

---

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*). III Rozdział chromatograficzny i identyfikacja wolnych aminokwasów podłoży i przesączy laseczki tężca**

**Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*).**

**III. Хроматографический раздел и идентификация несвязанных аминокислот субстратов и фильтратов палочки столбняка**

**Investigation of the Amino Acid Transformation of the Liquid 10-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*. III. Partition Chromatography and Estimation of Free Amino Acid Media and of the Filtrates of *Clostridium tetani***

Wykazano, że w czasie trwania hodowli *Cl. tetani* na pożywkach Legroux-Ramon zwiększa się ilość wolnych grup aminowych, związana prawdopodobnie z proteolitycznym rozkładem peptydów podłoża na wolne aminokwasy (6). W związku z tym wyłoniła się konieczność potwierdzenia tej hipotezy poprzez stwierdzenie, czy rzeczywiście ze zwiększonym poziomem azotu alfa-aminowego idą w parze zmiany w składzie wolnych aminokwasów podłoży względem przesączy.

**MATERIAŁY I METODY**

Wolne aminokwasy podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy laseczki tężca (Klimek) (5) wykrywano przy pomocy bibułowej chromatografii wstępującej wg Williamsa i Kirby (15). Oprócz tego wykorzystano do identyfikacji technikę spływową (12), krążkową (7) oraz rechromatografię (1) w różnych układach rozpuszczalników.

Położenie plam aminokwasowych na chromatogramach ustalono testem ninhydrowym (3), izatynowym (10), pięciocyanoaminożelazianowym (8) oraz fluorescencyjnym (2, 4, 11) używając lampy HPW „Philips”. Wszystkie wzorce aminokwasowe oraz odczynniki stosowane w pracy pochodziły z Hurtowni Chemicznej w Gliwicach.

## BADANIA WŁASNE

Do rozdziału chromatograficznego używano bibuły Whatman nr 1 i Whatman nr 3. W przypadku techniki wstępującej wg Williamsa i Kirby (15) badane próbki nanoszono w formie pasemek o szerokości 3—4 mm. Przy metodzie krążkowej oraz dwukierunkowej nakraplano materiał tak, aby średnica plamy wynosiła nie więcej jak 4—5 mm. Za każdym razem, bezpośrednio po wprowadzeniu materiału na bibułę miejsce nakroplenia osuszano strumieniem gorącego powietrza (foen).

Identyfikację wolnych aminokwasów podłoży i przesączy hodowli laseczki tężca przeprowadzono w dwu etapach. W pierwszym określano położenie poszczególnych plam aminokwasowych w badanym materiale przy pomocy wzorcowej mieszaniny na chromatogramach bibułowych przy użyciu techniki wstępującej wg Williamsa i wsp. (15) oraz testem ninhydrynowym. W wyniku wielokrotnie powtarzanych obserwacji aminokwasy występujące na chromatogramach podzielono na trzy grupy: a) tworzące pojedyncze plamy: asparagina, cystyna, arginina, hydroksypolina,  $\alpha$ -alanina, prolina,  $\beta$ -alanina, tyrozyna, tryptofan, metionina, walina, fenyloalanina,  $X_1$  i  $X_2$ , b) tworzące pojedyncze plamy, ale rozdzielające się gorzej od grupy wymienionej poprzednio: lizyna, histydyna, kwas asparaginowy, seryna, glicyna, c) tworzące wspólne plamy: kwas glutaminowy i treonina oraz izoleucyna i leucyna.

W drugim etapie, opierając się o poprzednio otrzymane wyniki, przeprowadzono właściwą identyfikację poszczególnych aminokwasów stosując: 1) różne testy (ninhydrynowy — „zimny” i „gorący”, izatynowy, pięciocyanoaminożelazianowy oraz fluorescencyjny), 2) technikę dodanego wzorca, 3) chromatografię jednokierunkową wstępującą i spływową, 4) chromatografię krążkową i 5) rechromatografię.

## Aminokwasy grupy a

Wszystkie aminokwasy grupy a wykrywano metodą dodanego wzorca. W tym celu na arkusz bibuły nakraplano dwie jednakowe próbki badanego materiału. Do jednej z nich wprowadzano dwa lub trzy wzorce, wyraźnie oddzielające się na chromatogramach, rozwijane techniką jednokierunkową w układzie: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1 oraz obserwowano położenie plam, w których, obok aminokwasu występującego w próbie badanej, znajdował się aminokwas z wzorca. Tym sposobem określano jakościowo wszystkie aminokwasy tej grupy z wyjątkiem dwu nie zidentyfikowanych plam nazwanych  $X_1$  i  $X_2$ . Ponadto niektóre aminokwasy były jeszcze identyfikowane przy pomocy specyficznych reakcji. Obecność asparaginy, hydroksyproliny i proliny ustalono na zasadzie swoistych odcieni, które daje

ninhydryna w temperaturze pokojowej z następującymi aminokwasami: asparaginą — brązowopomarańczowy, argininą — fioletowy, hydroksyproliną i proliną — żółty, a po ogrzaniu bibuły przez dwie minuty w temperaturze 100°C z  $\beta$ -alaniną — fioletowy. Występowanie hydroksyproliny i proliny sprawdzono dodatkowo izatyną, przy czym w pierwszym przypadku otrzymano plamy szarofiołkowe, w drugim granatowe.

Stosując pięciocyanoaminożelazian sodu wg Krzeczowskię i wsp. (8), wykrywano argininę dającą plamę różową, przechodzącą po 24 godzinach w lilaróż oraz tryptofan o plamie ciemnozielonej. Przy pomocy lampy HPW z filtrem Wooda obserwowano silną fluorescencję plamy na chromatogramie, odpowiadającej położeniu tryptofanu (Opieńska-Blauth i wsp.) (11) i inni.

### Aminokwasy grupy b

Na chromatogramach jednokierunkowych, rozwijanych techniką wstępującą w układzie: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda w stosunku 4:1:1, plama lizyny znajdowała się tuż pod plamą histydyny. Przy pomocy „zimnego” ninhydrynowego testu rozróżnianie tych plam opierało się na charakterystyce odcieni barw: lizyna — szarofioletowe, histydyna — fioletowe; ponadto używano do wykrywania histydyny pięciocyanoaminożelazianu sodu, który z tym aminokwasem tworzył charakterystyczną buraczkowobrunatną plamę.

Udogodnieniem przy wykrywaniu lizyny i histydyny była również technika krążkowa oraz spływowa, dające dobry rozdział tych aminokwasów w wymienionym wyżej, butanolowym układzie. Zespół: kwas asparaginowy, seryna i glicyna identyfikowano na zasadzie różnic zabarwienia, jakie dają te aminokwasy z ninhydriną oraz rechromatograficznie. W pierwszym wypadku bez trudu określano kwas asparaginowy, który na chromatogramie jednokierunkowym w układzie: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda w stosunku objętościowym 4:1:1 tworzył fioletowe plamy, wyraźnie oddzielone od seryny i glicyny. Rozdział glicyny i seryny na jednokierunkowych chromatogramach, w opisanych wyżej warunkach był często niezupełny, co w znacznym stopniu utrudniało identyfikację, dlatego aminokwasy te rozdzielano ponownie w innym, korzystniejszym dla nich układzie — techniką rechromatograficzną wg Borkowskiego (1). W związku z tym nanoszono na jeden arkusz bibuły dwie identyczne próbki badanego materiału, które rozwijano techniką jednokierunkową w układzie butanolowym. Otrzymany chromatogram dzielono na dwa paski. Przy pomocy jednego z nich, po wywołaniu go ninhydriną, ustalono na drugim położenie kwasu asparaginowego, seryny i glicyny, następnie wycinano to miejsce z tego paska

i używano jako „knota” w chromatografii krążkowej. Rozpuszczalnik: pirydyna, woda w stosunku 65 : 35, przepuszczano dwukrotnie, każdorazowo 11 godzin, otrzymując trzy dobrze rozdzielone pasma o wartościach  $R_f$ : 0,82, 0,62 i 0,47. W celach kontrolnych przeprowadzono badania na mieszaninie standardowej, która w pierwszym etapie była rozwijana techniką wstępującą, a następnie rechromatografowana techniką krążkową. Otrzymanie trzech plam o tych samych wartościach  $R_f$ , co w materiale badanym, było podstawą identyfikacji tych aminokwasów.

### Aminokwasy grupy c

Kwas glutaminowy i treonina w technice wstępującej nie dawały rozdzielonych plam przy stosowanym układzie nawet wtedy, gdy używano mieszaniny standardowej. Wykrywanie tych aminokwasów przeprowadzono przy pomocy opisanej wyżej rechromatografii, używając do wstęp-

Tab. 1. Skład jakościowy wolnych aminokwasów w różnych seriach podłoży  
A qualitative composition of free amino acids in various media

| L.<br>p. | 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        | Hydroksyprolina   | —     | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | — | —  | —   |
| 10       | Kwas glutaminowy  | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 11       | Treonina          | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 12       | $\alpha$ -alanina | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 13       | Prolina           | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 14       | $\beta$ -alanina  | —     | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | — | —  | —   |
| 15       | Tyrozyna          | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 16       | Tryptofan         | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 17       | Metionina         | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 18       | Walina            | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 19       | Fenylalanina      | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 20       | Izoleucyna        | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 21       | Leucyna           | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 22       | X <sub>1</sub>    | —     | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | — | —  | —   |
| 23       | X <sub>2</sub>    | —     | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | — | —  | —   |

+ Obecny aminokwas, — Nieobecny aminokwas

nego rozdziału układ: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda w stosunku objętościowym 4:1:1, a następnie układu: pirydyna, woda w stosunku objętościowym 65:35. Tym sposobem zawsze otrzymywano dwie plamy o Rf: 0,57 i 0,44, odpowiadające kwasowi glutaminowemu i treoninie zarówno w materiale badanym, jak i kontrolnej, wzorcowej mieszaninie. Izoleucyna i leucyna na niektórych chromatogramach dawała plamę, której kształt pozwalał przypuszczać, że reprezentuje ona obydwie aminokwasy, na niektórych jednak plamy były zwarte i nie pozwalały na wyciąganie jakichkolwiek wniosków. W związku z tym, w celu otrzymania obiektywnej oceny, w każdym wypadku izoleucyna i leucyna były rechromatografowane sposobem wyżej opisanym. Do wstępnego rozdziału używano jak zwykle: n-butanol, kwas octowy (lod.), woda w stosunku objętościowym 4:1:1, do ostatecznego układ: pirydyna, kwas octowy

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

A qualitative composition of free amino acids in various filtrates of 10-day-old culture of *Clostridium tetani*

| L. p. | 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     | 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 <sub>1</sub>    | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |
| 23    | X <sub>2</sub>    | +     | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | + | +  | +   |

+ Obecny aminokwas, — Nieobecny aminokwas

Tab. 3. Skład jakościowy wolnych aminokwasów trzech serii podłoż Legroux-Ramon oraz przesączy hodowli laseczki tężca (przesącze pobierano w odstępach dwudniowych)

A qualitative composition of free amino acids of three Legroux-Ramon media and filtrates of the culture of *Clostridium tetani*

| L. p. | Nazwa aminokwasu  | Podłoże |        | Przesącz (dzień hodowli) |        |   |        |   |        |    |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|-------------------|---------|--------|--------------------------|--------|---|--------|---|--------|----|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|       |                   | seria   |        | 4                        |        | 6 |        | 8 |        | 10 |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|       |                   | I       | II III | I                        | II III | I | II III | I | II III | I  | II III |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 1     | Cystyna           | -       | -      | -                        | -      | - | -      | - | -      | -  | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 2     | Lizyna            | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3     | Histydyna         | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 4     | Asparagina        | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 5     | Arginina          | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 6     | Kwas asparaginowy | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 7     | Seryna            | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 8     | Glicyna           | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 9     | Hydroksyprolina   | -       | -      | -                        | -      | - | -      | - | -      | -  | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 10    | Kwas glutaminowy  | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 11    | Treonina          | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 12    | $\alpha$ -alanina | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |
| 13    | Prolina           | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |   |
| 14    | $\beta$ -alanina  | -       | -      | -                        | -      | - | -      | - | -      | -  | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |
| 15    | Tyrozyna          | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |   |
| 16    | Tryptofan         | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |   |
| 17    | Metionina         | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |   |
| 18    | Walina            | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |   |
| 19    | Fenylalanina      | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 20    | Izoleucyna        | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 21    | Leucyna           | +       | +      | +                        | +      | + | +      | + | +      | +  | +      | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 22    | X <sub>1</sub>    | -       | -      | -                        | -      | - | -      | - | -      | -  | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| 23    | X <sub>2</sub>    | -       | -      | -                        | -      | - | -      | - | -      | -  | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+ Obecny aminokwas — Nieobecny aminokwas

(lod.), woda w stosunku 50 : 35 : 15. Otrzymanie dla badanego materiału i wzorców rozdzielonych w tych samych warunkach dwu wyraźnie odgraniczonych pasm o Rf: 0,90 i 0,86 było wystarczającym dowodem obecności leucyny i izoleucyny. Skład jakościowy wolnych aminokwasów w podłożach Legroux-Ramon oraz przesączach dziesięciodniowych hodowli laseczki tężca przedstawia tab. 1 i 2, przy czym w drugiej kolumnie tych tabel podano nazwy aminokwasów i przez  $X_1$  i  $X_2$  oznaczono dwie nie zidentyfikowane ninhydrynopozytywne plamy. W trzeciej kolumnie umieszczono numery serii (cyfry arabskie określają podłoża użyte do hodowli masowych, cyfry rzymskie — podłoża stosowane do posiewów kontrolnych w skali laboratoryjnej).

Tab. 3 przedstawia skład jakościowy wolnych aminokwasów podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy pobieranych co dwa dni z dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca. Wyniki zestawiono dla trzech serii. W drugiej kolumnie podano nazwę aminokwasów. Przez  $X_1$  i  $X_2$  oznaczono dwie nie zidentyfikowane ninhydrynopozytywne plamy. W trzeciej kolumnie umieszczono numery podłoży, zaznaczając obecność bądź nieobecność aminokwasu. Kolumny od czwartej do ósmej podają skład aminokwasowy przesączy od drugiego do dziesiątego dnia hodowli.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Z załączonych tabel (1, 2 i 3) wynika, że w podłożach znajduje się 18 aminokwasów. W przesączach, obok aminokwasów występujących w podłożach, stwierdzono trzy ninhydrynopozytywne plamy. Jedną powyżej proliny zidentyfikowano jako  $\beta$ -alaninę oraz dwie nie zidentyfikowane, występujące nad leucyną ( $X_1$  i  $X_2$ ). Porównawcza ocena wzrokowa chromatogramów pozwala dostrzec zmiany ilościowe w składzie aminokwasowym podłoży i przesączy. Wzrost stężenia zanotowano dla asparaginy, seryny,  $\alpha$ -alaniny, tyrozyny, waliny, fenolo-alaniny oraz zespołu leucyny, natomiast obniżenie — dla kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, treoniny i metioniny. Zaznaczyć należy, że w żadnym wypadku nie stwierdzono całkowitego znikania aminokwasów. Obserwacje te są odmienne od wyników Surjana (13) oraz Vinet (14), natomiast bardziej odpowiadają pogładowi Malgrasa i wsp. (9).

#### PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski T.: Acta Biochim. Pol. 3, 333—343, 1956.
2. Bursztejn E. A.: Biofizika, 6, 753—763, 1961.
3. Dent C. E.: Biochem. J., 43, 169—180, 1948.
4. Horst H., Tang H., Jurkovich V.: Anal. Chem., 31, 135—138, 1959.
5. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, 20, 29—34, 1965.
6. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, 20, 35—42, 1965.

7. Krishnamurthy K., Swaminthan M.: Anal. Chem. **27**, 1396—1399, 1955.
8. Krzeczowska I., Misiuna D.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **16**, 299—305, 1961.
9. Malgras J., Mayer J., Sartory R., Veschambre R.: Ann. Inst. Pasteur (Paris) **84**, 635—640, 1953.
10. Noworytko J., Sarnecka-Keller M.: Acta Biochim. Pol., **2**, 91—105, 1955.
11. Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Petrusiewicz M.: J. Chromatogr., **3**, 415—424, 1960.
12. Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M.: Chromatografia. PWN, Warszawa 1957, ss. 27—55, 331—449, 468—469.
13. Surjan M.: Z. Allgem. Pathol. und Bacteriol., **19**, 455—460, 1956.
14. Vinet G., Fredette V.: Ann. Inst. Pasteur. (Paris), **94**, 530—533, 1958.
15. Williams R. J., Kirby H.: Science **107**, 481—483, 1948.

Pracę otrzymano 3 III 1965.

### РЕЗЮМЕ

Методом хроматографического анализа при внедрении разных технических приемов, а также при помощи цветных тестов проведена полная качественная идентификация несвязанных аминокислот в субстратах Legroux-Ramon и фильтраатах из культур (*Cl. tetani*) столбняка.

Ни в одном случае не установлено в фильтраатах отсутствия одной из аминокислот, выступающих в субстратах. Замечено однако, что уже на второй день инкубации происходит синтез бета-аланина, а также двух неидентифицированных нингидриноположительных соединений, локализованных на хроматограммах выше лейцина.

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

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

Табл. 3. Качественный состав несвязанных аминокислот трех серий субстрата Legroux-Ramon, а также фильтратов культуры палочки столбняка.

### SUMMARY

A complete qualitative determination of amino acids in Legroux-Ramon media and of the filtrates of the *Clostridium tetani* culture was made by partition chromatography using different techniques and colour tests.

No amino acids found in the media were detected in the filtrates. However, as early as on the second day of incubation the synthesis of beta-alanine and that of the two unidentified ninhydrin positive compounds was found to occur on the chromatograms above leucine.