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

Janusz KLIMEK

Badania nad przemianą aminokwasową płynnej hodowli laseczki tężca (*Clostridium tetani*). IV. Analiza jakościowa związanych aminokwasów podłoży i przesączy dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca

Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*). IV. Качественный анализ фиксированных аминокислот субстратов и фильтратов десятидневной культуры палочки столбняка

An Examination of the Amino Acid Transformation of the Liquid 10-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*. IV. Qualitative Analysis of Bound Amino Acid Media and Filtrates of the 10-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*.

Podczas ustalania składu jakościowego wolnych aminokwasów pożywek Legroux-Ramon oraz przesączy otrzymywanych z hodowli laseczki tężca stwierdzono, że w tych ostatnich już w drugim dniu inkubacji pojawia się: β -alanina i dwie nie zidentyfikowane ninhydrynopoztywne substancje (Klimek (4)). W związku z tym wyłonił się problem, czy wymienione produkty powstają na drodze proteolitycznego rozkładu podłoża, czy też na drodze metabolicznych przemian, jakie towarzyszą procesom życiowym laseczki tężca. Podjęcie obecnego tematu uzasadnia konieczność rozstrzygnięcia postawionych wyżej pytań w oparciu o przeprowadzone badania.

MATERIAŁY I METODY

Związane aminokwasy podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy laseczki tężca (Klimek (3)) określano chromatograficznie (Klimek (4)) po hydrolizie kwaśnej, przeprowadzonej w zatopionych ampułkach w obecności 6n HCl przez 36 godzin w temperaturze 120°C. Wszystkie wzorce aminokwasowe oraz odczynniki stosowane w pracy pochodziły z Hurtowni Chemicznej w Gliwicach.

BADANIA WŁASNE

a) Hydroliza podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*.

1 ml badanej próbki zakwaszono 4 ml 6 n HCl oraz umieszczano w zatopionej ampułce, którą wstawiano pionowo do zlewni ogrzewanej kuchenką elektryczną. Temperaturę 120°C ustalano przy pomocy odległości względem grzejnika. W omawianym przypadku nie przekraczała ona 5 cm. Po 36 godzinach ampułkę otwierano i usuwano substancje huminowe przez odwirowanie. Po odpędzeniu HCl w eksykatorze próżniowym suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml wody podwójnie destylowanej.

b) Chromatograficzna analiza jakościowa związanych aminokwasów podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*.

Wodny roztwór związanych aminokwasów, otrzymanych po hydrolizie kwaśnej nakraplano na bibułę chromatograficzną, po czym zidentyfikowano je zgodnie z opisem podanym w pracy Klimka (4). Skład jakościowy związanych aminokwasów w podłożach Legroux-Ramon oraz przesączach dziesięciodniowych hodowli laseczki tężca przedstawia tab. 1 i tab. 2. W drugiej kolumnie tych tabel podano nazwy aminokwasów, przy czym przez X_1 i X_2 oznaczano dwie nie zidentyfikowane ninhydrynopoztywne plamy. W trzeciej kolumnie umieszczono numery serii (cyfry arabskie określają podłoża użyte do masowych hodowli, cyfry rzymskie podłoża stosowane do posiewów kontrolnych w skali laboratoryjnej).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Zestawiając skład aminokwasowy podłoży Legroux-Ramon przed hydrolizą (tab. 1 — Klimek (4)) oraz po hydrolizie (tab. 1), stwierdza się dodatkowo w tych ostatnich: cystynę i hydroksyprolinę. Równocześnie zauważa się w analizowanych pożywkach brak β -alaniny oraz dwu nie zidentyfikowanych ninhydrynopoztywnych związków. Podobne zestawienia przeprowadzone dla dziesięciodniowych przesączy hodowli laseczki tężca przed hydrolizą (tab. 2 — Klimek (4)) oraz po hydrolizie (tab. 2) wskazują, że cystyna i hydroksyprolina pojawia się dopiero w hydrolizatach, natomiast β -alanina i dwie nie określone ninhydrynopoztywne substancje występują zarówno przed, jak i po hydrolizie omawianych przesączy.

Z przeprowadzonych badań wynika, że temperatura 120°C i czas hydrolizy w granicach do 36 godzin nie wpływają destruktywnie na β -alaninę i dwa nie zidentyfikowane ninhydrynopozytywne związki. W oparciu o to i o poprzednio opisane zestawienia przypuszcza się, że substraty te nie powstają na drodze proteolitycznego rozkładu peptydów pożywki, lecz na drodze złożonych przemian biochemicznych, towarzyszących procesom życiowym laseczki tężca. Wykrycie cystyny i hydroksyproliny jedynie w hydrolizatach, zarówno w przypadkach podłoży, jak i przesączy, wskazuje na to, że te aminokwasy występują w białkach podłoża Legroux-Ramon, ale nie są wydzielane z niego przez enzymy proteolityczne (Świtalska, 7) wytwarzane przez komórki laseczki tężca.

Tab. 1. Skład jakościowy związanych aminokwasów w różnych seriach podłoży
A qualitative composition of bound amino acids in different media

Lp.	Nazwa aminokwasu	Seria												
		93	94	100	101	102	104	105	108	109	110	112	I	II
1	Cystyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Lizyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Histydyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Asparagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Glicyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Seryna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Hydroksyprolina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	α -alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	β -alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Tyrozyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Tryptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Fenylalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Izoleucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	X ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	X ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Obecny aminokwas, — Nieobecny aminokwas

Opisane wyniki doświadczeń oraz dokonane spostrzeżenia w zestawieniu z badaniami przeprowadzonymi przez Malgrasa i wsp. (5), Surjan (6) i Vinet i wsp. (8) nad składem aminokwasowym róż-

Tab. 2. Skład jakościowy związanych aminokwasów w różnych seriach przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*

A qualitative composition of bound amino acids in different filtrates of the 10-day-old culture of *Clostridium tetani*

Lp.	Nazwa aminokwasu	Seria													
		93	94	100	101	102	104	105	108	109	110	112	I	II	III
1	Cystyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Lizyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Histydyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Asparagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Glicyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Seryna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Hydroksypolina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	α -alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Prolina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	β -alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Tyrozyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Tryptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	Walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Fenylalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Izoleucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	X ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	X ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Obecny aminokwas, — Nieobecny aminokwas

nych pożywek używanych do hodowli laseczki tężca oraz nad otrzymanymi z nich przesączami, dowodzą, że β -alanina i dwa nie zidentyfikowane ninhydrynopoztywne związki nie były dotychczas wykrywane przy tego rodzaju badaniach. Stwierdzenie, że cystyna i hydroksypolina nie odgrywają żadnej roli w procesach życiowych i toksynotwórczych laseczki tężca, jest w zasadzie zgodne z obecnie przyjętym poglądem Feeney i wsp. (1 i 2).

PIŚMIENNICTWO

1. Feeney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. 46, 363—571, 1943.
2. Feeney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. 46, 599—562 1943.
3. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, 20, 35—42, 1965.
4. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, 20, 75—82, 1965.

5. Malgras J., Mayer J., Sartory R., Veschambre R.: Ann. Inst. Pasteur (Paris). **84**, 635—640, 1953.
6. Surjan M.: Z. Allgem. Pathol. und Bacteriol. **19**, 455—460, 1960.
7. Świtalska A.: Med. Dośw. i Mikrobiol. **14**, 35—50, 1962.
8. Vinet G., Fredette V.: Ann. Inst. Pasteur (Paris), **94**, 530—533, 1958.

Pracę otrzymano 10 III 1965.

РЕЗЮМЕ

Установлено, что протеолитические энзимы, образованные палочкой столбняка, не выделяют цистина и гидроксипролина из белка субстрата Legroux-Ramon. Сверх того установлено, что β -аланин, а также два неидентифицированные соединения не происходят из протеолитического распада пептидов, имеющих в питательной среде. Предполагается, что они синтезированы своеобразными синтетазами уже на второй день выращивания.

Табл. 1. Качественный состав фиксированных аминокислот в разных сериях субстрата.

Табл. 2. Качественный состав фиксированных аминокислот в разных сериях десятидневных фильтратов культуры столбняка (*Cl. tetani*).

SUMMARY

It was found that proteolytic enzymes produced by *Clostridium tetani* did not secrete cystine and hydroxyproline from the proteins of the Legroux-Ramon media. It was also found that β -alanine and two unidentified compounds did not come from the proteolytic decomposition of the peptides which existed in the media. It is supposed that they are synthesized by specific synthetases as early as on the second day of growing.

