Rozkład sparteiny i lupininy przez drobnoustroje glebowe

Sparteina and lupinin decomposition by soil microorganisms

HANNA RYBICKA

WSTĘP

Alkaloidy łubinowe stanowią grupę związków, którym ostatnio poświęca się dużo uwagi. Badania doprowadziły do wykrycia wielu nowych alkaloidów (Boit 1961, Leonard 1960, Wiewiórowski i in. 1961, Wiewiórowski, Wolińska-Mocydlarz 1961), jak również do częściowego poznania dróg ich biosyntezy w roślinie. Szereg tych badań koncentruje się na przemianach w roślinach określonych alkaloidów oraz produktów ich rozpadu. Na ogół bada się przemiany alkaloidów pod wpływem enzymów wyizolowanych z roślin albo też *in vivo* po wprowadzeniu tych związków do roślin. W ostatnich latach w szeregu pracach nad przemianami alkaloidów posługiwano się też drobnoustrojami.

Celem niniejszej pracy było przebadanie ewentualnych przemian sparteiny i lupininy, głównych alkaloidów łubinu żółtego, pod wpływem drobnoustrojów glebowych.

METODYKA BADAŃ

Wyodrębnienie i charakterystyka bakterii zdolnych do rozkładania sparteiny i lupininy

Szczepy bakterii, które mogą rozkładać sparteinę względnie lupinę, wyodrębniono z gleby pobranej z pola obsianego łubinem żółtym i hodowano na pożywce wg Bassalika (Możejko-Toczko 1960). Jedynym źródłem węgla i azotu w tej pożywce był alkaloid*.

Po dwóch pasażach, gdy w pożywkach stwierdzono ubytki alkaloidu, izolowano czyste kultury bakterii i przeszczepiono je na skosy agarowe. Do badań wzrostu bakterii zastosowano szereg pożywek zazwyczaj stoso-

* Alkaloidy: 1-sparteina z żarnowca (produkcji Cefarm), 1-lupinina, wyizolowana przez autorkę z nasion łubinu żółtego gorzkiego, temp. topn. 69°C.

wanych w badaniach mikrobiologicznych. Badano także wpływ temperatury, pH i stężenia alkaloidu w pożywce na jego rozkład. W doświadczeniach bardziej szczegółowych stosowano pożywkę płynną i oznaczano ilościowo zawartość alkaloidu pozostałego w pożywce po inkubacji. Z każdej pożywki co 24 godz. pobierano próbki i наносzono na bibułę (Whatman nr 1). Stosowano układ rozwijający butanol : toluen : HCl : woda. Alkaloid i ewentualnie związek powstający przy jego rozkładzie eluowano i oznaczano jego ilość. W badaniach nad wpływem temperatury na rozkład sparteiny przez bakterie zastosowano pożywkę o pH 6,0, zawierającą 0,075% sparteiny; przy badaniu wpływu pH do pożywki wprowadzono analogiczną ilość alkaloidu; inkubowano w 27°C, tak samo jak i pożywkę o pH 6,0 przy badaniu wpływu stężenia sparteiny na jej rozkład.

W doświadczeniach nad wpływem temperatury na rozkład lupininy stosowana pożywka o pH 7,6 zawierała 0,1% lupininy; przy badaniu wpływu pH pożywka zawierała tę samą ilość alkaloidu; inkubowano ją w 27°C, tak samo jak i pożywkę o pH 7,6 przy badaniu wpływu stężenia lupininy na jej rozkład.

Oznaczenia ilości alkaloidów i produktów ich przemian przeprowadzono metodą Reifera i Niziołka (1957), (Birecka i in. 1959, Reifer i in. 1959). Przy obliczeniach ilości sparteiny i produktu jej przemiany stosowano współczynnik 0,13, a dla lupininy i produktu jej przemiany 0,16.

Wyodrębnianie z pożywki i oczyszczanie produktów przemian alkaloidów

Produkt przemiany sparteiny

Pożywkę ze sparteiną, po zaszczepieniu zawiesiną bakteryjną, inkubowano przez 40 godz. w 28°C, gdyż ta właśnie temperatura okazała się korzystniejsza dla nagromadzenia produktu *Sx*, po czym alkalizowano ją NaOH i ekstrahowano chloroformem. Chloroform po dodaniu 0,2n HCl oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a mieszaninę dwóch związków (obecność ich stwierdzono chromatograficznie), z których jeden okazał się w toku dalszych badań nie przerobioną sparteiną, a drugi nazwany *Sx* produktem jej przemiany, rozdzielano na kolumnie z celulozy (firmy Whatman) stosując jako układ rozwijający mieszaninę acetonu i 1n HCl.

Produkt przemiany lupininy

Pożywkę z lupiną inkubowano po zaszczepieniu przez 60 godz. w 28°C, gdyż ta właśnie temperatura okazała się korzystniejsza dla nagromadzenia produktu *Lx*. W wyciągu chloroformowym po inkubacji

stwierdzono obecność tylko jednego związku nazwanego *Lx*, powstałego przy rozkładzie lupininy, natomiast nie przerobionej lupininy nie stwierdzono już nawet śladów.

Analiza produktów rozkładu sparteiny i lupininy

W analizie chromatograficznej zastosowano metodę chromatografii bibułowej krążkowej. Do oznaczeń ilościowych alkaloidów używano bibuły Whatman nr 1, do jakościowych nr 3. Chromatogramy wywoływano zmodyfikowanym odczynnikiem Dragendorff'a.

W badaniu produktu *Sx* powstałego podczas rozkładu sparteiny stosowano układy:

- 1) aceton : 1n HCl w stos. obj. 4:1 (Wiewiórowski dane nie publ.),
- 2) butanol : toluen : HCl : woda (Reiher i in. 1959),
- 3) izobutanol : HCl : woda (Jaminet 1954),
- 4) nasyc. roztwór siarczanu amonu : etanol (Wiewiórowski i in. 1957).

Na bibułę nanoszono w postaci chlorowodorków: produkt przemiany sparteiny *Sx*, związek powstały po redukcji *Sx* oraz jako wzorce sparteinę, Δ^5 -dehydrosparteinę*, 17-trójchlorometylosparteinę**.

Przy analizowaniu produktu przemiany lupininy stosowano dodatkowo układ nr 5 — butanol : kwas octowy : woda (Jaminet 1954). Na bibułę nanoszono: produkt przemiany lupininy *Lx*, związek powstały po jego redukcji oraz jako wzorzec lupinę w postaci chlorowodorków.

Redukcje produktów rozkładu alkaloidów przeprowadzono dwiema metodami: a) redukcję *Sx* wodorem nad PtO_2 w roztworze kwasu solnego wg Leonard i in. (1955), b) redukcję *Lx* wodorkiem sodowoborowym w roztworze wodnym z dwukrotnym stechiometrycznym nadmiarem NaBH_4 w ciągu 1 godz. (Kupfer 1961; Lec 1959; Norymberski, Woods 1955; Schubert, Land 1960).

Analizy badanych związków w podczerwieni przeprowadzono na aparacie typu UR-10, stosując pryzmaty z NaCl. Analizowano związki w postaci wolnych zasad po rozpuszczeniu w chloroformie, przygotowując je do oznaczeń w sposób następujący: *Sx* po rozpuszczeniu w chloroformie przesączono przez wyprażoną ziemię okrzemkową, produkt redukcji *Sx* oczyszczono przez dwukrotną destylację w próżni około 10^{-3} T, *Lx* przedestylowano w próżni, a produkt redukcji *Lx* przesublimowano w próżni.

Analizę w ultrafiolecie przeprowadzono w zakresie 230—400 m μ na spektrofotometrze typu SF-4.

* Δ^5 -dehydrosparteina otrzymana wg Leonard i in. (1955) zawierała domieszkę $\Delta^5,11$ -dwudehydrosparteiny.

** 17-trójchlorometylosparteina otrzymana wg Rink, Grabowski (1956).

WYNIKI

Wyodrębnienie i charakterystyka bakterii zdolnych do rozkładania sparteiny

Wyodrębniono z gleby dwa szczepy bakterii, wykorzystujące sparteinę jako źródło węgla i azotu. Szczep nr 1 silniej rozkładający sparteinę stosowano w dalszych badaniach.

Opis morfologiczny szczepu bakterii nr 1:

Skos agarowy ze sparteiną: po 24 godz. wzrost wzdłuż rysy o barwie beżowej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej pofałdowanej i konsystencji mazistej. W następnych dniach silny wzrost rozlany po powierzchni skosu. Obraz mikroskopowy po 24 godz.: pałeczki o wymiarach $0,8 \mu \times 2,5-5 \mu$, powyginane. Są Gram-dodatnie. Nieruchliwe. Opt. temp. 27°C .

Skos agarowy z glikozą i peptonem: po 24 godz. silny wzrost wzdłuż rysy o barwie lekko różowej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, konsystencji mazistej. Obraz mikroskopowy po 24 godz.: pałeczki mniejsze niż na skosie ze sparteiną.

Żelatyna kluta: po 24 godz. słaby wzrost, po 8 dniach wzrost kolonii na powierzchni do ϕ 0,5 cm. Żelatyny nie hydrolizuje.

Pożywka syntetyczna (NH_4Cl + glukoza): słabe zmętnienie, osad białocielisty na dnie. CO_2 nie wydziela się.

Woda peptonowa: po 24 godz. słaby kożuszek na powierzchni płynu. W następnych dniach pożywka mętnieje, osad barwy białocielistej na dnie. Po 8 dniach wydziela się H_2S .

Mleko z lakmusem: po 8 dniach odbarwienie, na powierzchni kożuszek, na dnie osad. Białka w mleku nie hydrolizuje i nie powoduje krzepnięcia.

Skos białkowy: po 24 godz. słaby wzrost wzdłuż rysy, barwa biała. W następnych dniach silny wzrost rozlany po powierzchni skosu o barwie różowej.

Skos ziemniaczany: po 24 godz. wzrost wzdłuż rysy o powierzchni gruzelkowatej, błyszczącej, barwie beżoworóżowej. W następnych dniach silny wzrost rozlany po powierzchni skoku.

Skos z marchwi: po 24 godz. słaby wzrost, w następnych dniach silny rozlany po skosie, powierzchnia błyszcząca.

Szczep ten wykazuje wzrost na cukrach: silny na fruktozie, słabszy na glukozie, maltozie, mannozie, sacharozie, bardzo słaby na laktozie oraz na kwasach organicznych: silny na cytrynowym, słaby na winowym, bardzo słaby na szczawiowym, a brak wzrostu na mlekowym.

Skrobi nie hydrolizuje.

Azotany redukuje do azotynów i NH_3 w ilościach śladowych. Barwików do podłoża nie wydziela. Na skosie agarowym ze sparteiną barwa kolonii podczas przechowywania stawała się silnie różowa. Szczep ten jest zdolny do wykorzystania lupininy jako źródła azotu i węgla.

Wpływ temperatury, pH pożywki oraz stężenia sparteiny w pożywce na rozkład tego alkaloidu

Z danych tabeli 1 i 2 wynika, że optymalną temperaturą dla rozkładu sparteiny jest około 27°C (na co wskazywał już najsilniejszy wzrost na skosach), a optymalnym pH około 6,6. W pożywkach zaszczerpionych znajdował się obok sparteiny nowy związek reagujący z odczynnikiem Dragendorffa o innej wartości R_f niż sparteina. Oznaczano go symbolem *Sx*. Było go najwięcej w pożywkach inkubowanych w temp. 27°C i 30°C (około 4% ilości wprowadzonej do pożywki sparteiny) i w zakresie pH 5,0—7,4.

Tabela 1 — Table 1

Wpływ temperatury na rozkład sparteiny
Effect of temperature on the decomposition of spartein

Temp. Czas inkubacji Incubation time	24°C	27°C	30°C	37°C
24 godz.	—	6	13	24
48 godz.	31	42	34	24

Stopień rozkładu sparteiny w % ilości wprowadzonej
Degree of spartein decomposition as percentage of amount introduced

Tabela 2 — Table 2

Wpływ pH pożywki na rozkład sparteiny
Effect of medium pH on spartein decomposition

pH Czas inkubacji Incubation time	5,0	5,4	5,8	6,2	6,6	7,0	7,4	7,8	8,2
48 godz.	20	25	22	25	22	22	22	14	13
24 godz.	20	—	38	36	56	46	39	39	39

Stopień rozkładu sparteiny w % ilości wprowadzonej
Degree of spartein decomposition as percentage of amount introduced

Dane tabeli 3 wskazują, że największy procentowo rozkład sparteiny zachodzi w najbardziej rozcieńczonych pożywkach, natomiast w ilościach bezwzględnych w pożywkach o większym stężeniu. Najkorzystniejsze

wyduje się stężenie około 0,075%. Sz pojawił się we wszystkich pożywkach w ilościach od śladowych do kilku procent wprowadzonej sparteiny.

Przeprowadzane po różnych okresach inkubacji analizy chromatograficzne pożywek sparteinowych z hodowlą bakterii wykazały obecność obok sparteiny tylko związku Sz, który w ciągu dalszej inkubacji był rozkładany. Nie stwierdzono obecności związków reagujących z ninhydryną.

Tabela 3 — Table 3

Wpływ stężenia sparteiny w pożywce na jej rozkład
Effect of spartein concentration in the medium on its rate
of decomposition

Czas inkubacji Incubation time	Sparteina — Sparteine							
	0,15% (3.02 mg)		0,075% (1.51 mg)		0,038% (0.76 mg)		0,020% (0.39 mg)	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
24 godz.	9	0,26	6	0,09	8	0,06	5	0,02
48 godz.	28	0,84	42	0,64	85	0,65	92	0,36
72 godz.	28	0,84	63	0,95	96	0,73	100	0,39

Stopień rozkładu sparteiny w % oraz ilość rozłożonej sparteiny w 2 ml pożywki w mg

Degree of spartein decomposition in percentage and expressed as amounts decomposed in mg per 2 ml of medium

Omówione wyniki wskazują na największe podobieństwo wyizolowanego szczepu do rodziny *Corynebacteriaceae* rzędu *Eubacteriales* klasy *Schizomycetes* (wg Bergey'a). W rodzinie tej w rodzaju *Arthrobacter* znajdują się Gram-ujemne bakterie wyizolowane z gleby, i znane są również szczepy rozkładające nikotynę (Bergey 1957; Eberwein i in. 1961; Griffith, Byerrum 1961; Sgueros 1955) oraz atropinę (Kączkowski 1959; Kączkowski, Możejko-Toczko 1960), a także szczep *Corynebacterium belladonnae* (Niemi i in. 1959). Jednak szczep rozkładający sparteinę różni się tym, że jest Gram-dodatni. Nie można wykluczyć również możliwości przynależności badanego szczepu do rodzaju *Mycobacterium* z rodziny *Mycobacteriaceae* rzędu *Actinomycetales* ze względu na szereg występujących podobieństw.

Wyodrębnienie i charakterystyka bakterii zdolnych do rozkładania lupininy

Wyodrębniono z gleby dwa szczepy bakterii, wykorzystujące lupinę jako źródło azotu i węgla. Badania nad mikrobiologicznymi przemianami lupininy prowadzono posługując się szczepem nr 1.

Opis morfologiczny szczepu bakterii nr 1:

Skos agarowy z lupiną: po 24 godz. silny wzrost wzdłuż rysy o barwie białej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej gładkiej i konsystencji mazistej. W następnych dniach silny wzrost, barwa beżowa do lekko różowej. Obraz mikroskopowy po 24 godz.: pałeczki o wymiarach $0,8 \mu \times 2,5 \mu$, lekko powyginane. Są Gram-dodatnie. Nieruchliwe. Opt. temp. 27°C .

Skos agarowy z glukozą i peptonem: po 24 godz. słaby wzrost wzdłuż rysy o powierzchni gładkiej, błyszczącej, konsystencji mazistej. Obraz mikroskopowy po 24 godz.: pałeczki znacznie mniejsze niż na skosie z lupiną.

Żelatyna kłuta: po kilku dniach słaby wzrost kolonii na powierzchni, barwa beżoworóżowa. Żelatyny nie hydrolizuje.

Pożywka syntetyczna (NH_4Cl + glukoza): słabe zmętnienie, osad na dnie. CO_2 nie wydziela się.

Woda peptonowa: po 24 godz. słaby kożuszek na powierzchni płynu. W następnych dniach pożywka mętnieje, osad barwy białoróżowej na dnie. Po 7 dniach wydziela się H_2S .

Mleko z lakmusem: po 7 dniach lekkie odbarwienie mleka, w następnych dniach zupełne odbarwienie. Białka w mleku nie hydrolizuje i nie powoduje krzepnięcia.

Skos białkowy: po 24 godz. słaby wzrost wzdłuż rysy o powierzchni gładkiej, błyszczącej. W następnych dniach silny wzrost rozlany po powierzchni skosu. Barwa cielistoróżowa.

Skos ziemniaczany i skos z marchwi: po 24 godz. słaby wzrost wzdłuż rysy o powierzchni gładkiej, błyszczącej, barwie beżowej. W następnych dniach silny wzrost rozlany po powierzchni skosu, barwa beżoworóżowa.

Szczep ten wykazuje wzrost na cukrach: glukozie, maltozie, mannozie, sacharozie, słaby na fruktozie, laktozie oraz na kwasach organicznych: cytrynowym, słaby na szczawiovym, bardzo słaby na winowym i mlekowym.

Skrobi nie hydrolizuje.

Azotany redukuje do azotynów i NH_3 w ilościach śladowych. Barwików do podłoża nie wydziela. Szczep ten jest zdolny do wykorzystania sparteiny jako źródła azotu i węgla, przy czym powstaje związek chromatograficznie odpowiadający Sx .

Wpływ temperatury, pH pożywki oraz stężenia lupininy
w pożywce na rozkład tego alkaloidu

Z danych tabeli 4 i 5 wynika, że optymalnymi warunkami dla rozkładu lupininy są: temperatura około 27°C (w tej temperaturze wystąpiło najsilniejsze zmętnienie pożywek i wzrost na skosach agarowych), pH 7,6 —

około 9,0 (podobnie jak w doświadczeniach wstępnych). W pożywkach zaszczerpiionych znajdował się poza lupinina nowy związek reagujący z odczynnikami Dragendorffa o innej wartości R_f niż lupinina. Oznaczono go symbolem Lx , było go najwięcej w pożywkach inkubowanych w temp. 27°C i 30°C — około 8 % ilości lupininy wprowadzonej do pożywki, znajdował się też we wszystkich pożywkach stosowanych w doświadczeniach nad wpływem pH.

Tabela 4 — Table 4

Wpływ temperatury na rozkład lupininy
Effect of temperature on the decomposition
of lupinin

Czas inkubacji Incubation time	T e m p e r a t u r a				
	18°	24°	27°	30°	37°
24 godz.	12	17	24	25	7
48 godz.	20	36	51	38	7

Stopień rozkładu lupininy w % ilości wprowadzonej

Degree of lupinine decomposition as % of amount introduced

Tabela 5 — Table 5

Wpływ pH pożywki na rozkład lupininy
Effect of medium pH on lupinine decomposition

Czas inkubacji Incubation time	pH							
	6,8	7,2	7,6	8,0	8,4	8,8	9,2	9,6
48 godz.	41	38	38	38	36	36	37	24
24 godz.	65	72	87	92	93	92	—	84

Stopień rozkładu lupininy w % ilości wprowadzonej

Degree of lupinine decomposition as % of amount introduced

Tabela 6 — Table 6

Wpływ stężenia lupininy w pożywce na jej rozkład
Effect of lupinine concentration in the medium on its rate decomposition

Czas inkubacji Incubation time	Lupinina — Lupinine											
	0,15%		0,10%		0,05%		0,025%		0,010%		0,007%	
	(2,88 mg)		(1,89 mg)		(0,96 mg)		(0,52 mg)		(0,22 mg)		(0,15 mg)	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
24 godz.	7	0,20	24	0,45	33	0,32	60	0,31	77	0,17	80	0,12
48 godz.	21	0,61	51	0,97	68	0,65	ślady					

Stopień rozkładu lupininy w % oraz ilość rozłożonej lupininy w 2 ml pożywki w mg

Degree of lupinine decomposition in percentage and expressed as amounts decomposed in mg per 2 ml of medium

Największy procentowo rozkład lupininy stwierdzono w najbardziej rozcieńczonych pożywkach (tabela 6). Bezwzględna ilość rozłożonej lupininy była największa w pożywce o stężeniu 0,1%. Związek Lx zauważono we wszystkich zaszczipionych pożywkach.

Przeprowadzone po różnych okresach inkubacji analizy chromatograficzne pożywek lupininowych z hodowlą bakterii wykazały obecność obok lupininy związku Lx i drugiego pojawiającego się w śladowych ilościach. Nie stwierdzono obecności związków reagujących z ninhydryną. Związek Lx był rozkładany po dłuższym okresie inkubacji.

Omówione wyniki wskazują, że szczep rozkładający lupininę różni się od opisanego uprzednio szczepu rozkładającego sparteinę barwą, intensywnością wzrostu przede wszystkim na skosach agarowym z glikozą i peptonem i ziemniaczanym oraz w pożywkach syntetycznych z fruktozą i kw. cytrynowym.

Szczep ten, tak jak i opisany szczep rozkładający sparteinę, wykazuje największe podobieństwo do rodz. *Corynebacteriaceae*.

Wyniki prób identyfikacji produktów przemian sparteiny i lupininy — związków Sx i Lx .

Związek Sx .

Związek ten okazał się labilny, ulegał częściowemu rozkładowi już podczas rozdzielu na kolumnie celulozowej, a także przy próbach sublimacji. Sx w odróżnieniu od sparteiny odbarwiał silnie roztwór nadmanganianu potasu. W analizie chromatograficznej przy zastosowaniu podanych wyżej układów związek Sx zachowywał się podobnie jak Δ^5 -dehydrosparteina, a różnił się od 17-tróchlorometylosparteiny w układzie butanol : tolueń : HCl : woda.

W analizie w podczerwieni nie stwierdzono silnego pochłaniania grupy $C=O$ [a grupa ta wykazuje duże maksima pochłaniania (Bellamy 1954; Comin, Deulofeu 1959; Crow 1959; Marion i in. 1951)], co najwyżej jedynie słabe, prawdopodobnie powodowane przez produkty rozkładu Sx . Analiza Sx w ultrafiolecie wykazała największe pochłanianie w 230 m μ , następnie jego spadek do 400 m μ .

Produkt redukcji Sx chromatograficznie, w stosowanych układach, wykazywał wartości R_f równe wartości R_f sparteiny. Przeprowadzona analiza w podczerwieni w zakresie 3600—700 cm⁻¹ wykazała, że jest on identyczny ze sparteiną.

Związek Lx .

Związek Lx podczas przeprowadzanych badań nie wykazywał labilności ani jako wolna zasada, ani w postaci soli. Chromatograficznie w czterech układach (nr 1, 2, 3, 5) różni się od lupininy. Analiza w ultra-

Ryc. 1. Widmo w podczerwieni związku *Lx*Fig. 1. Infra-red spectrum of the *Lx* compound

Ryc. 2. Widmo w podczerwieni lupininy

Fig. 2. Infra-red spectrum of lupinin

fiolencie wykazała słabe pochłanianie w 230 m μ oraz silne pochłanianie w 285 m μ . Analiza w podczerwieni *Lx* w zakresie 3600—700 cm⁻¹ wykazała w porównaniu z lupiną zmianę w zakresie 1500—700 cm⁻¹, silne pochłanianie w 1730 cm⁻¹, a zanik pochłaniania w około 3220 cm⁻¹ (ryc. 1 i 2).

Produkt redukcji *Lx* w analizie chromatograficznej we wszystkich stosowanych układach zachowywał się jak lupinina. Analiza w podczerwieni w zakresie 4000—700 cm⁻¹ wykazała, że produkt redukcji *Lx* jest identyczny z epi-lupiną.

DYSKUSJA

Badane szczepy bakterii, które okazały się zdolne do rozkładania sparteiny lub lupininy, wyizolowane zostały z jednej próbki gleby, pobranej spod łubinu żółtego. Z próbki tej udało się wydzielić nawet dwa szczepy rozkładające sparteinę i dwa szczepy rozkładające lupininę. Fakt jednoczesnego łatwego wyodrębnienia nie jednego, ale kilku szczepów zdolnych do rozkładania jednego substratu występuje często w badaniach wielu autorów (Hughes 1955; Hylin 1958; Kączkowski 1959; Kączkowski, Możejko-Toczko 1960; Możejko-Toczko 1960; Sgueros 1955; Wada 1957). Analogicznie jak i w niniejszych doświadczeniach bakterie rozkładające alkaloidy były izolowane z gleby, na której rosły rośliny alkaloidowe, z powierzchni tych

roślin itp. Być może, że ta łatwość izolowania szczepów zdolnych do rozkładania alkaloidów jest związana z wydzielaniem tych związków do podłoża przez rośliny i możliwością uprzedniego już zetknięcia się z nimi drobnoustrojów.

W pożywkach ze sparteiną pod wpływem bakterii powstawał z tego alkaloidu związek nazwany *Sx*. Po redukcji *Sx* otrzymano sparteinę, co mogło wskazywać, że są to niektóre znane z literatury pochodne sparteiny, takie jak ketosparteiny (Comin, Deulofeu 1959; Crow 1959; Marion 1954; Wiewiórowski, Wolińska-Mocydlarz 1961), Δ^5 -dehydrosparteina (Leonard i in. 1955; Rink, Groebel, 1955, 1956), 17-hydroksysparteina (Rink, Grabowski 1955, 1956). Mimo, że nie udało się przeprowadzić pełnej analizy związku *Sx* w podczerwieni, brak silnego pochłaniania w zakresie odpowiadającym obecności grupy $C=O$ (Bellamy 1954, Marion i in. 1951) wskazuje na to, że *Sx* nie jest ketosparteina. Związek ten nie jest również 17-hydroksysparteina, gdyż w takim przypadku podczas alkalicznej ekstrakcji *Sx* chloroformem powstałaby 17-trójjchlorometylosparteina (Rink, Grabowski 1956), która w stosowanych warunkach nie powinna ulegać redukcji do sparteiny. Również w analizie chromatograficznej wystąpiły różnice w wartości R_f 17-trójjchlorometylosparteiny i *Sx* w układzie butanol : toluen : HCl : woda. Związek *Sx* jest bardzo labilny, zachowuje się chromatograficznie we wszystkich układach jak Δ^5 -dehydrosparteina, a silne odbarwienie roztworu $KMnO_4$ świadczy o jego nie nasyconym charakterze. Jakkolwiek trudności otrzymania *Sx* z pożywki (mała ilość *Sx* tworząca się przy rozkładzie sparteiny, jego labilność podczas procesów izolowania i oczyszczania) nie pozwoliły na ostateczne potwierdzenie tego wniosku, to jednak — wykluczając inne związki dające się zredukować do sparteiny — można przyjąć, że *Sx* jest dehydrosparteina.

Wzór 1. Sparteina wg Leonarda i in. (1955)

Formula 1. Spartein according to Leonard et al. (1955)

Trudno powiedzieć, czy mikrobiologiczne odwodorowanie sparteiny prowadziło do powstania jednego czy więcej podwójnych wiązań. Na pewno natomiast można stwierdzić, że *Sx* nie jest $\Delta^{5,11}$ -dwudehydrosparteina.

teina, bo chromatograficznie różni się od niej, ponadto przy redukcji podwójnego wiązania w położeniu Δ^{11} związek nie wraca do sparteiny, lecz do α -iso-sparteiny (Caramack i in. 1955; Galinovskiy i in. 1955; Kettelhack i in. 1954; Leonard i in. 1955; Marion, Leonard 1951; Rink, Groebel 1955, 1956). Ponieważ po redukcji Sx powstała sparteina można więc wykluczyć położenie Δ^{11} . Według reguły Bredta (cyt. za Rink, Groebel 1956) nie są też możliwe C_9-C_{10} , C_7-C_{17} , C_6-C_7 , C_9-C_{11} . Natomiast można według danych literatury zredukować do sparteiny Δ^5 -dehydrosparteinę (Leonard i in. 1955, Rink, Groebel 1955, 1956), a chemicznie najłatwiej jest wprowadzić podwójne wiązanie w położeniu Δ^5 . Jest możliwe, że odwodorowanie sparteiny przez bakterie w omawianych doświadczeniach miało właśnie taki charakter.

Przy bakteryjnym rozkładzie innych alkaloidów autorzy stwierdzili też reakcje ich odwodorowania (Hochstein, Rittenberg 1959, Kączkowski 1959, Wada 1957). Na uwagę zasługuje fakt, że nie udało się wykryć żadnego poza dehydrosparteiną produktu przemian sparteiny, który reagowałby z odczynnikami Dragendorff'a lub z ninhydryną. Ponieważ sparteina była jedynym źródłem węgla i azotu w pożywce, a podczas inkubacji zanikała ona, tak jak i produkt jej przemian Sx , można przyjąć, że związki niealkaloidowe niewątpliwie powstawały ze sparteiny pod wpływem bakterii, a ich dalsze przekształcenia umożliwiły budowę rozmnażających się komórek. W innych badaniach stwierdzono również rozkład sparteiny pod wpływem mikroorganizmów (Możejko-Toczko 1960; Nowacki 1958).

Jeśli chodzi o przemiany sparteiny w roślinach oraz pod wpływem wyciągów enzymowych z roślin, to stwierdzono przekształcenie jej w inne związki alkaloidowe, między innymi również w dehydrosparteinę oraz związki niealkaloidowe (Birecka i in. 1959, 1960, 1960; Birecka, Ścibor-Marchocka 1960, Nalborczyk 1962; Nowacki 1958; Piechowski, Nowacki 1959). Szereg zagadnień wymagałby wyjaśnienia, na przykład: 1) czy dehydrosparteiny otrzymane jako produkty przemian sparteiny w roślinach *in vitro* oraz pod wpływem bakterii są identyczne, 2) czy poprzez te dehydroformy sparteina ulega przemianom na związki niealkaloidowe, 3) czy związki niealkaloidowe, powstałe na skutek przemian sparteiny w roślinach łubinu, mogą ulegać również różnorodnym przekształceniom jak w badanych bakteriach.

Wyniki badań nad lupiną wskazują, że pod wpływem bakterii powstał z tego alkaloidu nowy związek oznaczony jako Lx . Związek ten zidentyfikowano jako aldehyd epi-lupininy, który przez analogię z chemicznie otrzymanym lupinalem (Zabojew 1948) nazwano epi-lupinalem. Na taką właśnie budowę tego związku, na obecność grupy aldehy-

dowej w *Lx* wskazują następujące czynniki: 1) widmo w podczerwieni — silne pochłanianie w 1730 cm^{-1} (Bellamy 1954), zanik pochłaniania w zakresie długości fal, w których występuje pochłanianie przez grupę —OH (Cookson 1953; Marion i in. 1951; Thomas i in. 1955), 2) pochłanianie w ultrafiolecie przy długości fali $285\text{ m}\mu$, czego nie wykazuje lupinina (Gilliam, Stern 1958), 3) w wyniku redukcji *Lx* boro-wodorkiem sodowym powstała epi-lupinina.

Wzór 2. Lupinina i epi-lupinina wg W. D. Crow (1958)

Formuła 2. Lupinine and epi-lupinine according to W. D. Crow (1958)

Wynika z tego, że przy przekształceniu lupininy do epi-lupinalu pod działaniem bakterii musi przebiegać proces epimeryzacji*, czyli przejście grupy $\text{—CH}_2\text{OH}$ do —CHO połączone jest ze zmianą położenia z aksjalnego na ekwatorialne. Zjawisko to można wytłumaczyć przemianą lupininy w związek odwodorowany, w którym zanikł jeden węgiel asymetryczny. Związek ten ulega następnie przemianie tautometrycznej do epi-lupinalu jako jedynie możliwego ze względów energetycznych związku. Widmo w podczerwieni świadczy o jednorodności badanej próby i należy sądzić, że forma przejściowa jest natychmiast przekształcana do epi-lupinalu. Jest więc zrozumiałe, że przy redukcji epi-lupinalu otrzymano epi-lupininę.

Niewiele jest badań nad przemianami biologicznymi lupininy. Lupinina po wprowadzeniu do łubinu przekształca się w inne związki alkaloidowe (Birecka, Ścibor-Marchocka 1960; Nowacki 1958), natomiast nie ulegała przemianom ani pod wpływem wyciągów enzymowych z łubinu (Nalborczyk 1962), ani z wątroby królika (Nowacki, Wężyk 1960). Autorka znalazła wzmiankę o wyizolowaniu szczepu bakterii wykazującego wzrost na lupininie (Możejko-Toczko 1960). W literaturze jest brak jakichkolwiek danych dotyczących występowania aldehydu lupininy bądź epi-lupininy w roślinach wyższych. Dlatego też stwierdzenie epi-lupinalu jako produktu bakteryjnego rozkładu wydaje się rzeczą ciekawą. Aldehyd ten jest metabolizowany przez bakterie do związków o charakterze niealkaloidowym, co stwierdzono w pożywkach po dłuższym okresie inkubacji.

* Przekształcenie takie nie mogło zachodzić podczas procesów izolowania i oczyszczania związku, gdyż (wg Cookson 1953; Winterfeld, Jap 1962) są do tego potrzebne bardziej drastyczne warunki.

Tak więc przy rozkładzie obu alkaloidów przez drobnoustroje glebowe zachodziła reakcja odwodorowania. W przypadku sparteiny wprowadzone zostało do cząsteczki podwójne wiązanie, a w przypadku lupininy nastąpiło przekształcenie grupy alkoholowej do aldehydowej.

Składam serdeczne podziękowanie prof. dr Helenie Bireckiej za cenne rady i wskazówki w czasie wykonywania badań i opracowywania wyników. Dziękuję serdecznie dr Marii Toczko za rady i wskazówki w badaniach mikrobiologicznych, prof. dr Maciejowi Wiewiórkowskiemu za pomoc w identyfikacji epi-lupinalu oraz dr Jerzemu Kączkowskiemu za uwagi przy dyskusji wyników.

*Pracownia Przemiany Materii
Zakładu Fizjologii Roślin PAN w Warszawie*

(Wpłynęło: 18.11.1963)

* * *

Po oddaniu niniejszej pracy do druku, przeprowadzono badania nad ewentualnym występowaniem w łubinie żółtym epi-lupinalu, względnie nad możliwością jego powstawania po wprowadzeniu lupininy do roślin. W przeprowadzonych badaniach nie udało się wykryć tego alkaloidu w łubinie gorzkim w fazie butonizacji, przekwitania, zielonych strąków, w pełni dojrzałości i w nasionach.

Nie uzyskano również epi-lupinalu po wprowadzeniu lupininy do siewek łubinu pastewnego i gorzkiego. Natomiast, analizując w podczerwieni odpowiednią frakcję chromatograficzną alkaloidów, zauważono w paru próbach pochłanianie w 1645 cm^{-1} , którego nie wykazują znane alkaloidy łubinu żółtego (sparteina i lupinina).

Niemожność wykrycia epi-lupinalu w badanych roślinach może być wynikiem albo rzeczywistego braku w nich tego związku, albo też występowania w znikomych ilościach.

SUMMARY

Two bacterial strains capable of decomposing sparteine and lupinine were isolated from the soil that came from a field on which yellow lupine was grown. They are able to utilize an alkaloid as the only source of carbon and nitrogen in the culture medium. According to Bergey's classification the bacteria show the greatest similarity to the family *Corynebacteriaceae*, order *Eubacteriales*, class *Schizomycetes*.

1. The optimal conditions for the alkaloid decomposition were as follows: for the bacteria utilizing sparteine — temperature about 27°C , pH of medium about 6.6, alkaloid concentration about 0.075%, and for the bacteria utilizing lupinine — temperature about 27°C , pH of medium 7.6—9.0, and alkaloid concentration about 0.1%.

2. During the bacterial decomposition of the investigated alkaloids new compounds Dragendorff-positive were formed: from sparteine a compound designed Sx and from lupinine a compound designed Lx, as well as traces of an unidentified substance. No compounds were found that would react with ninhydrin.

3. The compound Sx was described as dehydrosparteine, which during further

incubation is decomposed by bacteria. The compound *Lx* was identified as the aldehyde of epi-lupinine, epi-lupinal, which is also metabolized by bacteria.

4. From the conducted studies it can be concluded that during the decomposition of both alkaloids there occurred among others a dehydrogenation reaction, in the case of sparteine the introduction of at least one double bond to the alkaloid molecule, and in the case of lupinin a conversion of an alcohol group into an aldehyde group coupled with displacement of that group in molecule.

LITERATURA

1. Bellamy L. J., 1954, The infrared spectra of complex molecules, London.
2. Bergey's manual of determinative bacteriology. VII Ed. Bailliere, Tyndall and Cox LTD London 1957.
3. Birecka H., Rybicka H., Szymańska W., 1960, Przemiany alkaloidów w łubinie białym po wprowadzeniu lupaniny i hydroksylupaniny, Acta Soc. Bot. Pol. 29: 275.
4. Birecka H., Rybicka H., Ścibor-Marchocka 1959, Alkaloidy *Lupinus albus* i metoda ich oznaczania ilościowego, Acta Bioch. Pol. 6: 25.
5. Birecka H., Sebyła T., Nalborczyk E., 1959, Przemiany sparteiny w łubinie białym (*Lupinus albus*). Cz. I Łubin biały pastewny, Acta Soc. Bot. Pol. 28: 301.
6. Birecka H., Szklarek D., Mazan A., 1960, Alkaloid synthesis in de-rooted white lupine plants, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. biol. 8: 167.
7. Birecka H., Ścibor-Marchocka A., 1960, Alkaloid transformation in yellow lupine after introduction of sparteine or lupinine, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. biol. 8: 449.
8. Boit H. G., 1961, Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960, Berlin.
9. Caramack M., Douglas B., Martin E. W., Suss H., 1955, The remaining stereoisomers of the sparteine group, Jour. Am. Chem. Soc. 77: 4435.
10. Comin J., Deulofeu V., 1959, Studies on argentine plants. XVIII Multiflorine, the alkaloid from *Lupinus multiflorus* Lam., Austr. Jour. Chem. 12: 468.
11. Cookson R. C., 1953, The stereochemistry of alkaloids, Chem. and Ind.: 337.
12. Crow W. D., 1958, The stereochemistry and Hoffman degradation of lupinine methiodides, Austr. Jour. Chem. 11: 336.
13. Crow W. D., 1959, The alkaloids of *Lupinus varius* L. III The structure of base LV-1. Austr. Jour. Chem. 12: 474.
14. Eberwein H., Gries F. A., Decker K., 1961, Über den Abbau des Nicotins durch Bakterienenzyme, Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 323: 236.
15. Galinovsky F., Knoth P., Fischer W., 1955, Die Stereochemie der C₁₅-Lupinen Alkaloide. Mh. Chem. 86: 1014.
16. Gilliam A. E., Stern E. S., 1958, An introduction to electronic absorption spectroscopy in organic chemistry, London.
17. Griffith G. D., Byerrum R. U., 1961, The biological oxidation of nicotine, Diss. Abstr. 22: 416.
18. Hochstein L. J., Rittenberg S. C., 1959, The bacterial oxidation of nicotine. I Nicotine oxidation by cell-free preparations, Jour. Biol. Chem. 234: 151.
19. Hughes D. E., 1955, 6-Hydroxynicotinic acid as an intermediate in the oxidation of nicotine acid by *Pseudomonas fluorescens*, Biochem. Jour. 60: 303.

20. Hylin J. W., 1958, Microbial degradation of nicotine. I Morphology and physiology of *Achromobacter nicotinophagum*. Jour. Bact. 76: 36.
21. Jaminet F., 1954, Contribution à l'étude biochimique du génét à balais (*Sarothamnus scoparius* L.), Jour. Pharm. Belgique 9: 36.
22. Kączkowski J., 1959, Mikrobiologiczny rozkład alkaloidów tropanowych, Acta Soc. Bot. Pol. 28: 677.
23. Kączkowski J., Możejko-Toczko M., 1960, Bakterie rozkładające alkaloidy tropanowe, Acta Mikrob. Pol. 9: 173.
24. Kettelhack D., Rink M., Winterfeld K., Die Nebenalkaloide des Bensginginsters (*Sarothamnus scoparius* L.), Arch. Pharm. 287: 1.
25. Kupfer D., 1961, Altered selectivity of reduction of steroidal carbonyls, Tetrahedron 15: 193.
26. Lec J. B., 1959, Reduction of some carbohydrates and their derivatives with metal borohydrides, Chem. et Ind.: 1455.
27. Leonard N. J., 1960, Lupin alkaloids, The alkaloids, vol. VII Manske R.H.F., N. York, London.
28. Leonard N. J., Thomas P. D., Gash V. W., 1955, Unsaturated amines. IV Structures and reactions of the dehydrosparteins and their salts, Jour. Am. Chem. Soc. 77: 1552.
29. Marion L., 1954, La Stereochimie des alkaloides lupiniques, Bull. Soc. Chim. Fran.: 1193.
30. Marion L., Leonard N. J., 1951, The synthesis of dehydrolupanins and the stereochemistry of the C₁₅ lupin alkaloids, Canad. Jour. Chem. 29: 355.
31. Marion L., Ramsay D. A., Jones R. N., 1951, The infrared absorption spectra of alkaloids, Jour. Am. Chem. Soc. 73: 305.
32. Możejko-Toczko M., 1960, Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini*. Acta Microb. Pol. 9: 157.
33. Nalborczyk E., 1962, Enzymatyczne przemiany niektórych alkaloidów *Lupinus albus* *in vitro* i *in vivo*, Praca doktorska wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin SGGW.
34. Niemer H., Bucherer H., Kohler A., 1959, Über den Abbau von Atropin durch *Corynebacterium belladonnae*, Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 317: 238.
35. Norymberski J. K., Woods F., 1955, Partial reduction of steroid hormones and related substances, Jour. Chem. Soc.: 3426.
36. Nowacki E., 1958, Badania nad syntezą alkaloidów w łubinie, Roczn. Nauk Roln. 79-A: 505.
37. Nowacki E., Wężyk S., 1960, Wstępne badania nad toksycznością alkaloidów łubinowych dla organizmu królika (*Oryctolagus cuniculus* L.), Roczn. Nauk Roln. 75-B: 385.
38. Piechowski M., Nowacki E., 1959, Enzymatic oxydation of spartein, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. biol. 7: 165.
39. Reifer I., Niziołek S., 1957, Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu, Acta Bioch. Pol. 4: 165.
40. Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D., 1959, Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych, Acta Bioch. Pol. 6: 17.
41. Rink M., Grabowski K., 1955, 17-Hydroxylspartein seine Aceton-, Pinakolin-, und Chloroformverbindungen, Naturwiss. 42: 343.
42. Rink M., Grabowski K., 1956, Zur Kenntnis des 17-Hydroxylsparteins, Arch. Pharm. 289: 695.

43. Rink M., Groebel H. J., 1955, Zur Kenntnis des Dehydrosparteins „Winterfeld“, Naturwiss. 42: 557.
44. Rink M., Groebel H. J., 1956, Über das Dehydrospartein „Winterfeld“, Arch. Pharm. 289: 442.
45. Schubert F., Land K., 1960, Neue Wege zur Herstellung von Natrium boranat und dessen Verwendung, Angew. Chem. 72: 994.
46. Sgueros P. L., 1955, Microbial transformations of the tobacco alkaloids, Jour. Bact. 69: 28.
47. Thomas A. F., Vipond H. J., Marion L., 1955, The papilionaceous alkaloids. XXI The alkaloids of *Lupinus pilosus* Walt. and the structure of tetralupine, Canad. Jour. Chem. 33: 1290.
48. Wada E., 1957, Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds, Arch. Bioch. Bioph. 72: 145.
49. Wiewiórowski M., Bartz J., Wysocka W., 1961, Lupin alkaloids. On the composition of the high-boiling fraction of *Lupinus albus* alkaloids, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. chim. 9: 715.
50. Wiewiórowski M., Galinovsky F., Bratek M. D., 1957, Über ein neues Lupinen-Alkaloid mit vierzehn Kohlenstoffatomen, Mh. Chem. 88: 663.
51. Wiewiórowski M., Wolińska-Mocydlarz J., 1961, Lupin alkaloids. Structure of alkaloids „b-109” and „n-4/5” separated from *Lupinus albus*. Chemistry of Δ^2 L-dehydro-4-ketosparteine, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. chim. 9: 709.
52. Winterfeld K., Jap T. B., 1962, Zur Kenntnis der Umlagerung von Lupinin und Epilupinin mit metallischem Natrium, Arch. Pharm. 295: 14.
53. Zabojew S. A., 1948, Lupinin i jewo okislenije, Žurn. Obszcz. Chim. 18: 194.