

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*). VI. Porównawcze ilościowe oznaczenia wolnych aminokwasów podłoż i przesączy dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca**

**Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*). VI. Сравнительные количественные обозначения несвязанных аминокислот субстратов и фильтратов десятидневной культуры палочки столбняка**

**A Study on the Amino Acid Transformation of the Liquid Ten-Day Culture of *Clostridium tetani*. VI. Comparative Quantitative Determinations of the Free Amino Acid Media and Filtrates of the Ten-Day Culture of *Clostridium tetani*.**

Badaniem wpływu występujących w pożywkach aminokwasów na wzrost bakterii i toksyczność toksyny tężcowej zajmowali się: Fene y i wsp. (3 i 4), Klimek (9, 10), Malgras i wsp. (12), Mueller i wsp. (14, 15), Picket (17), Surjan (18), Vinet i wsp. (19) i inni. Niestety dotychczasowe wyniki nie pozwalają na wyciąganie wniosków co do roli poszczególnych aminokwasów w procesie wzrostu laseczki i udziału tych związków w syntezie toksyny tężcowej. Przyczynia się do tego niecałkowita zgodność wyników w dotychczas przeprowadzonych badaniach i brak oznaczeń składu aminokwasowego przesączy z okresu trwania hodowli. Nie przeprowadzono także ilościowej oceny zachodzących zmian.

W świetle tych faktów uzasadnione stało się podjęcie niniejszej pracy, w której wykonano porównawcze oznaczenia ilościowe wolnych aminokwasów w pożywkach i przesączach z różnych okresów hodowli *Cl. tetani*.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto pożywek Legroux-Ramon, otrzymanych z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek oraz przesączy pobieranych co 48 godzin z dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*, prowadzonych przez autora na skalę laboratoryjną w Ka-

tedrze Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie. Każdą pobraną próbkę po wytrąceniu białka alkoholem etylowym i oddzieleniu wolnych aminokwasów chromatografowano techniką wstępującą wg Williamsa i Kirby (20). Oznaczenia ilościowe wolnych aminokwasów podłoż i przesączy przeprowadzano aparatem własnego pomysłu i konstrukcji (Klimek, 11).

#### BADANIA WŁASNE

##### A. Hodowla laseczki tęcza oraz chromatograficzny rozdział i identyfikacja wolnych aminokwasów podłoż i przesączy.

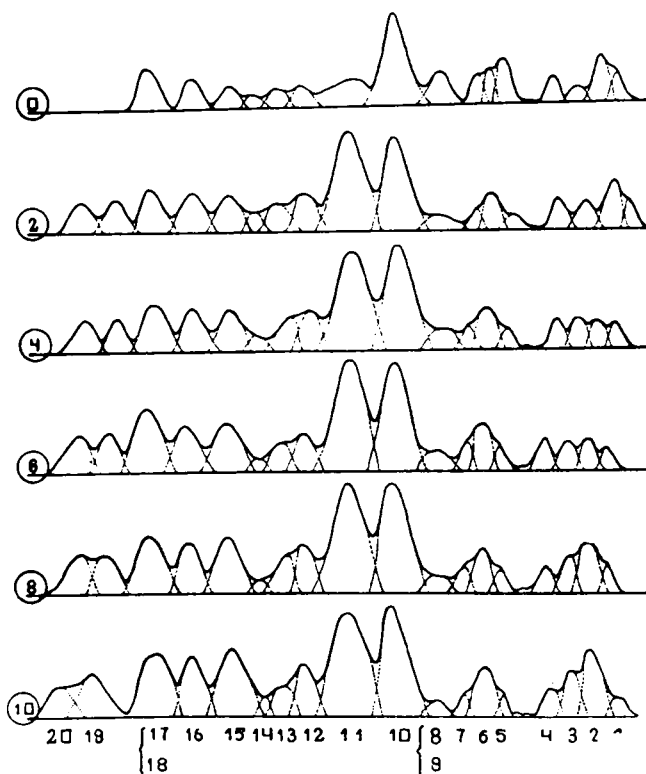
Do badań użyto podłoż Legroux-Ramon, na których w beztlenowych warunkach przy temperaturze 37°C hodowano laseczki tęcza. Stąd pobierano co dwa dni próbki, które po oddzieleniu masy bakteryjnej i usunięciu balastowego białka, nakraplano na bibułę (Klimek, 7). Wolne aminokwasy rozdzielano techniką chromatograficzną wg Williamsa i Kirby (20), używając układu rozpuszczalnika: n-butanol-kwas octowy (lodowaty) — woda w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1 oraz bibuły Whatman nr 3.

Tab. 1. Zawartość wolnych aminokwasów podłoża Legroux-Ramon oraz zmian zachodzących w przesączach pobieranych co dwa dni z hodowli laseczki tęcza  
The contents of the free amino acids of Legroux-Ramon media and the changes occurring in the filtrates taken every second day from the growing of *Clostridium tetani*

Lp.	Nazwa aminokwasu	Podłoże	Przesącz (dzień hodowli)				
			2	4	6	8	10
1	Lizyna	40	40	35	30	45	40
2	Histydyna	70	80	50	55	125	140
3	Asparagina	30	50	50	55	70	90
4	Arginina	40	50	50	50	45	40
5	Kwas asparaginowy	80	40	40	40	35	20
6	Seryna	40	70	110	110	120	140
7	Glicyna	40	35	35	40	40	30
8	Kwas glutaminowy	70	60	65	60	50	30
9	Treonina	70	60	65	60	50	30
10	$\alpha$ -Alanina	300	310	350	350	390	390
11	$\beta$ -Alanina	—	390	440	460	490	500
12	Tyrozyna	40	100	100	100	120	140
13	Tryptofan	50	90	90	80	90	80
14	Metionina	30	30	25	25	25	25
15	Walina	50	120	130	170	180	240
16	Fenylalanina	80	120	130	150	145	165
17	Izoleucyna	120	120	150	220	220	250
18	Leucyna	120	120	150	220	220	250
19	X <sub>1</sub>	—	70	100	100	110	140
20	X <sub>2</sub>	—	90	100	110	120	120

**B. Wykorzystanie aparatu własnej konstrukcji do określania względnych zmian w stężeniach wolnych aminokwasów, podłoż i przesączy płynnej hodowli *Cl. tetani*.**

Otrzymane chromatogramy po wywołaniu ninhydriną i utrwaleniu chlorkiem miedziowym krajano na paski o wymiarach:  $5,2 \times 46$  cm. Przy pomocy aparatu własnej konstrukcji (Klimek, 11), wyznaczano zmiany natężenia światła przechodzącego przez paski bibuły z kompleksami Cu + DYDA. Na ryc. 1 przedstawiono jeden z typowych przykładów oznaczeń. Cyfry w kółkach odnoszą się do krzywych otrzymanych z prześwietlenia bibułowych chromatogramów z rozdzielonymi wolnymi aminokwasami: 0 — podłoża Legroux-Ramon; 2, 4, 6, 8 i 10, — dwu-, cztero-, sześć-, ośmio i dziesięciodniowe przesącza płynnej hodowli laseczki tężca. Cyfry bez kótek odpowiadają badanym aminokwasom:



Ryc. 1. Krzywe zmian natężenia światła przechodzącego przez paski bibuły z barwnymi plamami Cu + DYDA, odpowiadające wolnym aminokwasom podłoż Legroux-Ramon oraz przesączom z różnych okresów hodowli laseczki tężca  
 The changes of curves of the light tension penetrating the paper stripes with dyed spots Cu + DYDA, corresponding to free amino acids of Legroux-Ramon media and filtrates from various periods of the growth of *Clostridium tetani*

1 — lizyna, 2 — histydyna, 3 — asparagina, 4 — arginina, 5 — kwas asparaginowy, 6 — seryna, 7 — glicyna, 8 — kwas glutaminowy, 9 — treonina, 10 —  $\alpha$ -alanina, 11 —  $\beta$ -alanina, 12 — tyrozyna, 13 — tryptofan, 14 — metionina, 15 — walina, 16 — fenyloalanina, 17 — izoleucyna, 18 — leucyna, 19 —  $X_1$ , 20 —  $X_2$  ( $X_1$  i  $X_2$  — nie zidentyfikowane ninhydrynopoztywne plamy). Liczby wypisane jedna pod drugą i objęte nawiasem figurowym odnoszą się do aminokwasów, którym na wykresie odpowiada wspólny „pik”. Linie podstawy (kreska ciągła) oraz rekonstrukcje krzywych (kreska przerywana) wyznaczono sposobem: G ó r s k i i wsp. (6) i O s t r o w s k i i wsp. (16). Otrzymane krzywe po dokonaniu poprawek i wykreśleniu linii podstaw planimetrowano. Wyniki zestawiono w tabeli 1. W trzeciej kolumnie podano powierzchnie pól odpowiadające wolnym aminokwasom podłoża Legroux-Ramon. W następnych kolumnach od 4 do 8 przedstawiono powierzchnie pól odpowiadające wolnym aminokwasom przesączy: dwu-, cztero-, sześć-, ośmio- i dziesięciodniowych hodowli laseczki tężca. W drugiej kolumnie podano nazwy aminokwasów, przez  $X_1$  i  $X_2$  określono nie zidentyfikowane ninhydrynopoztywne plamy. Kwas glutaminowy i treoninę oraz leucynę i izoleucynę objęto w nawias figurowy, zaznaczając w ten sposób, że dla tych aminokwasów podano wspólne powierzchnie w  $\text{mm}^2$ .

Opierając się na danych zawartych w tab. 1 przedstawiono graficznie zmiany, zawartości wolnych aminokwasów w podłożu Legroux-Ramon podczas hodowli laseczki tężca (ryc. 2, 3, 4 i 5). Na osi odciętych odkładano dzień hodowli, na osi rzędnych powierzchnie krzywych, zakładając że zmierzone pola są proporcjonalne do ilości aminokwasów.

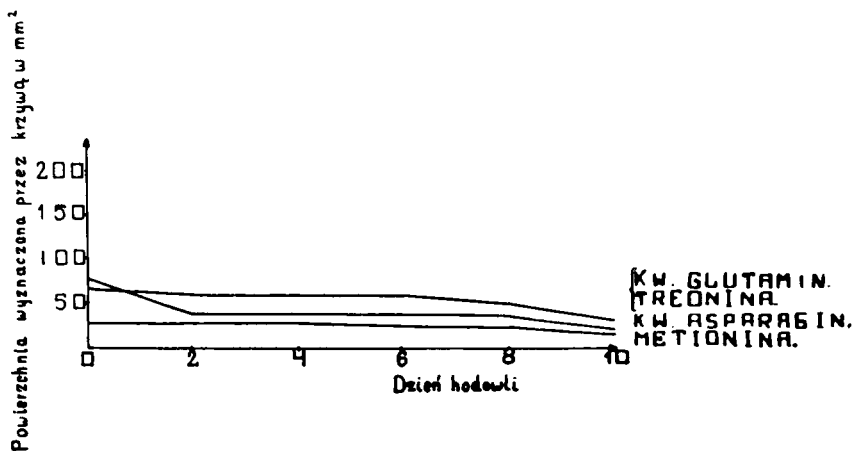
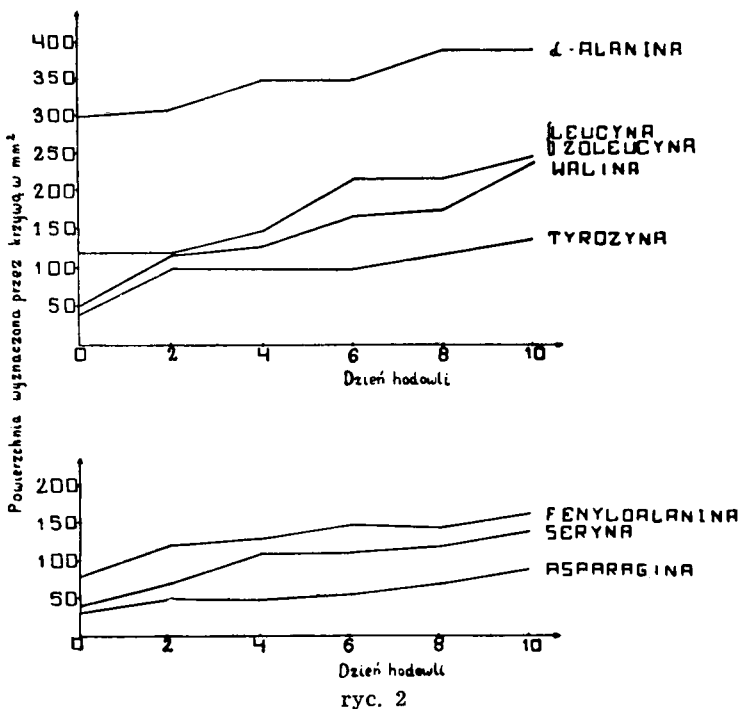
#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Względne zmiany poziomu wolnych aminokwasów zachodzące podczas hodowli laseczki tężca wyrażano w  $\text{mm}^2$  przy pomocy powierzchni zawartej pomiędzy krzywą, a linią podstawy (ryc. 1). Podanie wyników w jednostkach bezwzględnych uznano za zbędne, ponieważ stosowany sposób najzupełniej wystarczał do zobrazowania zachodzących zmian w stężeniach wolnych aminokwasów. Oprócz tego odpadała kłopotliwa, wobec małych wymiarów bibuły ( $37 \times 46$  cm), konieczność umieszczania na jednym arkuszu bibuły: wzorców (cztery nakroplenia), obok materiału badanego (sześć nakropień): (B l o c k, 1), (C r a m e r, 2), (F l a w i n i i wsp., 5).

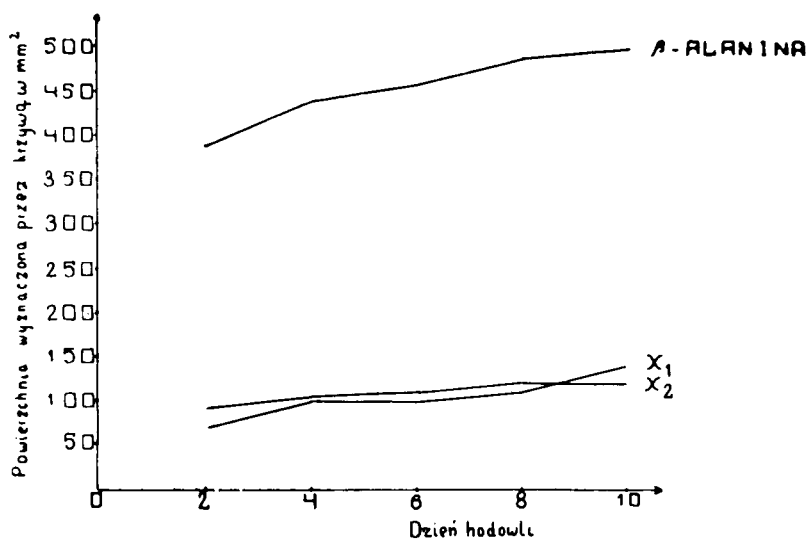
W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono, poza analizą jakościową, żadnych wzmianek na temat prac prowadzonych nad zmianami ilościowymi stężeń wolnych aminokwasów w podłożach i przesącach dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca. Porównanie wyników zebranych

w tab. 1 pozwala dostrzec, że zmiany, jakim ulegają wolne aminokwasy podczas hodowli laseczki tężca, odbywają się w różny sposób. Zgodnie z tym podzielono aminokwasy na cztery grupy:

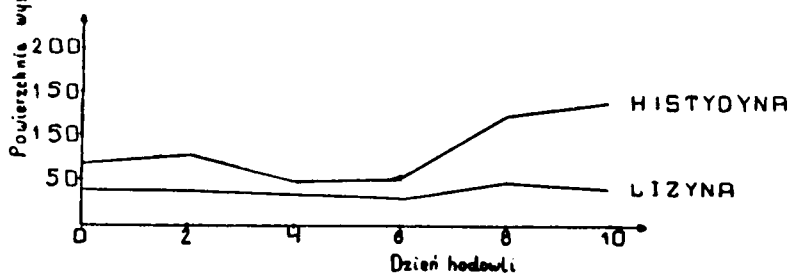
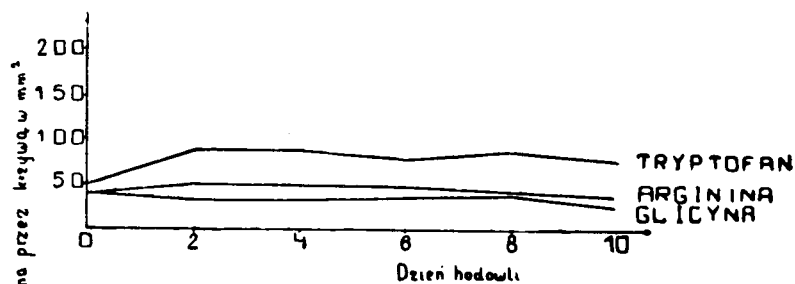
a) Aminokwasy, których stężenie rośnie przez cały czas trwania hodowli laseczki tężca: 1 — asparagina, 2 — seryna, 3 —  $\alpha$ -alanina,



ryc. 3



ryc. 4



ryc. 5

Ryc. 2—5. Wykresy zmian poziomu wolnych aminokwasów podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy z różnych okresów hodowli laseczki tężca  
 Diagrams of the level changes of the free amino acids of Legroux-Ramon media and filtrates from various periods of growing *Clostridium tetani*

4 — tyrozyna, 5 — walina, 6 — fenyloalanina, 7 — izoleucyna i leucyna (ryc. 2).

b) Aminokwasy, których stężenie zmniejsza się przez cały czas trwania hodowli laseczki tężca: 1 — kwas asparaginowy, 2 — kwas glutaminowy i treonina oraz 3 — metionina (ryc. 3).

c) Aminokwasy, które nie zostały wykryte w podłożach ani w stanie wolnym, ani w związanym (ryc. 4). Występowanie ich stwierdzono jedynie we wszystkich badanych przesączach: 1 —  $\beta$ -alanina, 2 —  $X_1$  oraz 2 —  $X_2$  ( $X_1$  i  $X_2$  — nie zidentyfikowane ninhydrynopozytywne plamy).

d) Aminokwasy, których stężenia zmieniają się w sposób nieregularny: 1 — lizyna, 2 — histydyna, 3 — arginina, 4 — glicyna oraz 5 — tryptofan (ryc. 5).

Zaznaczyć należy, że zaliczanie do wymienionych grup: kwasu glutaminowego i treoniny oraz izoleucyny i leucyny pociąga za sobą pewne ryzyko, ponieważ wymienione aminokwasy oznaczano łącznie. Najmniejsze stężenie histydyny w przesączu występuje między 4 a 6 dniem hodowli (ryc. 5). Może to świadczyć, że w tym czasie jest największe zapotrzebowanie na ten aminokwas. Spostrzeżenie to potwierdza wyniki prac: Millera i wsp. (13), oraz Picketa (17), w których podano, że histydyna jest niezbędna do tworzenia toksyny tężcowej której maksymalna ilość tworzy się między 4 a 8 dniem hodowli (Mueller i wsp., 15), (Surjan, 18) oraz (Vinet i wsp., 19). Można przypuszczać że zmniejszenie się ilości histydyny jest związane z powstaniem toksyny tężcowej. Nie jest wykluczone, że przebieg zmian stężenia histydyny będzie mógł być wykorzystany do badania kinetyki tworzenia toksyny tężcowej. Zagadnienie to postanowiono przebadać w następnych pracach.

Zestawiając wyniki przedstawione na ryc. 3 z wynikami oznaczeń pH podłoży i przesączy (Klimek, 8), można dojść do uzupełniających się wzajemnie wniosków, że stosunkowo duży wzrost pH w drugim dniu hodowli częściowo może się łączyć ze znaczniejszym niż w następnych dniach ubytkiem kwasu asparaginowego i glutaminowego.

Z ryc. 2 i 3 wynika, że stężenie kwasu asparaginowego ulega zmniejszeniu, a asparaginy — zwiększeniu. Fakty te nasuwają myśl o przechodzeniu kwasu asparaginowego w asparaginę w reakcji enzymatycznej z amoniakiem, którego obecność w przesączach została stwierdzona (Klimek, 8).

Podczas hodowli laseczki tężca rośnie ilość azotu  $\alpha$ -aminowego (Klimek, 8), co zostało potwierdzone tym, iż w ogólnym bilansie ilość aminokwasów, dla których notuje się wzrost stężenia (ryc. 2 i 4), znacznie

przewyższa ilość tych aminokwasów, dla których widoczne jest obniżenie stężenia (ryc. 3).

Z obserwacji ryc. 4 można wyciągnąć wniosek, że laseczki tęcza wydzielają enzymy pozwalające endogennie syntetyzować  $\beta$ -alaninę. Ciągły wzrost tego aminokwasu dowodzi, że jest on wytwarzany przez cały dziesięciodniowy okres hodowli laseczki tęcza.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Block R. J.: Anal. Chem. **22**, 1327—1332, 1958.
2. Cramer F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie. Wienheim 1954, 74—76.
3. Feney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: Bact. **46**, 559—562, 1943.
4. Feney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: Bact. **46**, 563—571, 1943.
5. Flavin M., Slaughter C.: J. Biol. Chem. **235**, 1112—1118, 1960.
6. Górski L., Wójcik K.: Chemia anal. **3**, 137—146 1958.
7. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 29—34, 1965.
8. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 35—42, 1965.
9. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 75—82, 1965.
10. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 153—158, 1965.
11. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **20**, 209—220, 1965.
12. Malgras J., Mayer J., Sartory R., Veschambre R.: Ann. Inst. Pasteur (Paris), **84**, 635—640 1953.
13. Miller P. A., Gray C. T., Eaton M. D.: J. Bact. **79**, 95—102, 1960.
14. Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. **67**, 271—277, 1954.
15. Mueller J. H., Miller P. A.: J. Biol. Chem. **223**, 185—194, 1956.
16. Ostrowski W., Mikucki A.: Acta Physiol. Pol. **3**, 277—297 1952.
17. Picket M. J.: Biol. Chem. **151**, 203—209, 1943.
18. Surjan M.: Z. allgem. Pathol. und Bacteriol. **19**, 455—460, 1956.
19. Vinet G., Fredette V.: Ann. Inst. Pasteur (Paris), **94**, 530—533, 1958.
20. Williams R. J., Kirby H.: Science **107**, 481—483, 1948.

Pracę otrzymano 10 IV 1965.

---

#### РЕЗЮМЕ

Исследовано относительные количественные изменения несвязанных аминокислот в субстратах Legroux-Ramon, а также в фильтрах, получаемых каждые 48 часов в течение десятидневной культивации палочки столбняка (*Cl. tetani*).

Выделено четыре группы аминокислот: а) аминокислоты, концентрация которых возрастает в течение всего периода выращивания, б) аминокислоты, концентрация которых уменьшается во время выращивания палочки столбняка, в) аминокислоты, которые были синтезированы палочкой столбняка и г) аминокислоты, концентрация которых нерегулярно изменялась.



Замечена самая малая концентрация гистидина между четвертым и шестым днями выращивания, т.е. в период, в котором, по мнению некоторых авторов, возникает самое большое количество токсина. Предполагается, что замеченная корреляция между возникаемым токсином столбняка и уменьшением гистидина может быть в будущем использована для освещения вопроса кинетики синтеза этого антигена.

Рис. 1. Кривые изменений силы света, проходящего через пояски фильтровальной бумаги с цветными пятнами  $Cu + DYDA$  соответствующими несвязанным аминокислотам субстратов Legroux-Ramon, а также фильтратам с разных периодов выращивания палочек столбняка.

Рис. 2. Графики изменений уровня несвязанных аминокислот субстратов Legroux-Ramon, а также фильтратов с разных периодов выращивания палочек столбняка.

Рис. 3. Графики изменений уровня несвязанных аминокислот субстратов Legroux-Ramon, а также фильтратов с разных периодов выращивания палочек столбняка.

Рис. 4. Графики изменений уровня несвязанных аминокислот субстратов Legroux-Ramon, а также фильтратов с разных периодов выращивания палочек столбняка.

Рис. 5. Графики изменений уровня несвязанных аминокислот субстратов Legroux-Ramon, а также фильтратов с разных периодов выращивания палочек столбняка.

Табл. 1. Содержимость несвязанных аминокислот субстрата Legroux-Ramon, а также изменений в фильтратах получаемых каждые два дня из культуры палочки столбняка.

---

## S U M M A R Y

Relative changes of free amino acids in Legroux-Ramon media and of filtrates taken every 48 hours during ten days of growing of *Clostridium tetani* were examined.

Four groups of amino acids were distinguished: a) amino acids whose concentration increases during the whole period of the growth, b) amino acids whose concentration decreases during the whole period of the growth of *Clostridium tetani*, c) amino acids which were synthesized by *Clostridium tetani*, and d) amino acids whose concentration was changing irregularly.

The least concentration of histidine was observed between the fourth and the sixth day of the growth, i. e., during the period in which, according to some authors, the greatest amount of toxin is produced. The correlation observed between the forming of tetanus toxin and the decrease of histidine may be used in the future for the study of the kinetics of the synthesis of this antigen.

---

Papier druk. sat. III kl. 80 g.  
Annales UMCS Lublin 1965  
300 + 50 egz. L-3

Format 70 × 100  
LZGraf. im. PKWN, Lublin, Unicka 4  
Manuskrypt otrzymano 17.II.66

Druku str. 9  
Zam. 699. 17.II.66  
Data ukończenia 29.X.66

---