowego nie ulega wątpliwości. Zdolność gromadzenia cukrów w buraku cukrowym widocznie nie jest związana bezpośrednio z aktywnością enzymów cyklu pentozowego, ponieważ szybkość przemiany R-5-P w buraku cukrowym jak i w szpinaku, który cukrów nie gromadzi, były prawie identyczne.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania *in vitro* nad enzymami cyklu pentozowego z liści buraka cukrowego. Stwierdzono wielokrotnie wyższą aktywność dehydrogenazy kwasu 6-fosfoglikonowego od dehydrogenazy glikozo-6-

fosforanu. Rybozo-5-fosforan w obecności preparatów enzymatycznych ulegał przemianom osiągając równowagę reakcji po ok. 20 min., niezależnie od jego stężenia. Również nadmiary enzymu nie wpływały na zmianę szybkości reakcji. Błękit metylenowy aktywował dehydrogenazę kwasu 6-fosfoglikonowego, zwiększając dwukrotnie ilość powstających pentoz.

L I T E R A T U R A

- [1] Ashwell G. "Colorimetric Analysis of Sugars" w *Methods in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, T. III, str. 73. Academic Press, New York, 1957.
- [2] Axelrod B., Bandurski R. S., Greiner C. M., Jang R. *J. Biol. Chem.* **202**, 619, 1953.
- [3] Barchasz A. P., Timofiejewa M. *J. Biochimija* **20**, 623, 1955.
- [4] Barchasz A. P., Timofiejewa M. *J. Biochimija* **20**, 623, 1955.
- [5] Bouge E. *Comp. rend.* **242**, 667, 1956; *Chem. Abstr.* 7228, 1956.
- [6] Brin M., Yonemoto R. H. *J. Biol. Chem.* **230**, 307, 1958.
- [7] Cahill G. F., Hastings A. B., Ashmore J., Zottu S. *J. Biol. Chem.* **230**, 125, 1958.
- [8] Calvin M. "The photosynthesis carbon cycle" w *Conférences et rapports présentés au 3ème Congrès International de Biochimie*. Bruxelles, 1-6 août, 1955; Liège, 1956, str. 211.
- [9] Dische Z., Shettles L. B., Osnos M. *Arch. Biochem.* **22**, 169, 1949.
- [10] Fiske C. H., SubbaRow Y. *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [11] Heller J., Szafranski P. *Acta Biochim. Polon.* **2**, 435, 1955.
- [12] Horecker B. L., Wood W. A. "D-Glucose-6-phosphate" w *Methods in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, T. III, str. 152, Academic Press, New York, 1957.
- [13] Kornberg A., Horecker B. L. "Glucose-6-phosphate Dehydrogenase" w *Methods in Enzymology*, wyd. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, T. I, str. 323, Academic Press, New York, 1955.
- [14] Reifer I., Tarnowska K. *Acta Soc. Bot. Pol.* **20**, 739, 1950.
- [15] Seegemiller J. E., Horecker B. L. *J. Biol. Chem.* **192**, 175, 1951.
- [16] Tolbert N. E., Zill L. P. *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 392, 1954.

ENZYMES OF THE PENTOSE CYCLE IN SUGAR BEET

S u m m a r y

Preparations of enzymes obtained from leaves of the sugar beet were investigated *in vitro* as regard their ability to catalyse the pentose cycle. The activity of 6-phosphogluconic dehydrogenase was several times bigger than the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The metabolism of ribose-5-phosphate achieved equilibrium in presence of the enzyme preparations already after 20 minutes irrespective of the amounts of substrate present. Excess of enzyme caused no changes in the velocity of the reaction. Methylene blue activated the 6-phosphogluconic dehydrogenase causing a double increase in the oxidation of glucuronic acid to pentoses.

Otrzymano 31.7.1959 r.

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN i BRONISŁAWA MORAWIECKA

BADANIA NAD REGENERACJĄ BIAŁEK Z NIEROZPUSZCZALNYCH POŁĄCZEŃ BIAŁKOWO-TANINOWYCH

II. NIEKTÓRE WŁASNOŚCI BIAŁEK REGENEROWANYCH NA PRZYKŁADZIE ALDOLAZY Z MIĘŚNI KRÓLIKA I KWAŚNEJ FOSFATAZY Z ZIEMNIAKÓW

Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Wrocław

Celem tej pracy było zbadanie niektórych białek biologicznie czynnych po strąceniu ich taniną i regenerowaniu kofeiną, stosując postępowanie opisane poprzednio [5, 6]. Badania przeprowadzono na oczyszczonej i liofilizowanej aldolazie z mięśni królika oraz białkach ziemniaka. Szczególnie interesującym było ustalenie, czy kwaśna fosfataza roślinna, wrażliwa na hamujące działanie garbników [1] da się regenerować z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych bez zmiany aktywności enzymatycznej. Ponadto wykorzystano w badaniach nad czynnością białek regenerowanych ciekawą właściwość niektórych soków roślinnych, między innymi i ziemniaków, aglutynowania krwinek czerwonych.

MATERIAŁY I METODY

Stosowano materiały i metody podane w pracach poprzednich [5, 6]. Ponadto używano niżej wymienionych preparatów i metod.

Sól barową estru fruktozo-1,6-dwufosforowego sporządzano wg Neubergera i Lustiga [8]. Bar usuwano siarczanem potasu. Preparat nie zawierał nieorganicznych fosforanów, ani wolnych cukrów. Czystość preparatu liczona na fosfor organiczny wynosiła 70%. Inne używane chemikalia były czyste do analizy.

Aldolazę z mięśni królika sporządzono metodą Taylora i współpracowników [11] i liofilizowano. Preparat I przechowywano w temp 5° przez 8 miesięcy, preparat II przez 3 miesiące. Oba nie zawierały soli amonowych i 83% wagi stanowiło białko rozpuszczalne w 0,1N-NaOH. Uzyskano zgodne wyniki w oznaczaniu białka mikrometodą taninową [4] i metodą Kjeldahla stosując współczynnik 5,9 (17% azotu białkowego).

Ziemniaki pochodziły z różnych źródeł; określone jako I, II i III były ze zbioru jesiennego, a IV z wiosennego.

Wyjściowe roztwory białek. (a) Obrane ziemniaki cięto na drobne skrawki, ważono i homogenizowano przez minutę z podwójną ilością 1% roztworu NaCl, w homogenizatorze typu „Waring Blendor”. Homogenat pozostawiano w 5° przez 12 do 24 godzin, następnie sączono przez fałdowany sączonek z bibuły Whatman 1. Tak sporządzane wyciągi (wyjściowy roztwór białek ziemniaka) przechowywano w 5°. Roztwory były przejrzyste, ciemnobrunatne, zawierały 0,12-0,17% białka i 0,02% fosforu nieorganicznego, oraz dawały dodatni odczyn z jodem.

(b) Odważoną próbkę liofilizowanej aldolazy zadawano określoną ilością 1% roztworu NaCl i pozostawiano w temperaturze pokojowej na około 3 godziny przygodnie mieszając. Następnie wirowano przy 3000 obr./min., odlewano przejrzysty płyn z nad nierozpuszczalnych pozostałości i oznaczano w nim białko.

Zagęszczone roztwory białek. Wytrącanie osadów białkowo-taninowych oraz regenerowanie białka kofeiną przeprowadzano wg zasad opracowanych poprzednio [6].

(a) Z wyjściowego roztworu strącano białka ziemniaka w 5°, pH 4,7 (barwa przejściowa zieleni bromokrezolowej), przy stosunku wagowym białka do taniny (B : T) równym 1. Po odwirowaniu osadu w temperaturze pokojowej przemywano go dwukrotnie 1% roztworem NaCl w ilościach 5-krotnie większych od objętości osadu. Taninę usuwano z osadu dodając dwukrotną w stosunku do białka ilość kofeiny. Po 15 min. próbki wirowano przy 4000 obr./min. Zagęszczone roztwory zawierały 1,7% białka, były przejrzyste, jasnobrunatne, nie zawierały nieorganicznych fosforanów, ani skrobi.

(b) Wyjściowy roztwór aldolazy rozcieńczano 0,05 M-moderatorem weonalowo-octanowym o pH 6,1 i strącano białko taniną przy B : T = 1 : 0,5. Osady białkowo-taninowe po odwirowaniu, bez przemywania zadawano dwukrotną w stosunku do białka ilość kofeiny i po 15 min. wirowane przy 3000 obr./min.

Metody. Fosforany nieorganiczne oznaczano metodą Fiskego i Subbarowa [2]. Przy oznaczaniu fosforanu stężenie kofeiny w próbce do kolorymetrii nie powinno przekraczać 0,005%, ponieważ kofeina w wyższych stężeniach daje z kwasem fosfomolibdenowym nierozpuszczalny osad.

Elektroforezę bibułową białek ziemniaka przeprowadzano używając moderatorem octanowego o pH 5,1, $\mu = 0,1$. Białko наносzono na paski bibuły Whatman 1 o wymiarach 30×3 cm, w odległości 4 cm od środka w stronę katody. Czas elektroforezy 5-6 godzin, napięcie 280 Volt, natężenie prądu na pasek 0,4-0,9 mA.

Aktywność fosfatazy kwaśnej oznaczano używając jako substratu

fenilofosforanu. Mieszanina inkubowana zawierała 1 ml 0,002—0,008% białka w 0,1 M-moderatorze octanowym o pH 5,1 i 1 ml 0,08% roztworu soli dwusodowej fenilofosforanu w tym samym moderatorze. Reakcję przerywano dodaniem 2 ml 10% kwasu trójchlorooctowego. Uwolniony fosforan oznaczano w całości mieszaniny bez usuwania białka. Za jednostkę aktywności przyjęto uwolnienie 1 μg P z substratu po 15 minutach inkubacji w 37°.

Aktywność aldolazy oznaczano w warunkach podanych przez Warburga i Christiana [12]. Za jednostkę aktywności przyjęto rozkład 1 μmola estru fruktozo-1,6-dwufosforowego podczas 5-minutowej inkubacji w 37°. Rozkład ten mierzono przez przyrost nieorganicznego fosforu.

Wykazanie nieswoistych aglutynin roślinnych wykonywano na płytkach porcelanowych z wgłębieniami. Umieszczano kroplę 10% zawiesiny krwinek czerwonych grupy A lub B i mieszano z kroplą badanego białka o znacznym stężeniu. Za dodatni odczyn przyjmowano drobno-grudkową aglutynację krwinek, występującą w temperaturze pokojowej najpóźniej po 10 minutach.

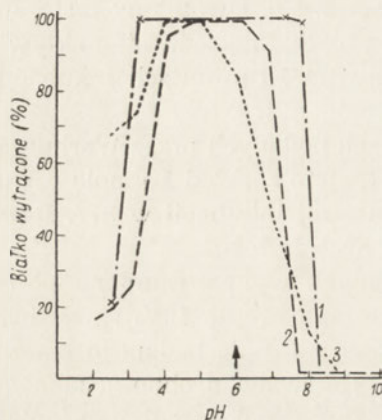
WYNIKI

ZAGĘSZCZANIE I REGENERACJA BIAŁEK ZIEMNIAKA I ALDOLAZY

Warunkiem odzyskania około 80% białek po ich strąceniu taniną i regenerowaniu kofeiną jest, jak wykazano poprzednio [6], odpowiednio dobrany stosunek wagowy ciał reagujących w optymalnym dla danego białka zakresie pH. Nadmiar taniny użyty do wytrącania białek obniża wydajność w ich regenerowaniu kofeiną. Stosując postępowanie podane poprzednio [5] przebadano zależność pomiędzy pH roztworu a efektywnością strącania białek ziemniaka i aldolazy. Wyniki przedstawiono na rysunku 1. Białka ziemniaka strącają się w 100% jedynie w pH 4 do 5 przy stosunku wagowym B:T=1 (krzywa 3). Przy wyższych i niższych pH krzywa wolno opada tak, że w pH 2,6 lub 6,4 strąca się jeszcze 68% białek. Dopiero w pH 8,6 białka ziemniaka nie reagują z taniną. Przy niższych stężeniach taniny (B:T>1) nie uzyskiwano całkowitego strącania białek w obrębie badanej skali pH.

Inaczej kształtował się przebieg strącania liofilizowanej aldolazy, tak przy stosunku wagowym B:T=1, jak i przy B:T=1:0,25. W pierwszym przypadku aldolaza strącała się w 100% w szerokim przedziale pH od 3,2 do 7,9 (krzywa 1). Powyżej i poniżej tego zakresu pH ostro urywa się strącanie aldolazy, gdyż w pH 2,6 wytrącało się zaledwie 20% białka, a w pH 8,6 reakcja nie zachodziła. Powtórzono doświadczenie obniżając czterokrotnie stężenie taniny (krzywa 2). Charakter krzywej pozostał bez zmian, gdyż aldolaza reagowała z taniną równie ostro jak poprzednio

(krzywa 1), z tą jednak różnicą, że zakres pH dla zupełnego strącenia białka znalazł się w wąskich granicach od pH 5 do 6. W dalszym postępowaniu strącano białka ziemniaka w pH 4,7 przy stosunku wagowym B:T=1, natomiast aldolazę w pH 6,1 przy B:T=1:0,5.



Rys. 1. Wpływ pH na strącanie tanią: (3) białek ziemniaka przy B:T=1 (.....); (1) aldolazy przy B:T=1 (— · — · —) (2) aldolazy przy B:T=1:0,25 (— — —). Wyciąg z ziemniaków I, aldolaza preparat II (patrz Tabl. I). Warunki doświadczenia według Mejbaum-Katzenellenbogen [5]

Oba preparaty aldolazy regenerowały się kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych z podobną wydajnością wynoszącą 75 do 80%. Najlepszą wydajność w regenerowaniu białek ziemniaka uzyskano pracując na młodych ziemniakach (preparat IV). Białka ziemniaków przechowywanych przez zimę (preparaty I, II i III) regenerowały się z gorszą wydajnością w 50 do 70%. Uzyskano przeciętnie dziesięciokrotne zagęszczenie białek w roztworach po regeneracji. Zagęszczone roztwory białek ziemniaka posiadały jasnobrunatną barwę, nie zawierały nieorganicznych fosforanów i nie dawały odczynu z jodem.

WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE BIAŁEK REGENEROWANYCH

Wysalanie białka siarczanem amonowym

Wysalanie białek obojętnymi solami jest jedną z najogólniej stosowanych metod w ich frakcjonowaniu i oczyszczaniu; zajęto się zatem zbadaniem o ile zmieni się rozpuszczalność białek ziemniaka w roztworach siarczanu amonowego po regenerowaniu ich z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. Z roztworów wyjściowych (0,12% białka) i zagęszczonych (1,4%) wysalano białko wzrastającymi stężeniami siarczanu amonowego w pH 5 i pozostawiano na 24 godz. w 5°. Po odwirowaniu oznaczano w płynie pozostałe nie wysolone białko metodą taninową, dba-

Tablica 1

Zagęszczanie białek ziemniaka i aldolazy z mięśni królika przy pomocy taniny i kofeiny

W — wyjściowy roztwór białka, Z — zagęszczony roztwór białka po regeneracji kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych (patrz Materiały i Metody).

Materiał	Numer preparatu	Roztwór	Białko (g/100 ml)	Objętość (ml)	Stopień zagęszczenia	Białko całkowite (g)	% białka regenerowanego
Aldolaza	I	W	0,18	2,0	—	0,0036	—
		Z	1,37	0,2	7,5	0,0027	75
	II	W	0,85	20,0	—	0,170	—
		Z	3,52	4,0	4,1	0,140	82,5
Ziemniaki	I	W	0,08	300,0	—	0,240	—
		Z	1,40	10,0	17,0	0,140	58,0
	II	W	0,17	100,0	—	0,170	—
		Z	1,74	7,0	10,0	0,120	70,0
	III	W	0,16	1520,0	—	2,520	—
		Z	1,75	85,0	11,0	1,490	59,1
	IV	W	0,12	100,0	—	0,120	—
		Z	1,40	6,5	11,6	0,093	81,0

Tablica 2

Rozpuszczalność białek ziemniaka znajdujących się w roztworze wyjściowym, lub zagęszczonym przy pomocy taniny i kofeiny w zależności od stężenia siarczanu amonowego

Charakterystyka roztworu wyjściowego i zagęszczonego znajduje się w tablicy 1 (ziemniaki IV). Wykonanie: Do próbek wirówkowych odmierzano po 0,2 lub 0,1 ml badanego roztworu białek i uzupełniano do 1 ml 1% NaCl i nasyconym siarczanem amonowym o pH 5 tak, aby uzyskać określone nasycenie siarczanu amonowego. Próbkę pozostawiano w 5°, po 24 godz. wirowano przy 3000 obr./min. Nie wysolone białko oznaczano mikrometodą taninową (4), pobierając po 0,25 ml względnie 0,05 ml płynu.

Nasycenie siarczanem amonowym	Białko w płynie nad osadem					
	roztwór wyjściowy		roztwór zagęszczony			
	0,2 ml		0,02 ml		0,1 ml	
	µg	‰	µg	‰	µg	‰
0	230	100	248	100	1 450	100
0,1	236	101	260	104	1 460	100
0,2	228	99	236	95	1 360	93
0,3	172	77	192	77	1 140	78
0,4	128	56	148	60	880	61
0,5	60	26	64	26	360	25
0,6	0	0	0	0	0	0
0,7	0	0	0	0	0	0

jąc o to, by stężenie siarczanu amonowego w próbkach nie przekraczało 0,1 nasycenia.

Uzyskane wyniki przedstawia tablica 2. Z roztworów wyjściowych i zagęszczonych, przy połowicznym nasyceniu siarczanem amonowym pozostaje w roztworze 26% białek ziemniaka, przy 0,6 nasycenia białko ulega całkowitemu wysoleniu, a przy 0,3 nasycenia pozostaje w płynie nad osadem 77%. Nie znaleziono zatem różnic ilościowych w rozpuszczalności białek ziemniaka w siarczanie amonowym przed i po regeneracji nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych.

Aglutyniny roślinne

Soki wielu roślin posiadają zdolność aglutynowania czerwonych krwinek ludzkich i zwierzęcych. Świeży sok z ziemniaków daje, według Popielskiego [9], jeszcze w rozcieńczeniu 1 : 256 aglutynację krwinek ludzkich.

Tablica 3

Miano aglutynin roślinnych wobec krwinek ludzkich grupy A i B, znajdujących się w poszczególnych roztworach białek ziemniaka (II)

Przed oznaczeniem miana roztwory rozcieńczano 1% NaCl, tak aby stężenie białka wynosiło 0,17%. Do oznaczania miana sporządzano geometryczny szereg rozcieńczeń.

	Postępowanie	Stężenie białka (g/100 ml)	Miano			
			Krwinki A		Krwinki B	
			Stężenie białka (g/100 ml)	Rozcieńczenie	Stężenie białka (g/100 ml)	Rozcieńczenie
Roztwór wyjściowy	—	0,170	0,00136	128	0,00068	256
	Białko wysolone siarczanem amonowym i rozpuszczone w 1% NaCl*	0,170	0,00023	770	0,00012	1540
Roztwór zagęszczony	—	0,170	0,00040	435	0,00020	870
	Białko wysolone siarczanem amonowym i rozpuszczone w 1% NaCl*	0,170	0,00023	768	0,00012	1536

* do 10 ml roztworu wyjściowego oraz do 1 ml roztworu zagęszczonego dodano 6,2 g siarczanu amonowego, względnie 0,62 g, po 3 godz. w temperaturze pokojowej wirowano przy 3000 obr./min. Osad rozpuszczano w 1 ml 1% NaCl i po paru minutach ponownie wirowano dla usunięcia nie rozpuszczonego białka.

W tablicy 3 podano wyniki oznaczania miana poszczególnych roztworów białek ziemniaka w aglutynacji krwinek ludzkich grupy A i B. Badane roztwory zawierały po 170 mg białka rozpuszczonego w 100 ml 1% NaCl. Poszczególne roztwory zawierały białko rodzime (wyjściowy roz-

twór), białko regenerowane kofeiną (zagęszczony roztwór), białko wysolone w 0,8 nasycenia siarczanu amonowego z roztworu wyjściowego i zagęszczonego. We wszystkich wymienionych roztworach miano dla krwinek B było dwukrotnie wyższe niż dla krwinek A. W opisanym doświadczeniu wyjściowy roztwór białek ziemniaka aglutynował krwinki grupy A w rozcieńczeniu 1 : 128, zaś grupy B w 1 : 256. Roztwory zawierające białko regenerowane zlepiły krwinki obu grup w trzykrotnie większych rozcieńczeniach (miano 1 : 435 wobec grupy A, i 1 : 870 wobec grupy B). Białka ziemniaka wysalane siarczanem amonowym, tak z wyjściowego roztworu, jak i zagęszczonego, po rozpuszczeniu w 1% NaCl i odwirowaniu nierozpuszczającego się białka, aglutynowały krwinki z jednakową siłą, dając dla krwinek grupy A miano 1 : 770, a dla grupy B 1 : 1540. Uzyskano zatem sześciokrotny wzrost miana w odniesieniu do roztworów wyjściowych i dwukrotny w stosunku do białek regenerowanych. Strata białka przy rozpuszczaniu białek wysolonych siarczanem amonowym dla białka rodzimego i regenerowanego wynosiła 37%.

Białka ziemniaka regenerowane kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń taninowych zachowują nie zmienioną, w porównaniu do białek rodzimych, rozpuszczalność w roztworach chlorku sodowego, nawet po wysoleniu ich siarczanem amonowym i wykazują większą siłę w aglutynowaniu krwinek zachowując różnice w wysokości miana wobec krwinek o odmiennych cechach grupowych. Wzrost miana nie jest wywołany obecnością taniny lub kofeiny, gdyż taki sam efekt uzyskuje się wysalając białka ziemniaka siarczanem amonowym z roztworów wyjściowych.

Wyciąg z ziemniaków zawiera prawdopodobnie ciała niebiałkowe hamujące zlepienie krwinek. Przemawia za tym trzykrotny wzrost miana roztworów zagęszczonych, które pozbawione składników niebiałkowych zawierają substancje zlepiające krwinki podatne do dalszego oczyszczania siarczanem amonowym.

Aktywność enzymatyczna kwaśnej fosfatazy i aldolazy

W tablicy 4 podano wyniki oznaczania aktywności kwaśnej fosfatazy ziemniaków w roztworach wyjściowych i zagęszczonych. Badano zależność pomiędzy stężeniem białka w próbie a aktywnością enzymu oraz wpływ fluorku, jonów magnezu i nieorganicznych fosforanów.

Fluorki hamują zupełnie aktywność kwaśnej fosfatazy tak w roztworach wyjściowych jak i zagęszczonych zawierających białka regenerowane. W roztworach zagęszczonych wzrasta dwukrotnie aktywność właściwa enzymu. Wzrost aktywności enzymatycznej może polegać na oczyszczeniu białka lub usunięciu czynników hamujących. Nie polega to jednak na usunięciu nieorganicznych fosforanów i jonów magnezowych, ponieważ dodanie ich nie zmniejsza aktywności regenerowanej fosfatazy.

Tablica 4

Aktywność kwaśnej fosfatazy ziemniaka w roztworach wyjściowych i zagęszczonych przy pomocy taniny i kofeiny

Jednostki aktywności wyrażono w μg nieorganicznego fosforu zwalnianego z soli dwusodowej fenilfosforanu po 15 min. w 37° .

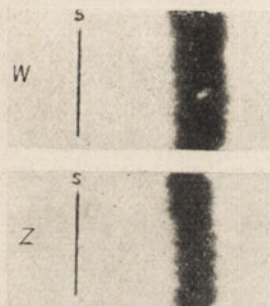
Rodzaj preparatu (ziemniaki II)	Dodano	μg białka w próbce	μg fosforu		Jednostki aktywności (μg P)	Aktywność właściwa
			inkubacja			
			0	15 min.		
Roztwór wyjściowy	—	35	5	10	5	143
		70	9	21	12	172
	NaF 10^{-2} M	35	5	5	0	0
		70	11	10	0	0
Roztwór zagęszczony	—	35	0	11	11	314
		70	0	23	23	328
	NaF 10^{-2} M	35	0	0	0	0
		70	0	0	0	0
	MgSO_4 10^{-2} M	26	0	8	8	308
		35	0	13	13	370
		52	0	19	19	365
	KH_2PO_4 10^{-3} M	35	35	47	12	342
		70	35	56	21	300

Tablica 5

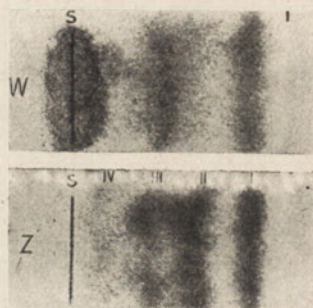
Porównanie aktywności całkowitej i właściwej kwaśnej fosfatazy ziemniaków i aldolazy z mięśni królika oznaczanej w roztworach wyjściowych (W) i zagęszczonych (Z) przy pomocy taniny i kofeiny

Jednostki aktywności aldolazy wyrażono w μmol ach rozłożonego estru fruktozo-1,6-dwufosforowego po 5 min. w 37° , według Warburga i Christiana [12]. Jednostki aktywności fosfatazy wyrażono w μg nieorganicznego fosforu zwalnianego z soli dwusodowej fenilfosforanu po 15 min. 37°

Materiał	Numer preparatu	Roztwór	Białko		Aktywność			
			g	‰	całkowita		właściwa	
					jednostki	‰	jednostki	‰
Aldolaza	I	W	0,0036	100	18,72	100	5,2	100
		Z	0,0027	75	12,96	70	4,8	92
	II	W	0,042	100	318,00	100	7,4	100
		Z	0,0325	82	245,00	80	7,0	95
Ziemniaki	II	W	0,170	100	30 000,00	100	170,0	100
		Z	0,120	70	39 000,00	130	320,0	190
	III	W	2,400	100	480 000,00	100	200,0	100
		Z	1,420	58	596 000,00	120	400,0	200



Rys. 2. Elektroforeza bibułowa aldolazy (preparat I). (W) roztwór wyjściowy aldolazy, 520 μg białka; (Z) roztwór aldolazy zagęszczony taniną i kofeiną 700 μg białka. 0,02 ml roztworu nanoszono na bibułę Whatman 1, w odległości 2 cm od środka w stronę katody. Moderator weronalowo-octanowy, pH 9, $\mu = 0,06$; 6 godzin, 280 Volt, 0,25–0,5 mA/cm. Barwienie wg Mejbaum-Katzenellenbogen i Dobryszczyckiej [7].



Rys. 3. Elektroforeza bibułowa białek ziemniaka. (W) wyjściowy roztwór, nanoszono 0,1 ml zawierający 165 μg białka, (Z) zagęszczony roztwór, nanoszono 0,01 ml zawierający 200 μg białka. Warunki elektroforezy jak podano w metodach. Barwienie wg Mejbaum-Katzenellenbogen i Dobryszczyckiej [7]. Ziemniaki III. (Tabl. 1).

W tablicy 5 porównano zmiany w aktywności całkowitej i właściwej badanych preparatów aldolazy z mięśni królika i kwaśnej fosfatazy ziemniaków. We wszystkich badanych preparatach stwierdzono dwukrotny wzrost aktywności właściwej fosfatazy wraz ze wzrostem aktywności całkowitej. W obu preparatach liofilizowanej aldolazy aktywność właściwa po regeneracji praktycznie nie zmienia się, natomiast aktywność całkowita obniża się równoległe do straty białka występującej przy regeneracji.

Elektroforeza bibułowa

Rysunek 2 przedstawia fotografie dwóch elektroforogramów aldolazy: "W" wyjściowej (520 μg) i "Z" regenerowanej (700 μg). W obu przypadkach widoczna jest jedna frakcja białkowa o takiej samej ruchliwości, bez śladu białka w miejscu naniesienia próbki na pasek bibuły.

Rysunek 3 przedstawia dwa równoległe wykonane elektroforogramy białek ziemniaka. Pierwszy z nich (W) daje rozkład frakcji białkowych wyjściowego roztworu (165 μg białka w 0,1 ml.), drugi (Z) roztworu białka zagęszczonego (0,01 ml zawierający około 200 μg białka regenerowanego). Oba elektroforogramy różnią się ostrością rozdziału i ilością widocznych frakcji. W pierwszym przypadku widoczne są duże ilości białka na linii startu i dwie frakcje białkowe na tle nie rozdzielonego białka. W drugim elektroforogramie uzyskano wyraźne cztery frakcje białkowe bez tła i śladów białka na linii startu.

Tablica 6

Ilościowe oznaczenie rozdzielonych elektroforezą bibułową frakcji białkowych ziemniaka po ich strąceniu tanią i regenerowaniu kofeiną

Warunki elektroforezy bibułowej w tekście. Do NaOH eluowano białko z zabarwionych elektroforogramów odczynkiem „Kado” wg Mejbaum i Dobryszczyckiej [7]. Do NaCl i moderatora octanowego eluowano nie barwione elektroforogramy. Czas elucji chlorkiem sodowym wynosił 12 godz. w 5°, moderatorem octanowym 3 godz. w temperaturze pokojowej. Białko oznaczano mikro-metodą taniową [4]

Numer preparatu	Eluowano do 2 ml	Frakcje białkowe								Znaleziono (μg)	Dano (μg)	Odzyskano (%)
		I		II		III		IV				
		μg	0/0	μg	0/0	μg	0/0	μg	0/0			
I III	0,1 N-NaOH	68	30	94	41	42	18,4	24	10,6	228	260	88
		80	30	110	40	58	20	29	10	277	285	97
I	0,9/0 NaCl	55	22,2	100	40,5	62	25	30	12	247	260	95
I III	0,1 M-moderatora octanowego pH 5	32	20	70	43	52	32	8	5	162	260	62
		44	26	72	43	36	22	16	9	168	285	59
Średnia arytmetyczna		25,7 $\pm 4,5$		41,5 $\pm 1,4$		23,5 $\pm 5,3$		9,3 $\pm 2,7$				

W tabelicy 6 przedstawiono wyniki oznaczeń frakcji uzyskanych w elektroforezie bibułowej regenerowanych białek ziemniaka. Oznaczenia ilościowe pierwszych dwóch doświadczeń przeprowadzono po utrwaleniu pasków w 100°, zabarwieniu odczynnikami "Kado" i elucji poszczególnych frakcji 0,1N-NaOH (Mejbaum i Dobryszczycka [7]). Dla preparatu I odnaleziono 88% białka poddanego elektroforezie, dla preparatu III, 97%. W obu elektroforogramach względny rozkład frakcji był taki sam. Frakcja I, najszybciej wędrująca do anody, stanowi 30% białka całkowitego, frakcja II, 40%, frakcja III 20% a frakcja IV, najwolniejsza, tylko 10%. Z frakcji tych jedynie I i III były widoczne w elektroforogramach wyjściowych roztworów białek. Frakcja II, ilościowo największa w roztworach zagęszczonych nie była widoczna w elektroforogramach białek rodzimych (Rys. 3).

Przeprowadzono również ilościowe oznaczanie stężenia poszczególnych frakcji białkowych w elektroforogramach suszonych w temperaturze pokojowej bez barwienia, eluując je 2 ml 1% NaCl lub 0,1M-moderatorem octanowym o pH 5. Po wymyciu chlorkiem sodowym uzyskano 95% białka poddanego elektroforezie, natomiast moderator octanowy eluował zaledwie 60%. Pomimo różnic w wydajności eluowania białka poszczególnymi rozpuszczalnikami względny rozkład frakcji białkowych, tak w barwionych, jak i nie barwionych paskach bibuły, nie wykazywał większych różnic.

Tabelica 7

Aktywność regenerowanej kwaśnej fosfatazy ziemniaka eluowanej z elektroforogramów

Warunki elektroforezy w tekście. Doświadczenie wykonano na białkach ziemniaka-III

Frakcja białkowa	μg białka w eluacie	Jednostki aktywności	Aktywność właściwa
I	44	17	386
II	72	0	0
III	36	0	0
IV	16	0	0
Suma	168	17	101
Wzięto do rozdziału	285	35	123
Odnaleziono %	59	48,6	82

W tabelicy 7 podano wyniki oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej we frakcjach białkowych. Na paski bibuły nanoszono po 285 μg białka regenerowanego. Jeden z pasków po elektroforezie barwiono, i kierując się widocznym na nim rozkładem frakcji eluowano je z pasków nie barwionych 2 ml moderatora octanowego o pH 5. Z eluatów pobierano po

1 ml. do oznaczenia białka i po 1 ml. do do oznaczenia aktywności fosfatazy. Aktywny enzym znaleziono jedynie w frakcji najszybciej wędrującej (Frakcja I). W podanym doświadczeniu aktywność właściwa kwaśnej fosfatazy po elektroforezie i elucji białka z bibuły do moderatora octanowego pozostała nie zmieniona w granicach błędu oznaczeń. Moderator octanowy wymywał z bibuły tylko 59% białka poddanego elektroforezie i odnajdywano 48% całkowitej aktywności enzymu. Obliczenie aktywności właściwej dla frakcji I wykazuje, że nastąpiło czterokrotne oczyszczenie fosfatazy.

Jak widać z podanych doświadczeń, stosując taninę i kofeinę, można zagęścić dziesięciokrotnie białka wyciągu z ziemniaka i uzyskać dwukrotny wzrost aktywności właściwej fosfatazy kwaśnej jeszcze przed podjęciem prób oczyszczania jej od innych białek. Kwaśna fosfataza regenerowana zachowuje cechy odróżniające ją od innych izodynamicznych kwaśnych fosfataz, gdyż nie jest ani hamowana, ani aktywowana przez jony magnezu. Można ją zatem zaliczyć do grupy kwaśnych fosfomonoesteraz typu II, według nomenklatury wprowadzonej przez Folleya i Kaya [3]. Według Roche'a i Courtois'a [10], fosfataza ta jest jedyną znaną fosfatazą występującą w ziemniakach.

Pani Jadwidze Musze, asystentce technicznej, dziękujemy za gorliwą pomoc w przeprowadzonych doświadczeniach.

Kierownikowi Zakładu Fotografiki Akademii Medycznej we Wrocławiu, Panu mgr Bronisławowi Kupcowi, dziękujemy za wykonanie fotografii elektroforogramów.

STRESZCZENIE

1. Porównano niektóre własności białek ziemniaka i aldolazy z mięśni królika po ich regeneracji kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń białko-taninowych, z własnościami odpowiednich białek w roztworach wyjściowych.

2. Białka ziemniaka wytrącano całkowicie w pH 4—5 przy stosunku wagowym białka do taniny 1:1. Aldolazę w pH 5—6 przy stosunku wagowym 1:0,5. Z połączeń usuwano taninę kofeiną i odzyskiwano 50—70% białek ziemniaka, oraz 80% aldolazy.

3. Wyjściowe roztwory białek ziemniaka, zawierające 0,12—0,17% białka, zagęszczano przy pomocy taniny i kofeiny 10-krotnie.

4. Badano następujące własności białek regenerowanych: a) Zachowanie w elektroforezie bibułowej. Białka z wyciągu ziemniaka nie dawały wyraźnego obrazu, natomiast po regeneracji uzyskano rozdział na 4 wyraźne frakcje. b) Rozpuszczalność białek ziemniaka w roztworach siarczanu amonowego nie ulega zmianie. c) Aktywność enzymatyczna regenero-

wanej aldolazy również nie uległa zmianie. Kwaśna fosfataza ziemniaka wykazuje po regeneracji dwukrotny wzrost aktywności właściwej, nie zmienioną wrażliwość na fluorki i niewrażliwość na jony magnezu. W elektroforezie bibulowej wędruje z frakcją I. d) Zdolność aglutynowania krwinek grup A i B przez białka zawarte w wyciągu ziemniaka odnajduje się w białkach regenerowanych. W stosunku do roztworu wyjściowego uzyskano trzykrotny wzrost miana. Wysolenie białek regenerowanych siarczanem amonowym prowadzi do dalszego oczyszczenia substancji aglutynujących krwinki ludzkie.

5. Należy przypuszczać, że w wyciągach z ziemniaka znajdują się związki niebiałkowe, które hamują aktywność kwaśnej fosfatazy i obniżają miano nieswoistych aglutynin.

LITERATURA

- [1] Ehrenburg M. *Biochem. Z.* 325, 102, 1954.
- [2] Fiske A., Subbarow Y. *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925.
- [3] Polley S. J., Kay H. D. *Ergebn. Enzymforsch.* 5, 159, 1936.
- [4] Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Bioch. Polon.* 2, 279, 1955.
- [5] Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Bioch. Polon.* 6, 375, 1959.
- [6] Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Acta Bioch. Polon.* 6, 385, 1959.
- [7] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Dobryszczyka W. *Clin. Chim. Acta* 4, 515, 1959.
- [8] Neuberg C., Lustig H. *J. Am. Chem. Soc.* 64, 2722, 1942.
- [9] Popielski B., Brzecka K. *Pol. Tyg. Lek.* IX, 353, 1954.
- [10] Roche J., Courtois J. *Exp. Ann. Biochim. Med.* 4, 219, 1944.
- [11] Taylor J. F., Green A. A., Cori G. T. *J. Biol. Chem.* 173, 593, 1948.
- [12] Warburg O., Christian W. *Biochem. Z.* 314, 149, 1943.

STUDIES ON REGENERATION OF PROTEIN FROM INSOLUBLE PROTEIN-TANNIN COMPOUNDS

II. SOME PROPERTIES OF REGENERATED PROTEINS ILLUSTRATED BY MEANS OF THE RABBIT MUSCLES ALDOLASE AND POTATO ACID PHOSPHATASE

Summary

1. Some properties of the potato proteins and the rabbit aldolase regenerated with caffeine, from insoluble protein-tannin compounds, have been compared with the properties of the same proteins in their original solutions.

2. The potato proteins were completely precipitated at pH 4 to 5, when the ratio (in weight) of protein to tannin was 1:1, while aldolase was precipitated at pH 5 to 6 and the ratio 1:0.5. Tannin was removed from these compounds by means of caffeine and 50% to 70% of potato proteins, and 80% of aldolase was recovered.

3. The original solutions of potato proteins, containing 0.12% to 0.17% of protein, were concentrated 10 times by means of tannin and caffeine.

4. The following properties of regenerated proteins have been studied: a) Their behaviour in paper electrophoresis. Four distinct fractions were obtained from regenerated potato proteins, what was not possible before regeneration. b) Their solubility in ammonium sulphate solutions did not change. c) Enzymatic activity of regenerated aldolase remained unaffected. The potato acid phosphatase showed the specific activity twice that found before regeneration, unchanged sensibility towards fluorides and remained unaffected by Mg^{++} . In paper electrophoresis it moved within fraction I. d) The regenerated potato proteins preserved their original ability to agglutinate erythrocytes of A and B blood groups. The threefold increase of the titer was obtained as compared with the original solution. The precipitation of regenerated proteins with ammonium sulphate resulted in the further purification of the substances agglutinating human erythrocytes.

5. Probably, there are some non-protein compounds in potato extracts, which inhibit the acid phosphatase and lower the titer of non-agglutinating human erythrocytes.

Otrzymano 5.8.1959 r.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in all financial dealings. The second part outlines the specific procedures for recording and reporting these activities, including the use of standardized forms and the regular submission of reports to the relevant authorities. The third part discusses the consequences of non-compliance with these regulations, including potential fines and legal action. The document concludes with a statement of intent to continue to work towards improving the efficiency and effectiveness of the financial system.