

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA

**Badanie zmian składu aminokwasowego w czasie trwania hodowli
Mycob. BCG szczepu francuskiego (nr muz. 848)**

**Исследования изменений в аминокислотном составе
во время возрастания *Mycob. BCG* французского штамма (№ 848)**

**Investigation of the Changes of Amino Acid Compositions
during Growing *Mycob. BCG* of French Strain (No. Muz. 848)**

Celem niniejszej pracy było: 1) zbadanie zmian wolnych aminokwasów w czasie trwania hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego (nr muz. 848), hodowanego przez nas na płynnym podłożu Sautona oraz 2) porównanie składu przehydroлизованей masy bakteryjnej wyżej podanego szczepu i szczepu brazylijskiego Moreau (1, 3).

MATERIAŁY I METODA

Materiał doświadczalny stanowiły: 1) szczep *Mycob. BCG* — (nr muz. 848) uzyskany z Muzeum Szczepów Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie (przesączka i masa bakteryjna) 2) masa bakteryjna *Mycob. BCG* szczepu brazylijskiego Moreau uzyskana z masowych hodowli z Lub. Wytwórni Surowic i Szczepionek. Za otrzymane materiały składam serdeczne podziękowanie Ob. Prof. Dr Henrykowi Meislowi oraz Dyrektorowi LWSiS dr Marianowi Biernackiemu.

Bakterie hodowano na płynnym podłożu Sautona (z Lub. WSiS) w temp. 37°C, pH podłoża wynosiło 7,4. Próby pobierano co 24, 48 i 72 godz. Przebadano 4 hodowle, uzyskując zgodne wyniki. Analizę wolnych aminokwasów podłoża i przesączy w czasie trwania hodowli oraz składu aminokwasowego hydrolizatów masy bakteryjnej obu szczepów wykonano przy pomocy chromatografii rozdzielczej na bibule, stosując technikę wstępującą wg Williams'a i Kirby (7), krążkową oraz rechromatografię, w wypadku słabego rozdziału niektórych aminokwasów. Używano bibuły Whatman nr 3, rozpuszczalnika o składzie n-butanol — kwas octowy lodow. — woda w stosunku 4:1:1 (objęt.). Do identyfikacji aminokwasów używano testu ninhydrynowego (0,2% acetonowy roztwór ninhy-

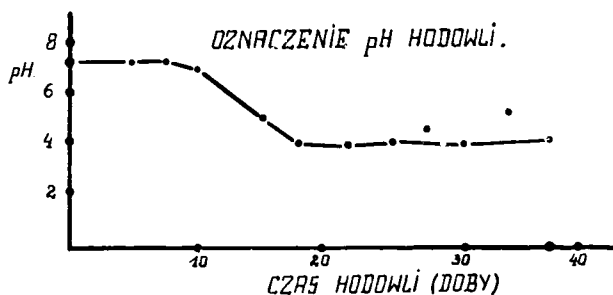
dryny), izatynowego (0,2% acetonowy roztwór izatyny), alloksanowego (0,25% acetonowy roztwór alloksanu z 4% amoniakiem) oraz reakcji specyficznych (5). Identyfikowano również aminokwasy przy pomocy lampy H.P.W. „Philips” do obserwacji w ultrafiolecie. Spis używanych aminokwasów jest podany w pracy Krzeczowskiej (6).

Suchą masę bakteryjną w ilości 20 mg hydrolizowano 6 n HCl (2 ml) w ciągu 36 godz. w temp. 100°C. Po odpędzeniu kwasu solnego przy pomocy ogrzewania promiennikami, suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml wody redestylowanej i nakraplano na bibułę 0,11 ml. Chromatogramy ninhydrynowe utrwalano przez zanurzenie w acetonowym roztworze chlorku miedziowego. Po należytych wysuszeniu w temp. pokojowej eluowano poszczególne aminokwasy metanolem. Zawartość aminokwasów w eluatach oznaczano przy pomocy spektrofotometru Colemana (Juniora) model GA, używając fali o dł. 550 milimikronów, grubość warstwy prześwietlanej wynosiła 10 mm (4). Stężenia aminokwasów oznaczano również przy pomocy bezpośredniej rejestracji, używając w tym celu specjalnego aparatu (2).

BADANIA WŁASNE

A. Badanie zmian składu wolnych aminokwasów w czasie trwania hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego

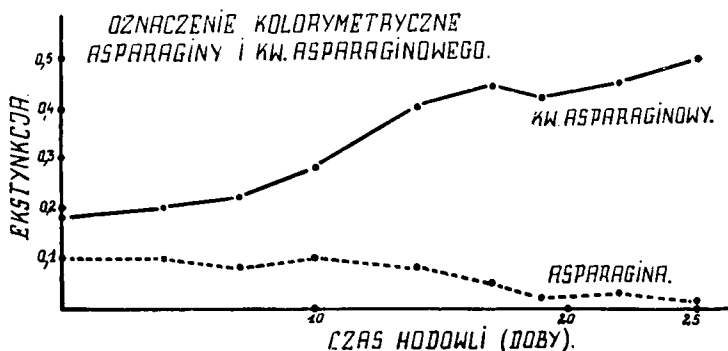
Przebadano 4 różne hodowle własne, pobierając próby co 3 doby (72 godz.), w czasie przypadających świąt próby pobierano co 2 lub 4 doby. pH podłoża wynosiło 7,4 i utrzymywało się na tej wysokości przez 240 godzin, następnie kwasowość gwałtownie wzrastała, najwięcej między 11 i 18 dobą (264 godz — 432 godz.), osiągała wartość 4,4 i na tej wysokości utrzymywała się (odchylenie w granicach błędu doświadczalnego). Wykres pH przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Wykres zmian pH w czasie trwania hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego (nr Muz. 848)

The graph of pH changes during growing *Mycob. BCG* of the French strain (No. Muz. 848)

Skład wolnych aminokwasów podłoża (po autoklawowaniu): asparagina w dużym stężeniu i kwas asparaginowy w małym stężeniu. Wynik analizy podłoża Sautona podano na ryc. 4a (pierwsza kolumna). W miarę rozwijania się hodowli widoczny spadek stężenia asparaginy i wzrost stężenia kwasu asparaginowego. Zmianę stężeń daje się zaobserwować na rycinach 3, 4a i 4b. Najgwałtowniejszy przyrost stężenia kwasu asparaginowego przypada między 10 i 17 dobą (340—408 godz.), co jest widoczne na rycinach 2, 4a i 4b.



Ryc. 2. Zmiany stężenia asparaginy i kwasu asparaginowego w czasie trwania hodowli *Mycob. BCG*

The changes of asparagine and aspartic acid concentrations during growing *Mycob. BCG*

W czasie trwania hodowli najczęściej pojawia się ślad leucyny i alaniny, już w 2 dobie, w przesączu 8 doby dało się zaobserwować ślady glicyny i treoniny, następnie tyrozyny i tryptofanu (ryc. 3) w jedenastej dobie pojawiał się kwas glutaminowy, którego stężenie wzrastało po 15 dobie. W 18 dobie pojawia się arginina i wzrasta stężenie treoniny i alaniny, a w 20 można zaobserwować ślad lizyny i histydyny, pojawia się również nie zidentyfikowana plama powyżej leucyny. Od 18 do 23 doby nie była widoczna asparagina, w przesączach dwóch hodowli ponownie zaobserwowano pojawienie się jej (ślad) w 23 dobie hodowli, w tym czasie wzrastało stężenie kwasu glutaminowego, natomiast stężenia poprzednio wykrytych aminokwasów wyraźnie się zmniejszyły (ryc. 3). Zauważyć należy, że pojawiające się aminokwasy posiadają tak małe stężenie, że dają się zaobserwować tylko

po wywołaniu ninhydryną, izatyną ani alloksanem nie dało się ich wykryć. Ryc. 4a i 4b przedstawiają chromatogramy podłoża Sautona i przesączy (od 1 do 26 dnia) hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego.



Ryc. 3. Chromatogram przesączy *Mycob. BCG* szczepu francuskiego w ósmym dniu hodowli; na zdjęciu widoczne pojawiające się aminokwasy
The filtrate chromatogram of *Mycob. BCG* of the French strain on the eight day of growing; in the picture amino acids are visible

B. Analiza jakościowa związanych aminokwasów masy bakteryjnej prątką BCG szczepu francuskiego i szczepu brazylijskiego Moreau

Analiza chromatograficzna aminokwasów masy bakteryjnej wyżej podanych szczepów nie wykazała różnic w składzie jakościowym. Ryc. 5 przedstawia chromatogramy aminokwasów wykrytych w obu szczepach: lizynę, histydynę, argininę, kwas asparaginowy, glicynę i serynę, kwas glutaminowy i treoninę, alaninę, tyrozynę, tryptofan, walinę, fenyloalaninę i leucynę. Tab. 1 przedstawia uzyskane wyniki składu aminokwasowego prątków *Mycob. BCG* szczepu francuskiego i szczepu brazylijskiego Moreau.



Ryc. 4a. Aminokwasy podłoża Sautona i przesączy od 1 do 15 dnia hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego
The amino acids of the Sauton's medium and filtrates from the 1st to the 15th day of growing *Mycob. BCG* of the French strain



Ryc. 4b. Aminokwasy przesączy od 15 do 26 dnia hodowli *Mycob. BCG* szczepu francuskiego
The amino acids of filtrates from the 15th to the 26th day of growing *Mycob. BCG* of the French strain

C. Ilościowe badanie składu aminokwasowego hydrolizatu kwaśnego masy bakteryjnej szczepów: francuskiego (nr muz. 848) i brazylijskiego

W tab. 2 zebrano wyniki porównawczych oznaczeń ilościowych aminokwasów wykrytych analizą chromatograficzną w hydrolizatach kwaśnych masy bakteryjnej szczepu francuskiego (nr muz. 848) oraz szczepu brazylijskiego Moreau. Ilościowe badania przeprowadzono spektrofotometrem Colemana (Juniora) przy długości fali 550 milimikrona i grubości warstwy 10 mm. W kolumnie 3 (tab. 2) podano ekstynkcję $E \times 1000$ dla aminokwasów masy bakteryjnej szczepu francuskiego w czwartej $E \times 1000$ dla aminokwasów masy bakteryjnej szczepu bra-

zylijskiego Moreau, w kolumnie 5 obliczono stężenie (w procentach) aminokwasów hydrolizatów masy bakteryjnej szczepu brazylijskiego w porównaniu ze stężeniem aminokwasów hydrolizatów masy bakteryjnej szczepu francuskiego.



Ryc. 5. Chromatogramy składu aminokwasowego hydrolizatów mas bakteryjnych *Mycob. BCG* szczepu francuskiego i szczepu brazylijskiego Moreau

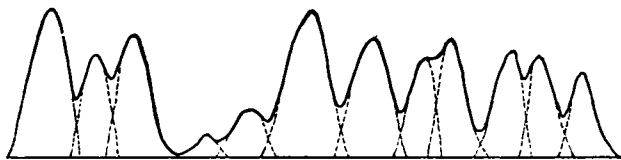
The chromatograms of amino acids composition of hydrolysates of bacteria mass *Mycob. BCG* of the French strain and the Brazilian strain

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wykres przedstawiający pomiary pH uwidacznia wzrost kwasowości od $\text{pH}=7,4$ do $\text{pH}=4,4$, po czym pH utrzymuje się na tym poziomie (w granicach błędu doświadczalnego) przez 240 godzin. Po 240 godzinach następuje gwałtowny wzrost kwasowości między 11 i 18 dobą (264—432 godz.). W tym samym czasie obserwujemy (ryc. 2) wzrost stężenia kwasu asparaginowego i spadek stężenia asparaginy.

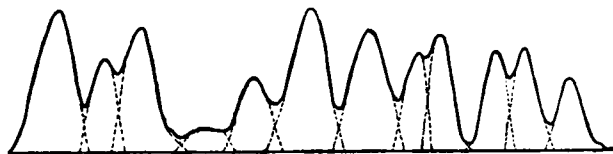
Kolejne pojawienie się w przesączach aminokwasów, począwszy od 48 godz. trwania hodowli, świadczy, że już wówczas odbywa się czynny proces enzymatyczny, prowadzący do syntezy związków azotowych.

Już po 48 godzinach pojawia się alanina i nikły ślad leucyny, w przesączu 8 doby widoczna jest glicyna i treonina, w przesączu jedenastej doby spostrzeżono walinę oraz kwas glutaminowy, którego stężenie w widoczny sposób wzrasta w przesączu, począwszy od 15 doby. W przesączu 13 doby pojawiła się tyrozyna, a w przesączu 17 zaobserwowano argininę i fenyloalaninę. Ślady lizyny i histydyny oraz nie zidentyfikowaną plamę ninhydrinopozytywną powyżej leucyny wykryto w przesączu 20 doby. W czasie trwania hodowli dało się zaobserwować zmniejszenie stężeń wykrytych aminokwasów, np. między 17 a 23 dobą. Na niektórych chromatogramach występowało znikanie waliny, na której miejsce pojawiała się jasna plama, świadcząca o obecności substancji redukującej. Między 18 a 23 dobą nie dało się już wykryć obecności asparaginy, na chromatogramie przesączu 23 doby natomiast pojawił się jej ślad. Proces znikania aminokwasów lub zmniejszania ich stężenia może być związany z intensywnym wzrostem bakterii, a więc z włączaniem aminokwasów w białka bakteryjne. Wytwarzanie substancji redukujących wskazuje na dodatkowe, działające enzymy.



Ryc. 6. Krzywe uzyskane metodą bezpośredniej rejestracji, obrazujące stężenia związanych aminokwasów szczepu francuskiego (nr Muz. 848)

Curves obtained by the immediate optical registration method, showing the concentrations of compound amino acids of the French strain (No. Muz. 848)



Ryc. 7. Krzywe uzyskane metodą bezpośredniej rejestracji, obrazujące stężenia związanych aminokwasów szczepu brazylijskiego Moreau

Curves obtained by the immediate optical registration method, showing the concentrations of compound amino acids of the Brazilian Moreau's strain

W przesączach 17 i 18 doby zaobserwowano 1) spadek stężenia kwasu asparaginowego (a później następuje dalszy jego wzrost) 2) spadek stężenia kwasu glutaminowego (po 18 dobie następował ponowny wzrost stężenia) 3) zniknięcie substancji redukującej, a pojawienie się

dużej ilości waliny, 4) zwiększenie stężenia alaniny i 5) pojawienie się fenyloalaniny. W dalszych badaniach zamierzamy sprawdzić, czy substancją redukującą jest kwas pirogronowy. Potwierdzenie bowiem tego przypuszczenia wyjaśniłoby: 1) fakt znikania kwasu glutaminowego, który może uczestniczyć obok kwasu asparaginowego w transaminacji, 2) pojawienie się dużej ilości alaniny, która może powstawać z reakcji kwasu pirogronowego z grupami aminowymi kwasu glutaminowego.

Tab. 1. Skład aminokwasowy *Mycob. BCG* szczepu francuskiego (Nr muz. 848) i szczepu brazylijskiego Moreau

The composition of amino acids of the bacteria mass *Mycob. BCG* of the French strain (No. Muz. 848) and the Brasilain Moreau's strain

L. p.	Aminokwas	Skład aminokwasowy <i>Mycob. BCG</i>	
		szczep francuski (N ^o muz. 848)	szczep brazylijski Moreau
1	Cystyna	—	—
2	Lizyna	+	+
3	Arginina	+	+
4	Histydyna	+	+
5	Kwas asparaginowy	++	++
6	Glicyna + seryna	+	+
7	Kwas glutaminowy + treonina	++	++
8	Alanina	+	++
9	Tyrozyna	±	+
10	Walina	++	++
11	Fenyloalanina	+	+
12	Leucyna	++	++

Legenda: + obecny aminokwas
++ obecny aminokwas w dużym stężeniu
— aminokwasu nie zaobserwowano

Wyniki oznaczania stężenia aminokwasów w hydrolizatach kwaśnych *Mycob. BCG* szczepu francuskiego i brazylijskiego Moreau zamieszczone w tab. 2, wykazują, że stężenia aminokwasów hydrolizatu szczepu francuskiego są większe od stężeń aminokwasów w hydrolizacie szczepu brazylijskiego Moreau. Obserwuje się dużą różnicę stężeń niektórych aminokwasów, np. stężenie tyrozyny w hydrolizacie szczepu brazylijskiego stanowi tylko 31,3 % stężenia tego aminokwasu w hydrolizacie szczepu francuskiego. Najmniejsze różnice w stężeniach przypadają dla kwasu glutaminowego i treoniny — 92,3 %. Tryptofan występował w tak małej ilości, że nie udało się go oznaczyć ilościowo (przeprowadzono hydrolizę kwaśną). Na ryc. 6 i 7 widzimy krzywe uzyskane w przyrządzie służącym do automatycznej rejestracji (wykonanym w Katedrze Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej

Tab. 2. Wartość ekstynkcji Ex 1000 dla aminokwasów hydrolizatów kwaśnych *Mycob. BCG* szczepów: francuskiego i brazylijskiego (długość fali 550 milimikrona)
 The extinction value (Ex 1000) of the amino acids of acid hydrolysates of *Mycob. BCG* of the French and Brazilian strains (the wavelength 500 m μ)

L. p.	Aminokwas	Ex 1000 szczep francuski	Ex 1000 szczep brazylijski	Stężenie aminokwasów masy bakteryjnej szczepu brazylijskiego w porównaniu ze stężeniem aminokwasów masy bakteryjnej szczepu francuskiego podane w %
1	2	3	4	5
1	Lizyna	50	40	80,0
2	Histydyna	70	46	65,7
3	Arginina	85	60	70,6
4	Kwas asparaginowy	100	75	75,0
5	Glicyna + seryna	90	60	66,6
6	Kwas glutaminowy + treonina	130	120	92,3
7	Alanina	210	115	54,7
8	Tyrozyna	32	10	31,3
9	Walina	125	75	60,0
10	Fenylalanina	45	30	66,7
11	Leucyna	210	150	71,4

w Lublinie) (2). Przyrząd ten, połączony ze stabilizatorem i mikropolarografem wg Heyrovsky'ego, pozwala na rejestrację zmian natężenia światła przechodzącego przez paski bibuły z plamami kompleksów Dyd+Cu, a więc można nim wykonać porównawcze ilościowe oznaczenia poziomu aminokwasów w badanych hydrolizatach lub przesączach. Z wykresów widzimy również brak różnicy jakościowej oraz zmiany ilościowej w składzie aminokwasów w hydrolizatach szczepu francuskiego i brazylijskiego Moreau.

PIŚMIENICTWO

1. Iskierko J.: *Med. Dośw. i Mikrob.* 2, 179—184, 1957.
2. Klimek J., Krzeczowska I.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* 15, 117—188, 1960.
3. Krzeczowska I., Iskierko J.: *Med. Dośw. i Mikrob.* 2, 185—188, 1960.
4. Krzeczowska I., Iskierko J., Klimek J.: *Farm. Polska* 15, 35—39, 1959.
5. Krzeczowska I., Misiuna D.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin, Sec. D.* 16, 299—305, 1961.
6. Krzeczowska I.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* 14, 99—107, 1959.
7. Williams R. J., Kirby H.: *Paper Chromatography Using Capillary Ascent. Science* 107, 481—483, 1948.

РЕЗЮМЕ

Произведен качественный анализ свободных аминокислот синтетической основы Саутона и фильтратов культуры (с 1 по 25 день возрастания) палочки *Mycob. BCG* французского штамма № 848. Отбор проб делался через каждые три дня. Бактерии росли на основе Саутона.

При исследовании употреблен метод распределительной хроматографии, с использованием техники: восходящая, сходящая, круговая. Качественные определения связанных аминокислот бактериальной массы были деланы: 1) колориметрически после элюирования и 2) при помощи непосредственной оптической регистрации.

Сопоставлен аминокислотный состав бактериальной массы *Mycob. BCG* французского штамма № 848 и бразильского штамма Моро.

1. График изменения рН во время возрастания *Mycob. BCG*.

2. Изменения концентрации аспарагины и аспарагиновой кислоты во время роста *Mycob. BCG*.

3. Хроматограмма фильтрата *Mycob. BCG* (восьмого дня роста), на снимке видны появляющиеся аминокислоты.

4 а. Аминокислоты основы Саутона и фильтратов с 1 по 15 день роста *Mycob. BCG* (французского штамма № 848).

4 б. Аминокислоты фильтратов с 15 по 26 день роста *Mycob. BCG* (французского штамма № 848).

5. Хроматограмма аминокислотного состава гидролизатов бактериальных масс *Mycob. BCG* французского штамма № 848 и бразильского штамма Моро.

6. Кривые, полученные методом непосредственной регистрации, отражающие концентрации связанных аминокислот *Mycob. BCG* французского штамма № 848.

7. Кривые, полученные методом непосредственной регистрации, отражающие концентрации аминокислот бразильского штамма Моро.

SUMMARY

The qualitative analysis of the free amino acids of the Sauton's medium and filtrates (from 1 to 25 days) of *Mycob. culture BCG* of the French strain No. Muz. 848 was carried out. Samples were taken every three days. Bacteria grew on the Sauton's medium. Partition paper chromatography was applied using ascending, descending and circular techniques. The quantitative analysis of compound amino acids of the bacteria mass was made by two methods: 1) colorimetric, after eluation, and 2) by immediate optical registration. The composition of amino acids of the bacteria mass *Mycob. BCG* of the French strain (No. Muz. 848) and that of the Brasilian Moreau's strain were compared.

Prace otrzymano 30 IV 1964.