Badania nad proteazą u *Bact. prodigiosum.*

Recherches sur la protéase chez *Bact. prodigiosum.*

napisał
WACŁAW MOYCHO.

(wpłynęło I. VI. 1933.)

Skoro olbrzymia większość procesów przemiany materji w organiźmie zarówno zwierzęcym jak i roślinnym zachodzi pod wpływem odpowiednich enzymów, to należy przypuszczać, że i procesy syntezy i rozpadu ciał białkowych, występujące w każdej żywej komórce, wymagają odpowiednich enzymów — proteaz. Obecność ich istotnie stwierdzono zarówno u roślin wyższych jak i niższych. Np. Fischer (3) poddał badaniu 14 pospolitych roślin uprawnych i znalazł enzym proteolityczny u wszystkich tych roślin i we wszystkich organach.

U niższych zaś organizmów, jak bakterje, gdzie ciała białkowe wynoszą 40% do 70% suchej masy, obecność proteaz powinna się szczególnie zaznaczać. W roku 1908 Tiraboschi (15) zbadał 23 rodzaje bakteryj i wszędzie stwierdził proteazy. Wiemy też, że zdolność rozpuszczania żelatyny właściwą jest bardzo licznym bakterjom, a zdolność ta jest świadectwem występowania enzymu proteolitycznego. Zresztą brak tej zdolności u pewnych bakteryj — nie dowodzi jeszcze braku proteaz; trzeba raczej przypuszczać, że enzym i w tych wypadkach występuje w komórce, ale ulega zniszczeniu wraz ze śmiercią organizmu.

Pomimo tak szerokiego rozpowszechnienia proteazy wiele kwestyj pozostaje jeszcze niewyjaśnionych: nie wiadomo np., czy jest to *enzym pojedyńczy czy wieloraki,* nieznane jest *powstawanie i sposób wyzwalania* go z komórki.

1. Vines (20) rozróżniał podobnie jak w świecie zwierzęcym dwa rodzaje proteaz: jedną, działającą w ośrodku kwaśnym — pepsynazę; drugą, działającą w ośrodku zasadowym — tryptazę.

Potwierdził to D e r n b y (1) u drożdży, określając w sposób ścisły dla pierwszej opt. pH. = 4,0 — 4,5, dla drugiej — opt. pH = 7,0.

W następstwie W i l l s t ä t t e r (19) bliżej zbadał znany już wśród roślin wyższych, kwiatowych, „trzeci rodzaj" proteaz — papainę. Enzym ten okazał się bardzo rozpowszechnionym nie tylko u roślin wyższych, ale także i niższych, podobnie jak i w tkankach zwierzęcych.

Szereg uczonych jak O p p e n h e i m e r (13), E u l e r (2), G r a s s m a n n (7) przypuszczają, że jest to może nawet jedyna proteaza, występująca w świecie roślinnym, gdzie enzymy nie uległy tak silnemu zróżniczkowaniu, jak to widzimy u zwierząt wyższych (G r a s s m a n n). Papaina ma swe opt. pH dla prędkości proteolizy zależne od rodzaju białka, ponadto enzym ten wyróżnia się zdolnością hydrolizowania białka niezdysocjowanego.

W ostatnich czasach U t k i n a - L i u b o w z o w a i S t e p p u h n (16) dochodzą do przekonania, że trzy te proteazy zarówna w świecie roślinnym jak zwierzęcym wykazują wielkie podobieństwo (ich wspólne opt. pH wynoszą: pH = 3 — 4; pH = 5 — 6; pH = 7.0 — 7.5), i przypuszczają nawet, że istnieje jeden tylko enzym proteolityczny, który w różnych środowiskach odmiennie się zachowuje.

2. Podobnie i sprawa powstawania proteazy nie jest dotąd wyjaśniona. W dawniejszej literaturze [O p p e n h e i m e r (13, II wyd. str. 420), E u l e r (2) po części] dość rozpowszechniony był pogląd, że tworzenie się enzymów stoi w ścisłym związku z wzrostem komórki. Jednakże W i l l s t ä t t e r (18) wykazał, że powstawanie takiego enzymu jak saccharaza u drożdży nie jest przejawem wzmożonej przemiany materji, ale raczej wynikiem szczególnego podrażnienia komórki pod wpływem cukru nawet w najdrobniejszych ilościach.

Poddano również kontroli powstawanie proteazy u bakteryj. Wyniki okazały się dość różnorodne: kiedy jedni, jak M e r r i l l i C l a r k, (10), a później G o r b a c h (6), dochodzą do wniosku, że można zapomocą odpowiednich soli, czy też pH, spotęgować zawartość proteazy w bakterji niezależnie od jej wzrostu, to inni, jak E. W i l s o n (17), uważają, że dwa te procesy wzrostu i wytwarzania proteazy są jaknajściślej związane i przebiegają zupełnie równolegle.

Trzeba zauważyć, że termin, stale stosowany przez autorów, „powstawania" czy „tworzenia się" proteazy (Enzymbildung) u

bakteryj nie jest zupełnie trafny. O powstawaniu bowiem enzymu właściwie nic nie wiemy, gdyż proces ten jest nieuchwytny. Jedynie w wypadku, kiedy zachodzi właściwa sekrecja w miarę jego tworzenia się, jak to się odbywa z pepsyną czy trypsyną w przewodzie pokarmowym wyższych zwierząt, użycie terminu „powstawanie" enzymu byłoby usprawiedliwione. Natomiast u proteazy, domniemanego „endofermentu", badamy przecież tylko zdolność proteolityczną enzymu, wyzwolonego już po śmierci komórki. Czy jednak wyzwala się cała proteaza, czy też część jej przy zamieraniu bakterji nie ulega zanikowi — tego nie wiemy. Dlatego w pracy niniejszej używać będziemy raczej terminu „zdolność proteolityczna" hodowli.

3. Wreszcie niewyjaśnioną pozostaje kwestja wyzwalania proteazy. Oppenheimer w dziele: „Fermente u. ihre Wirkungen" (str. 407), a Euler w „Chemie der Enzyme" (str. 571) sądzą, że u bakteryj nie zachodzi prawdziwe wydzielanie, sekrecja proteazy; jest to typowy t. z. endoenzym, który wydostaje się z komórki dopiero po jej śmierci; niekiedy zaś jak u *Bact. Coli* ulega on zniszczeniu wraz ze śmiercią samego organizmu. Opinję tę potwierdziły badania Gorbach'a (6) i Glinki — Tschernowitz (4). Natomiast szereg badaczy jak: Janke i Holzer (8,9), Virtanen i Tarnauen (21), Gorini, Grassmann i Schleich (5) utrzymują, jakoby właściwa sekrecja enzymu istotnie zachodziła u pewnych bakteryj. Ponieważ jednak niektóre z tych prac (Virtanen'a i Tarnauen'a, druga Gorini'ego, Grassmann'a i Schleich'a) mają charakter wstępnych komunikatów i nie zawierają bardziej szczegółowych danych, więc wymagają bliższego uzasadnienia.

W pracy niniejszej nad *Bact. prodigiosum* postawiono sobie dwa główne zadania:

1) Czy wyzwalanie proteazy jest procesem przyżyciowym, czy też pośmiertnym.

2) Czy można zapomocą zmian środowiska: stężenia H°, czy fosforanów K wpłynąć na spotęgowanie własności proteolitycznych bakterji niezależnie od jej wzrostu.

Zjawianie się proteazy badano na tle rozwoju hodowli. Znając przebieg rozwoju i chwilę występowania proteazy w hodowli, można wyjaśnić, czy u *Bact. prodigiosum* zachodzi właściwa sekrecja, czy też enzym zjawia się wraz z rozpadem komórki.

Rozwój kultury *Bact. prodigiosum* określano przez oznaczenie w pewnych odstępach czasu ilości żywych komórek w hodowli. Metoda ta jest zupełnie zadawalająca w pierwszym okresie rozwoju, kiedy nieustannie powstają nowe komórki, a ilość zamierających w tymże czasie jest stosunkowo znikoma; natomiast w drugim okresie, kiedy właśnie ilość zamierających bakteryj przeważa nad nowopowstającemi, określanie żywych komórek ma znaczenie raczej orjentacyjne dla oceny regresji kultury.

Zdolność hydrolizowania żelatyny była świadectwem pojawiania się proteazy w kulturze. Wpływ żywych komórek usuwano bądź przez dodatek toluolu, lub też zapomocą wirówki. Szybkość hydrolizowania była miarą ilości enzymu.

Opis metody.

S z c z e p. — Badania przeprowadzono nad *Bact. prodigiosum*, którego jeden szczep, oznaczony literą M, pochodził z Pracowni Mikrobiologji i Przemysłu Rolnego S. G. G. W., drugi — oznaczony literą Kr., pochodził z Krakowa z Zakładu Weterynarji i Medycyny Doświadczalnej U. J.

Szczepy te ujawniały dość znaczne odchylenia, jak widać z załączonej tabelki:

Szczepy *Bact. prodigiosum*.		M.	Kr
Wielkość:		2,1μ	0,7μ
Ruch:		nieruchome	sł. ruchome
Wymogi tlenowe:		duże	słabe
Hodowla na skośnym agarze:	barwa:	czerwona	b. sł. różowa
	wygląd:	spiętrzona, fałdowana	płaska, śluzowata
Kolonja na żelatynie w szalce Petri'ego:	w środku:	zbite jądro czerwone	sł. zróżnicowane jądro różowe
	na obwodzie:	przezroczysty pierścień żelatyny	mętny pierścień rozp. żelatyny

Jakkolwiek badania naogół przeprowadzano równolegle z obu szczepami, to jednak wyniki podane w pracy niniejszej ograniczają się głównie do szczepu M. Zachowanie się obu szczepów jest naogół dość podobne; pewne odchylenia szczepu Kr., jak silniejszy rozwój hodowli i powolniejszy jej zanik, objaśnić można prawdopodobnie mniejszemi wymogami co do ilości tlenu.

P o ż y w k a. — Hodowlę *Bact. prodigiosum* przeprowadzano w pożywce płynnej. Składała się ona z 1% roztworu wodnego peptonu Witte'go z dodatkiem 0,5% soli kuchennej i odpowiedniej

ilości HCl n/1 lub NaOH n/1, zależnie od pożądanego stężenia H°. Pożywkę używano w ilościach 40, 100, lub 150 cm³ w odpowiednich kolbkach.

Kwasowość tak przygotowanej pożywki ulegała jednak zmianie pod wpływem rozwijającej się bakterji; w wypadkach, kiedy szło o utrzymanie kwasowości bardziej stałej, dodawano mieszaninę pierwszo — i drugorzędowego fosforanu K.

S t ę ż e n i e. — Oznaczanie kwasowości przeprowadzano na drodze elektrometrycznej zapomocą elektrody chinhydronowej. W ośrodkach bardziej zasadowych, gdzie powyższa metoda nie daje gwarancji, stosowano dodatkowo metodę kolorymetryczną (barwiki C l a r c k'a i L u b s'a).

Z a k a ż a n i e h o d o w l i. — Do zakażania używano zawsze kultury młodej, 24-godzinnej, otrzymanej w wodzie peptonowej jak wyżej, ale z dodatkiem siarczanu magnezu i asparaginy. W doświadczeniach seryjnych zakażenie przeprowadzano, wprowadzając do każdej pożywki wyjałowionej po jednej kropli hodowli wyjściowej. Po skłóceniu kultury przetrzymywano ją w termostacie w $t^0 = 22^0 — 23^0$ C.

R o z w ó j k u l t u r y. — Stopień rozwoju hodowli *Bact. prodigiosum* określano przez oznaczanie ilości żywych bakteryj, znajdujących się w 0,1 cm³ pożywki. W tym celu pobierano określoną próbę hodowli, a po odpowiedniem rozcieńczeniu wyjałowioną wodą peptonową i skłóceniu wprowadzano wiadomą ilość tego płynu do ciepłej, rozpuszczonej, 12% żelatyny. Żelatynę po skłóceniu wylewano na szalkę Petrie'go i całość przenoszono do termostatu w $t^0 = 22^0 — 23^0$ C. Po 1 — 2 dniach poszczególne żywe komórki tworzyły na żelatynie oddzielne kolonje, które obliczano.

Liczby podane w rubryce „ilość żywych bakteryj" oznaczają ilość bakteryj w miljonach w 0,1 cm³ pożywki. Ich wzrost czy zmniejszanie się wskazywał na wzrost czy zanik kultury.

Zauważyć trzeba, że metoda powyższa daje zupełnie zadawalające rezultaty. Różnica w 2-ch równoległych doświadczeniach nie przekracza 5%.

P r o t e o l i z a. — Występowanie proteazy w hodowli *Bact. prodigiosum* stwierdzano przez hydrolizę żelatyny. W doświadczeniach najczęściej używano próbki surowej hodowli, w której żywe komórki niszczono zapomocą toluolu (1% — 5%). Niekiedy zaś, w celu oddzielenia żywych komórek, próbki hodowli poddawano wirowaniu (4.500—5.000 obrotów na minutę); jednakże i w tym wypadku do otrzymanego przezroczystego płynu dodawano kro-

plę toluolu w celu zabicia ewentualnie pozostałych nielicznych bakteryj. W ten sposób otrzymaną pożywkę przenoszono następnie w ilości 0,3 cm³ na żelatynę w probówkach.

Żelatyna używana do tych celów była 10%, obojętna, w ilościach około 3 cm³ i w probówkach o średnicy 0,8 cm. Wobec tego, że ilość pożywki (0,3 cm³) w porównaniu do ilości żelatyny (3 cm³), jest stosunkowo drobna, więc wpływ różnych stężeń H° w badanych próbkach na przebieg proteolizy jest możliwie zredukowany.

Pomiar proteolizy odbywa się w sposób następujący: po wprowadzeniu pożywki na powierzchnię żelatyny mierzono wysokość słupa żelatyny w probówce; probówkę pozostawiano w t^0 = 22° — 23° C. w ciągu 48 godzin, poczem ponownie mierzono wysokość słupa żelatyny. Różnica wyników obu pomiarów stanowiła wysokość słupa rozpuszczonej żelatyny pod wpływem proteazy w pożywce. Granica rozdziału między żelatyną rozpuszczoną a niezmienioną jest tak wyraźna, że pomiar można dokonać ze ścisłością do 0,1 mm. Każde oznaczenie powtarzane było 3-krotnie. Liczby, podane w rubryce „proteoliza", wyrażają w mm wysokość słupa rozpuszczonej żelatyny i stanowią średnią z 3-ch pomiarów.

3. Część doświadczalna.

Występowanie proteazy w rozwoju hodowli Bact. prodigiosum.

Już w pracy (12) nad występowaniem barwika u *Bact. prodigiosum* wielokrotnie, ubocznie, dało się zauważyć, że proteaza pojawia się w hodowli jednocześnie z prodigiozyną. Ponieważ, jak wynikało z tych badań, prodigiozyna zjawia się po śmierci bakterji, więc nasuwało się przypuszczenie, że i wyzwalanie proteazy z komórki jest procesem pośmiertnym.

W doświadczeniach niniejszych badano rozwój hodowli *Bact. prodigiosum*, a równolegle — zjawianie się i wzrost zdolności proteolitycznej w kulturze.

Z hodowli peptonowej *Bact. prodigiosum*, liczącej około 100 cm³ pożywki, pobierano co pewien czas próbki w ilości około 3 cm³; w próbce określano ilość żywych bakteryj, stężenie H° i stopień proteolizy. Przy proteolizie stosowano równolegle pożywki dwojakiego rodzaju: brano bądź surową hodowlę z dodatkiem toluolu, bądź też hodowlę tę poddawano uprzednio wirowaniu, poczem do otrzymanego przezroczystego płynu dodawano kroplę toluolu.

TABLICA 1

Występowanie zdolności proteolit. w hodowli *Bact. prodigiosum*
Faculté protéolytique dans la culture de *Bact. prodigiosum*

Stężenie H^0 (concentration en H^0) = p H; rozwój hodowli (développement de la culture) = R
Zdolność proteolityczna (Faculté protéolytique) = Prot.
a = hodowla + toluol = culture + toluo
b = pożywka + toluol = liquide de culture + toluo

N	Szczep (Souche)		Obserwacja po ..... dniach (observation au bout de ..... jours							
			0	1	2	3	4	5	6	10
1	M	p H	5.05	5.65	6.52	6.96	7.32	—	7.97	8.45
		R	+	12.0	28.0	31.2	12.8	—	8.4	4.8
		Prot. a	—	—	—	0.8	2.0	—	3.1	3.0
		Prot. b	—	—	—	0.8	2.1	—	3 1	3.0
2	M	p H	5.10	5 50	6.40	6.70	6.88	—	7.50	8.35
		R	+	3.4	24.2	34.8	24.0	—	15.0	3.2
		Prot. a	—	—	—	+	0.9	—	2.7	3.4
		Prot. b	—	—	—	+	1.1	—	2.6	3.3
3	Kz	p H	5.13	5.30	6 47	6.78	6.82	6.85	—	7.75
		R	+	2.4	18.5	51.3	67 3	49.5	—	23.5
		Prot. a	—	—	—	+	1.1	2.3	—	4.3
		Prot. b	—	—	—	+	1.0	2.5	—	4.2

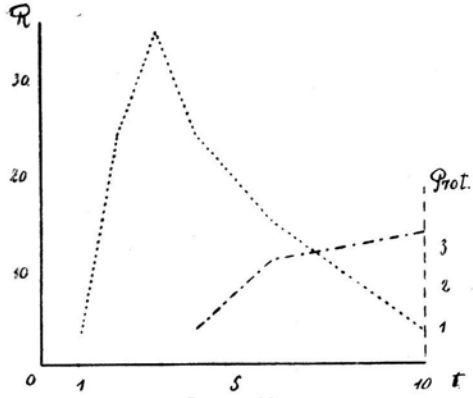
Wykresy NN 1, 2 i 3 ilustrują przebieg rozwoju hodowli i zdolności proteolitycznej u Bact. prodigiosum w trzech podanych przykładach.

Nadmienić trzeba, że do mechanicznego oddzielania komórek stosowano także metodę sączenia hodowli przez świecę Chamberland'a; ta metoda okazała się nieodpowiednią, gdyż płyn enzymatyczny przechodzi wyraźnie osłabiony. Podobne osłabienie zachodzi również przy skłóceniu tylko płynu enzymatycznego ze sproszkowanym kaolinem.

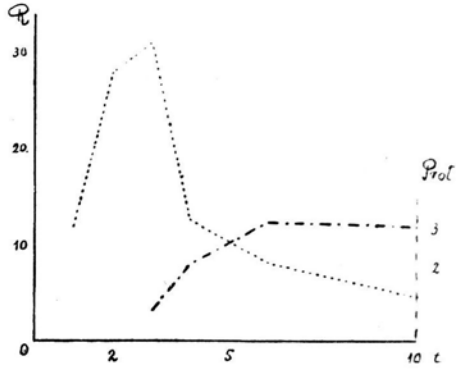
Wykresy Nr. Nr. 68, 69 i 70 ilustrują przebieg rozwoju hodowli i zdolności proteolitycznej u *Bact. prodigiosum* w trzech podanych przykładach.

Rozpatrzmy naprzód przebieg rozwoju hodowli *Bact. prodigiosum*, a następnie dopiero na tle tego rozwoju występowanie proteazy.

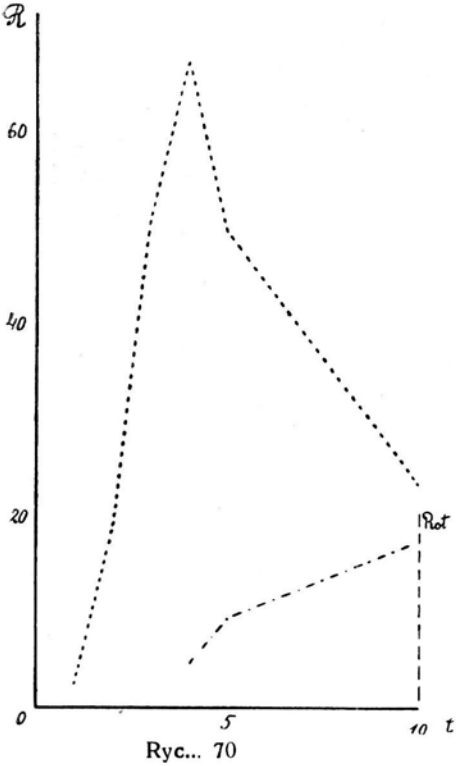
a) R o z w ó j h o d o w l i. W rozwoju rozróżnić można dwa okresy: pierwszy — od zakażenia pożywki do osiągnięcia ma-



Ryc. 68



Ryc... 69



Ryc... 70

Przebieg rozwoju hodowli i zdolności proteolitycznej u *Bact. prodigiosum.*
(Marche du développement de la culture et de la faculté protéolytique chez *Bact. prodigiosum.*)

R = ilość żywych komórek w miljonach w 0,1 cm³ hodowli.
(nombre en millions de bactéries vivantes contenues dans 0,1 cm³ de la culture)

Prot. = zdolność proteolityczna, wyrażona w mm. wysokości, warstwy shydrolizowanej żelatyny.
(faculté protéolytique exprimée en mm. par la couche de la gélatine hydrolisée)

t = czas w dniach. (temps en jours)

ksymalnego natężenia rozwoju; drugi — od tego punktu do niemal całkowitego zaniku żywych komórek hodowli.

W pierwszym okresie przyrost żywych komórek odbywa się nadzwyczaj szybko: już po 24 godzinach ilość bakteryj w 0,1 cm³ hodowli wzrasta do paru miljonów; po 48 godz. — wynosi kilkanaście miljonów. Stopniowo jednak szybkość rozmnażania maleje: w trzecim lub czwartym dniu rozwój osiąga największe natężenie.

Rozpoczyna się druga faza — regresja kultury: ilość żywych bakteryj maleje. Niewątpliwie już i poprzednio obok powstawania nowych komórek zachodziło także i ich zamieranie, ale ten proces zaniku był początkowo słaby, gdyż warunki rozwojowe były korzystne; stopniowo warunki te pogarszają się: zachodzi wyczerpywanie się pożywki, zatruwanie jej szkodliwemi produktami przemiany materji, wreszcie zanik tlenu w głębszych warstwach hodowli. Szczep M., osobliwie wrażliwy na brak tlenu, reaguje masowem i gwałtownem zamieraniem komórek. Szczep Kr. lepiej znosi brak tlenu, jak mnie przekonały doświadczenia nad jego rozwojem w atmosferze beztlenowej; rozwija on się bujniej, a zanika powolniej.

b) P r o t e o l i z a. — Przedewszystkiem stwierdzić trzeba, że proteoliza przebiega jednakowo, niezależnie od tego czy użyto do tego celu surową kulturę z dodatkiem toluolu, czy też przed dodaniem toluolu usunięto komórki z hodowli przez wirowanie. Toluol więc, zabijając bakterje, nie wpływa, przynajmniej w sposób uchwytny, na wydzielanie się proteazy z komórek, nie zmienia własności proteolitycznych hodowli. Ten wynik upoważnia do stosowania w dalszych badaniach nad proteolizą wprost surowej hodowli po skłóceniu jej tylko z toluolem.

Zestawiając teraz pojawienie się proteazy z przebiegiem rozwoju hodowli, stwierdzamy, że w początkowej fazie własności proteolityczne nie występują; zjawiają się one później, w okresie maksymalnego rozwoju hodowli i szybko się wtedy potęgują.

Zauważmy przytem, że zjawianie się zdolności proteolitycznych przypada na okres gwałtowniejszego zanikania żywych komórek. Współczesność tych dwu zjawisk zdaje się wskazywać, że proteaza występuje w ośrodku zewnętrznym dopiero ze śmiercią bakterji.

Słuszność tego przypuszczenia znajduje potwierdzenie w tem, że potęgowanie się siły proteolitycznej biegnie równolegle z zamieraniem komórek; podobnie, gdy prędkość zamierania komórek maleje, to zmniejsza się również i prędkość proteolizy.

Widoczne osłabienie zdolności hydrolitycznej w ostatniej fazie, jak to widać na wykresach, należy prawdopodobnie przypisać zasadowemu odczynowi ośrodka.

Czy jednak proces wyzwalania proteazy zachodzi wyłącznie po śmierci bakterji, to znaczy, że niema właściwej sekrecji enzymu za życia komórki? Być może, sekrecja występuje, ale wskutek niedo-

statecznej ilości komórek we wcześniejszych stadjach, jest ona w danych warunkach doświadczalnych nieuchwytna.

Sekrecja proteazy u Bact. prodigiosum.

Dla wyjaśnienia, czy u *Bact. prodigiosum* zachodzi sekrecja, przeprowadzono badanie proteolizy w kulturach zagęszczonych. Kłócenie kultury płynnej *Bact. prodigiosum,* udostępniając dopływ powietrza, potęguje jej rozwój, jak to stwierdziłem w mej pracy nad powstawaniem prodigiozyny. Kiedy w hodowli, pozostającej w spokoju, zachodzi już faza regresji, to hodowla kłócona, znacznie obfitsza, nie przedstawia żadnych cech zamierania komórek, jak np. pojawiania się zabarwienia.

Pożywkę peptonową po zakażeniu i skłóceniu dzielono na dwie równe części i umieszczano w odpowiednich kolbkach; jedną z nich pozostawiano w spokoju, drugą — kłócono wielokrotnie. Po 3-ch do 5-ciu dniach w obu kulturach określano jak zwykle stopień rozwoju hodowli, stężenie H°, a po dodaniu toluolu badano proteolizę; oznaczano ponadto stopień zabarwienia kultury, jako świadectwo mniej lub bardziej posuniętego procesu zamierania komórek.

TABLICA 2.
Sekrecja proteazy u *Bact. prodigiosum*.
(Secrétion de la protéase chez *Bact. prodigiosum*).

Doświadczenie (Expérience)	1		2		3	
Hodowla (culture)	w spokoju (au repos)	kłócona (remuée)	w spokoju (au repos)	kłócona (remuée)	w spokoju (au repos)	kłócona (remuée)
Obserw. po. .dn. (Observ. au bout de. .jours)	3		3		5	
Początk. pH (pH initial)	4.90		4.65		4.65	
Końcowe pH (pH final)	6.80	6.75	6.35	6.30	7.50	7.47
Zabarwienie (coloration)	różowe (rose)	bezbarwne (incolore)	sł. różowe (rose pâle)	bezbarwne (incolore)	różowe (rose)	sł. różowe (rose pâle)
R	14.7	36.8	24.5	63.5	15.8	70.3
Prot.	1.2	0	0.9	0	1.9	0.7

Występowanie zabarwienia w hodowlach, pozostających w spokoju, dowodzi obecności martwych komórek; w kulturach kłóconych brak zabarwienia wskazuje na nieobecność martwych bakteryj, przynajmniej w nieco większej ilości; wyjątek stanowi doświadczenie trzecie, gdzie w kulturze kłóconej występuje słabe zaróżowienie.

Porównując natężenie rozwoju w równoległych kulturach, widzimy wyraźnie, że w hodowlach kłóconych ilość żywych komórek jest znacznie większa (50% do 100%), aniżeli w hodowlach pozostających w spokoju, a jednak brak tam wszelkiej proteolizy, albo jest ona znacznie słabsza, aniżeli w odpowiedniej kulturze niekłóconej (doświadczenie trzecie). Zauważyć wreszcie trzeba, że równość stężeń H° w równoległych kulturach wyklucza jakikolwiek wpływ odmienny tego czynnika na proteolizę.

Z doświadczeń powyższych wynika, że u *Bact. prodigiosum* niema właściwego wydzielania proteazy z żywej komórki; wydostaje się ona z organizmu wyłącznie po jego śmierci.

Charakter związku enzymu z żywą komórką pozostaje niewyjaśniony: Euler, (2 str. 9), Pałładin (14) (dla innych enzymów) przypuszczają, że zachodzi tu związek typu raczej chemicznego; Oppenheimer (13 str. 413) sądzi natomiast, że zachodzi tu związek o charakterze raczej fizyko-chemicznym — pewien układ kolloidalny pomiędzy enzymem-kolloidem i kolloidami zarodzi.

W związku z tem wspomniani autorzy Oppenheimer (13 str. 407) i Euler (2 cz. II str. 571) nie uważają, aby u bakteryj istniała zdolność właściwego wydzielania, sekrecji, proteazy; pojawianie się enzymu proteolitycznego nazewnątrz komórki zachodzi skutkiem uszkodzenia czy też śmierci organizmu.

Pogląd ten, zdaje się, nie miał podstaw doświadczalnych; opierał się raczej na obserwacji, że nawet wśród bakteryj hydrolizujących żelatynę zdolność proteolityczna nie występuje odrazu, ale dopiero z czasem; utwierdzał być może także fakt, że u drobnoustrojów lepiej poznanych, większość enzymów (saccharaza, zymaza, i inne) nie może wydostać się z komórki za jej życia.

W nowszych czasach pogląd ten został zakwestjonowany. Janke i Holzer, (8,9) porównywując działanie proteolityczne kultur normalnych i osłabionych zapomocą chloroformu, wskazują, że o ile u bakteryj, nierozpuszczających żelatyny *(Bact. Coli, Bact. putidum)*, jedynie komórki osłabione, niezdolne do rozmnażania, działają proteolitycznie, to u bakteryj, rozpuszczających

żelatynę *(Bact. fluorescens, Bact. prodigiosum)*, również i komórki zdrowe, normalne, hydrolizują żelatynę. Wydzielanie się proteazy podają także w krótkiej wzmiance Virtanen i Tarnauen (21): przesącz młodej (15—20-o godzinnej) hodowli *Bact. fluorescens*, gdzie podług autorów nie może być mowy o autolizie, wywołuje hydrolizę kazeiny i żelatyny. Podług tych autorów zachodziłoby tu prawdziwe wydzielanie się proteazy.

Tymczasem Gorbach (6), badając występowanie proteazy w związku z rozwojem kultury *Bact. pyocyaneum*, stwierdza, że dopiero martwe bakterje wyzwalają enzym proteolityczny.

Wyniki pracy niniejszej zgodne są z rezultatami Gorbach'a: u *Bact. prodigiosum* niema, przynajmniej w warunkach doświadczalnych, właściwego wydzielania proteazy z żywej komórki; wydostaje się ona z organizmu dopiero i jedynie po jego śmierci.

Wpływ toluolu, eteru, chloroformu na wyzwalanie proteazy u Bact. Prodigiosum.

Ciała organiczne jak toluol, eter, chloroform i t. p. często są stosowane przy otrzymywaniu enzymów z hodowli. Pod wpływem tych ciał komórka ulega zniszczeniu, a enzym uwalnia się. Mechanizm tego działania nie jest wyjaśniony: być może zmienia się tu przepuszczalność błony zarodziowej, co umożliwia wydostanie się enzymu, albo też struktura komórki ulega zniszczeniu i enzym, jako jeden z produktów rozpadu, wydostaje się nazewnątrz.

Z doświadczeń, podanych w tablicy 1, a osobliwie w 2-ej, nie widać, ażeby toluol wpływał na wyzwalanie się proteazy. Można jednak przypuszczać, że wyzwalanie enzymu zachodzi, ale zbyt słabo, ażeby można to stwierdzić zapomocą hydrolizy żelatyny.

Dla wyjaśnienia, czy pod wpływem toluolu, eteru, chloroformu, proteaza wyzwala się z komórki, użyto kultur zagęszczonych na drodze wirowania.

W tablicy 3-ej podano doświadczenia przeprowadzone z tuluolem.

Hodowle wyjściowe, użyte do tych badań, były młode; widać to ze stopnia rozwoju (5,3 i 12,8 milj. w 0,1 cm^3), również i z braku wszelkiego zabarwienia w hodowli.

Po zagęszczeniu hodowle zawierały: w 1-em doświadczeniu 15,9 i 53,0 miljonów; w 2-giem — 76,0 i 153,6 miljonów komórek w tejże objętości.

TABLICA 3.

Wpływ toluolu na wyzwalanie się proteazy u *Bact. prodigiosum.*

(Influence du toluol sur la libération de la protéase chez *Bact. prodigiosum*)

początkowe pH (pH initial)	=5.3		początkowe pH (pH initial)	=5.2	
końcowe pH (pH final)	=6.4		końcowe pH (pH final)	=6.55	
	Ilość ż. bakt. (Nombre de bact. viv.)	Prot.		Ilość ż bakt. (Nombre de bact viv.)	Prot.
Kult. wyjściowa (Cult. initiale)	5.3	—	Kult. wyjściowa (Cult. initiale)	12.8	—
Kult. zagęszczona (Cult. multipliée)	15.9	—	Kult. zagęszczona (Cult. multipliée)	76.8	—
" " " "	53.0	—	" " " "	153.6	—

Jeżeli w hodowli normalnej w fazie maksymalnego rozwoju ilość żywych bakteryj nie przekracza 35 milj. w 0,1 cm³ kultury, to po zagęszczeniu ilość komórek w porównaniu z tą fazą wzrosła 2-u — 5-o krotnie. Pomimo to hodowla po zabiciu komórek toluolem nie wykazała żadnych własności proteolitycznych.

Podobnie jak toluol działa eter i chloroform, jak to widać z tablicy 4-ej.

Młoda kultura wyjściowa liczyła 9 milj. bakteryj w 0,1 cm³ hodowli. 12-krotne zagęszczenie zapomocą wirowania podniosło

TABLICA 4

Porównanie działania toluolu, eteru i chloroformu na wyzwalanie proteazy u *Bact prodigiosum.*

(Comparaison de l'action du toluol, de l'éthèr et du chloroforme sur la libération de la protéase chez *Bact. prodigiosum.*

pH: początkowe (initial) = 5.50;		końcowe (final) = 6.7	
Hodowla zagęszczona 12-o krotnie = 108 . 10⁶ ż. bakt. (culture multipliée 12 fois = " bact. viv.)			
	+ toluol	+chloroform(e)	+ eter (éthèr)
Prot po 2 dniach (au bout de . . . jours)	—	—	—
" 5 "	—	—	—

zawartość komórek do 108 miljonów. Do odpowiednich porcyj dodawano toluolu, eteru, chloroformu w ilości 2—5%; zabitą ho-

dowlę przetrzymywano w $t^0 = 22^0$ w ciągu 5 dni; po ponownem odwirowaniu przenoszono bezkomórkowy płyn jak zwykle na żelatynę.

Tu jak i w poprzednich doświadczeniach, pomimo że ilość bakteryj jest trzykrotnie większa, aniżeli w okresie najsilniejszego rozwoju w warunkach normalnych, nie można stwierdzić żadnych własności proteolitycznych.

Tak więc żywa komórka *Bact. prodigiosum,* poddana działaniu eteru, chloroformu czy toluolu, nie hydrolizuje żelatyny; dowodzi to, że proteaza w tych warunkach nie wyzwala się z komórki. Enzym ulega widocznej inaktywacji, czy nawet zniszczeniu. Zrozumiałym się też staje brak autolizy w tych warunkach: hodowla w warunkach normalnych po upływie kilku dni wyraźnie się przejaśnia pod wpływem hydrolizujących enzymów, osobliwie proteaz; kultura młoda, zabita toluolem, eterem czy chloroformem pozostaje mętną przez szereg tygodni.

Wpływ środowiska: stężenia H° i fosforanów na zdolność proteolityczną i rozwój Bact. prodigiosum.

Enzymy trzeba uważać za produkt przemiany materji wewnątrz organizmu. Oppenheimer w 2-em wydaniu wyżej cytowanego: „Fermente und ihre Wirkungen" podaje (str. 420): „Komórki dobrze odżywiane tworzą silne fermenty". Czy można jednak zmienić zawartość enzymu działaniem czynnika zewnętrznego niezależnie od ogólnej przemiany materji w organizmie?

Podług Merrill'a i Clark'a (10) można u *Bacillus proteus-vulgaris* zapomocą soli Mg i Ca zwiększyć zasób proteazy („żelatynazy" autorów) niezależnie od wzrostu komórki. Zdaniem jednak E. Wilson (17) sole te u *Bact. pyocyaneum* potęgują rozwój bakterji i tylko dzięki przyrostowi komórek zwiększa się ogólna ilość proteazy.

Z badań natomiast Gorbach'a (6) nad tąże bakterją wynika, że choć na innej drodze można jednak podnieść zawartość proteazy niezależnie od wzrostu komórki. Podług tego autora „tworzeniu się" proteazy sprzyjają środowiska słabo kwaśne, natomiast wzrostowi komórki — środowiska obojętne i słabo zasadowe.

W pracy niniejszej zbadano wpływ stężenia H° i fosforanów K na zdolność proteolityczną i rozwój hodowli *Bact. prodigiosum.*

I. *Wpływ stężeń H°.* Badania przeprowadzono w pożywkach peptonowych o pH zmiennem w czasie rozwoju hodowli, albo

też o pH bardziej stałem wskutek dodawania fosforanów K jako regulatorów kwasowości.

a. *Hodowle o pH zmiennem.* Serję zupełnie podobnych pożywek peptonowych o różnem pH początkowem zakażano w identyczny sposób. W określonych odstępach czasu pobierano jednocześnie ze wszystkich hodowli próbki, w których określano: pH, stopień rozwoju kultury, a po dodaniu toluolu, jej zdolność proteolityczną.

Tablica 5-a przedstawia jedną z licznych seryj, przeprowadzonych w ten sposób.

TABLICA 5.

Wpływ pH na zdolność proteolityczną i rozwój hodowli *Bact prodigiosum* (pH — zmienne)

(Influence du pH sur la faculté protéolytique et le développement de la culture de *Bact prodigiosum*). (pH — variable)

N	Początkowe p H (pH initial)		Obserwacja po... dniach (observation au bout de.... jours)							
			1	2	3	4	6	8	11	17
	4.45	p H	4.58	5.25	6.02	6.50	7.20	7.65	8.35	-
1		R	2.4	7.9	22.1	27.2	13.4	7.0	3.3	—
		Prot.	—	—	—	0.2	2.0	2.7	2.5	—
	5.50	p H	6.02	6.69	6.98	7.05	7.65	7.85	—	—
2		R	8.1	24.2	40.2	44.2	16.2	8.3	—	—
		Prot.	—	—	—	0.2	2.1	2.7	—	—
	6.75	p H	6.93	7.25	7.40	7.50	7.80	7.95	8.47	—
3		R	11.6	29.1	50.2	48.8	15.1	10.4	3.6	—
		Prot.	—	—	—	0.1	2.2	2.4	2.3	—
	7.56	p H	7.60	7.60	7.62	7.65	7.9	8.12	—	—
4		R	10.6	32.0	51.6	50.2	20.0	12.1	—	—
		Prot.	—	—	—	—	1.5	1.8	—	—
	8.02	p H	7.82	7.75	7.70	7.75	8.00	8.12	8.50	—
5		R	6.7	23.4	41.3	46.1	22.0	15.5	6.1	—
		Prot.	—	—	—	—	0.9	1.2	1.4	—
	8.60	p H	8.50	8.32	7.95	7.90	8.10	8.25	8.42	8.45
6		R	+	8.1	18.9	25.3	29.0	34.6	38.1	13.3
		Prot.	—	—	—	—	—	—	0.2	1.0

Stężenie H° w hodowlach jest zmienne: pod wpływem bakteryj pożywki kwaśne stają się zasadowemi; pożywki zasadowe ulegają zakwaszeniu chociażby przejściowemu.

W pożywkach początkowo bardziej kwaśnych (pH = 4,45) rozwój bakterji jest stosunkowo słaby (maks. = 27,2 milj.): w po-

żywkach początkowo mniej kwaśnych, prawie obojętnej i słabo zasadowej (pH = 5.50, 6.75, 7.56), rozwój występuje coraz silniej (maks. = 44.2, 48.8, 51.6 milj.); pożywki o większej zasadowości początkowej (pH = 8.02 i 8.60) ujawniają znowu wzrost coraz słabszy (maks. = 46.1, 38.1 milj.).

Tymczasem proteoliza przebiega odwrotnie: właśnie w ośrodkach o większej kwasowości początkowej (pH = 4.45), gdzie rozwój bakteryj jest słabszy, proteoliza występuje najsilniej (2.7 mm.); wraz z obniżaniem się kwasowości początkowej (pH = 5.50, 6.75, 7.56, 8.02), jakkolwiek rozwój hodowli rośnie, to zdolność proteolityczna wyraźnie słabnie (2.7, 2.4, 1.8, 1.4 mm.). W pożywkach silniej zasadowych początkowo (pH = 8.60) zdolność proteolityczna występuje późno i słabo (1.0 mm).

Jeżeli porównać doświadczenia Nr. 1 i 4, to widać:

Nr. 1: pH = 4.45; maks. rozwoju = 27.2 milj.; maks. zdolności proteolit. wynosi 2.7 mm

Nr. 4: pH = 7.56; maks. rozwoju = 51.6 milj.; maks. zdolności proteolit. wynosi 1.8 mm

Gdyby zdolność proteolityczna przebiegała równolegle z rozwojem bakterji, to w doświadczeniu Nr. 4 przy rozwoju prawie dwukrotnie większem, zdolność proteolityczna powinnaby się również wyrazić liczbą prawie dwukrotnie większą, a więc 5.1; w rzeczywistości jest ona prawie trzykrotnie słabsza, co wskazuje, że rozwój bakterji i jej zdolność proteolityczna przebiegają jakby niezależnie od siebie.

Podobne doświadczenia przeprowadzono również z hodowlami *Bact. prodigiosum* w obecności fosforanów K, jako regulatorów kwasowości.

b. *Hodowle o stałem pH.* W celu utrzymania w hodowli stężenia H° bardziej stałego, dodawano do pożywki peptonowej mieszaninę pierwszo- i drugorzędowego fosforanu K w stężeniu 1/1 mol. Skład pożywki przedstawiał się jak następuje:

8,3 cm³ 1/1 mol. roztw. ($KH_2PO_4+K_2HPO_4$) + 10 cm³. 10% roztw. peptonu + 81,7 cm³ H_2O. Razem 100 cm³ płynu.

Stężenie fosforanów K w pożywce wynosiło 1/12 mol. Stosunek pierwszo — do drugorzędowego fosforanu ulegał zmianie; zmieniało się też odpowiednio i pH pożywki. Wahania pH wynosiły: 5.50 — 8.0.

W tablicy 6-ej podano jedną serję takich doświadczeń.

Podobnie jak w poprzedniej serji i tu stwierdzić można, że jakkolwiek rozwój hodowli słabiej zachodzi w pożywkach kwaśnych (pH = 5.45), to jednak proteoliza silniej tu występuje (maks. pro-

TABLICA

Wpływ pH na zdolność proteolityczną i rozwój hodowli *Bact. prodigiosum* (pH - stałe)

(Influence du pH sur la faculté protéolytique et le développement de la culture de *Bact. prodigiosum*) (pH — constant.)

N	początkowe pH. (pH. initial)		Obserwacja po ..... dniach (Observation au bout de ..... jours)				
			3	5	7	10	15
1	5.45	pH	5.50	5.58	5.80	5.95	6 35
		R	15.0	28 2	46.2	31.0	13.4
		Prot.	—	1.8	2.7	3.6	4.1
2	5.70	pH	5.70	5 80	5.85	5.97	6.55
		R	25.6	37.0	45.3	30.0	9.6
		Prot.	—	1.7	2.8	3. 8	4.0
3	6.20	pH	6.20	6.33	6.40	6 45	7.00
		R	32.1	49 5	56.1	23.0	16.4
		Prot.	0.2	2.0	2.8	3.6	3.7
4	6 75	pH	6.80	6.88	6.97	7.05	7 65
		R	39.7	62.7	43.3	25.6	20.0
		Prot.	0.4	1.9	2.4	3.0	2.8
5	7.50	pH	7.55	7.72	7.85	7.98	8.40
			18 9	24.3	66.9	45.5	25 0
		Prot.	—	—	—	—	—

teolizy = 4.1 mm.), aniżeli w pożywkach naprz. prawie obojętnych (maks. proteolizy = 3.0 mm.), gdzie rozwój bakteryj jest znacznie silniejszy; w pożywkach słabo zasadowych (pH = 7.50) — brak nawet zupełnie zdolności proteolizowania pomimo stosunkowo bardzo silnego rozwoju hodowli.

W przytoczonej tu serji doświadczeń uderza to, że zdolność proteolityczna występuje przed osiągnięciem największego rozwoju hodowli. Czy musi to być jednak sekrecja enzymu? Można to przecież przypisać zamieraniu poszczególnych komórek i stopniowemu nagromadzaniu się proteazy w kulturze, zjawisko, którego oczekiwać nawet należy przy zbyt powolnym rozwoju hodowli.

Reasumując wyniki doświadczeń nad wpływem stężeń H° na rozwój i zdolność proteolityczną *Bact. prodigiosum*, stwierdzić należy, że o ile zdolność proteolityczna osobliwie silnie występuje w pożywkach kwaśnych (pH = 4.5 — 6.0), to rozwój hodowli, odwrotnie, znacznie intensywniej zachodzi w pożywkach prawie obojętnych i słabo zasadowych (pH — 6.7 — 8.0).

2. *Wpływ stężeń fosforanów K.* Podobnie jak zapomocą stężeń H° można również i zapomocą odpowiednich stężeń fosforanów K wyodrębnić wpływ tego czynnika na wzrost i zdolność proteolityczną hodowli.

Pożywki peptonowe z fosforanami K przygotowywano jak i poprzednio, ale stężenie fosforanów w pożywce było różne i wy-

TABLICA 7

Wpływ stężeń fosforanów K na zdolność proteolityczną i rozwój hodowli *Bact. prodigiosum*.

(Influence de concentrations des phosphates de K sur la faculté protéolytique et le développement de la culture de *Bact. prodigiosum*).

N	Stężenie fosforanów K Conc des phosphates K	Począt. pH pH initial		Obserwacja po ..... dniach) (observation au bout de ..... jours)						
				1	2	3	5	7	10	14
1	1/8 mol.	6.30	pH	6.30	6.30	6.36	6.42	6.52	6.58	6.58
			R	15 4	49.0	74.0	26.0	24.0	22.4	19.2
			Prot	—	—	—	—	—	0.1	0.9
2	1/12 mol.	6.30	pH	6.30	6.32	6 36	6.52	6.62	6.64	6.65
			R	16.0	43.0	72.0	26.0	24.0	28.0	24.3
			Prot.	—	—	—	0.5	1.0	1.2	2.0
3	1/15 mol.	6.35	pH	6.35	6.37	6.43	6.62	6.85	6.93	7.05
			R	16.0	54.0	50.0	26.5	12.1	9.0	20.0
			Prot.	—	—	—	0.8	1.4	1.8	2.2
4	—	5.30	pH	5.50	6.47	6.88	7.40	7.58	7.63	7.68
			R	2.9	24.0	21.0	4.5	2.6	9.0	11.5
			Prot	—	—	+	0.5	1.1	1.2	1.7

nosiło 1/8, 1/12, 1/15 mol.; otrzymane pożywki miały pH bardzo zbliżone. Dla porównania użyto także pożywki peptonowej bez fosforanów, kwaśniejszej początkowo, ażeby w następstwie okres intensywnego rozwoju bakterji przebiegał pod względem pH w warunkach możliwie zbliżonych do pozostałych doświadczeń.

Różnice pomiędzy pH początkowem i końcowem nie przekraczają w hodowlach z fosforanami 0.7; w hodowli bez fosforanów różnice te są oczywiście większe, ale okres najsilniejszego rozwoju przebiega przy pH = 6.20 — 6.90.

Zestawiając maks. rozwoju *Bact. prodigiosum* z odpowiednią wartością maksymalnej zdolności proteolitycznej, otrzymujemy dla powyższych czterech doświadczeń:

Poż. pept. bez fosfor.: rozwój — 24.0 milj. bakt.; maks. proteolizy — 1.7 mm.
„ „ + fosf. 1/15mol. „ — 54.0 „ „ „ „ — 2.2 „
„ „ + fosf 1/12 „ „ — 72 0 „ „ „ „ . 2 0 „
„ „ + fosf. 1/8 „ „ — 74.0 „ „ „ „ . 0.9 „

Obecność więc fosforanów K w pożywce działa wyraźnie pobudzająco na rozwój *Bact. prodigiosum;* natomiast wybitnie hamująco — na zdolność proteolityczną; jeżeli porównać wpływ fosforanów K o stężeniu 1/15 mol. i 1/8 mol., a więc prawie podwójnej ilości, to rozwój w drugim wypadku wzmaga się prawie o 50%, natomiast zdolność proteolityczna zmniejsza się o przeszło 300%.

W pracy niniejszej nie oznaczano bezpośrednio martwych komórek; wnosząc jednak z ubytku żywych komórek w hodowlach w czasie (dośw. Nr. 1 i 3) pomiędzy chwilą ich maksymalnego rozwoju i największego zaniku, widzimy, że w tym okresie w pożywkach z fosforanami bardziej stężonemi zamieranie bakteryj silniej zachodzi aniżeli w obecności fosforanów mniej stężonych. Pomimo silniejszego zamierania komórek — proteoliza jest tu jednak wybitnie słabsza (0.9 mm).

Nie jest à priori wykluczonem, że samo tworzenie się enzymu jest może zahamowane pod wpływem fosforanów; ale być może także, że zachodzi tu inaktywacja proteazy naprz. wskutek zmiany przepuszczalności błony komórkowej, która to zmiana uniemożliwia wydostanie się enzymu nazewnątrz. Podobnie jak toluol, eter, chloroform działa na proteazę raczej pośrednio, niszcząc strukturę komórki, podobnie i tu można przypuszczać, że osłabienie enzymu pod wpływem fosforanów ma charakter pośredni.

Zauważyć wreszcie należy, że doświadczenia podane w tablicy Nr. 7 bynajmniej nie oznaczają, aby stosunki, stwierdzone po 14-u dniach, nie miały ulec zmianie po dłuższym okresie obserwacji: komórki zamierają, proteaza nagromadza się w hodowli i stąd zdolność proteolityczna stopniowo wzrastać może.

Badania nad wpływem stężeń H° zarówno jak i fosforanów K wskazują, że rozwój i proteoliza u *Bact. prodigiosum* przebiegają w znacznym stopniu niezależnie od siebie: zapomocą odpowiednich stężeń H° (pH = 4.5 — 6.0) można spotęgować zdolność proteolityczną bakterji, nie potęgując rozwoju komórki i odwrotnie, zapomocą innych stężeń (pH = 7.0 — 8.0) można wzmóc rozwój komórki, nie zwiększając jej zdolności proteolitycznej.

Zauważyć trzeba, że, jakto wynika z mojej pracy (11) nad proteolizą, aktywność proteazy większa jest właśnie w ośrodkach zasadowych. Jeżeli zaś w hodowli kwaśnej zdolność proteolityczna pomimo to silniej występuje, to przypisać ją należy obfitszemu występowaniu enzymu w hodowli.

Podobnie różny wpływ na rozwój i zdolnośćć proteolityczną *Bact. prodigiosum* wywierają fosforany K: naogół pobudzają one wyraźnie rozwój bakterji, osłabiając jednocześnie jej zdolność proteolityczną.

Streszczenie wyników i wnioski.

Badania zdolności proteolitycznej u *Bact. prodigiosum* hodowanego w pożywce peptonowej pozwalają ustalić następujące fakty:

1) Zdolność proteolityczna pojawia się w kulturze w okresie maksymalnego rozwoju hodowli wraz z zamieraniem komórek; zdolność ta wzmaga się wraz z wzrostem procesu zamierania bakteryj.

2) W hodowli młodej, gdzie brak martwych komórek, brak również i wszelkiej zdolności proteolitycznej.

3) Toluol, eter, chloroform dodane do młodej hodowli nie powodują wyzwalania się proteazy z komórki; ciała te, niszcząc bakterję, niszczą prawdopodobnie i zawarty w nich enzym.

4) Zdolność proteolityczna silniej występuje w środowiskach kwaśnych (pH = 4.5 — 6.0), aniżeli w środowiskach obojętnych i zasadowych (pH = 7.0 — 8.0); natomiast wzrost bakterji, odwrotnie, bujniej zachodzi w pożywkach obojętnych i słabo zasadowych aniżeli w kwaśnych.

5) Obecność fosforanów K sprzyja rozwojowi, hamuje zaś jej zdolność proteolityczną.

Na podstawie powyższych wyników można ustalić następujące wnioski:

1. Proteaza u *Bact. prodigiosum* występuje nazewnątrz komórki dopiero i jedynie po śmierci bakterji.

2. Zdolność proteolityczna i rozwój hodowli przebiegają niezależnie od siebie.

Praca niniejsza rozpoczęta w Zakładzie Fizjologji Roślin Uniwersytetu Warszawskiego ukończona została w Zakładzie Botanicznym S. G. G. W. Na tym miejscu składam serdeczne podziękowanie prof. K. Bassalikowi za jego żywe interesowanie się przebiegiem pracy i liczne, cenne wskazówki; prawdziwą wdzięczność wyrażam również prof. S. Dziubałtowskiemu, którego życzliwość umożliwiła mi przeprowadzenie powyższych badań.

LITERATURA*).

1. Dernby, K. G. Studien über d. proteolyt. Enzyme d. Hefe u. ihre Beziehung zu d. Autolyse. Biochem. Zeitschr. **81**, 107, 1917.
2. Euler, H. von. Chemie d. Enzyme. München 1925.
3. Fischer, E. A. Contribution to the study of the veget. proteases. Biochem. Jl. **13**. 124. 1919.
4. Glinka-Tschernowitz, H. Über d. Stickstoffumsatz bei Bac. mycoides. Biochem. Zeitschr. **206**. 308. 1929.
5. Gorini, Grassmann u. Schleich. cyt. przez Grassmann'a (7).
6. Gorbach, G. Zur Kenntniss d. Bakterienproteasen. Arch. f. Mikrobiologie **1**. 537. 1930.
7. Grassmann, W. Proteolytische Enzyme des Tier — u. Pflanzenreiches. S. 129 — 167 in: Ergebnisse d. Enzymforschung. F. F. Nord u. Weidenhagen. Leipzig 1932.
8. Janke, Alex. u. Holzer Hans. Probleme d. Stickstoffkreislaufs. Biochem. Zeitschr. **213**. 142. 1929.
9. „ **226**. 243. 1930.
10. Merrill, A. a. Clark, M. Some conditions affecting the production of gelatinase by Proteus bacteria. Jour. Bacteriol. **15**. 267. 1928.
11. Moycho, W. Sur l'action des enzymes protéolytiques bacteriennes, C. R. Ac. Sc. **187**. 681. 1928.
12. Moycho, W. Badania nad Bact. prodigiosum. Acta Soc. Bot. Poloniae **7**. 337. 1930.
13. Oppenheimer, C. Fermente u. ihre Wirkungen. Leipzig 1925.
14. Pałładin, W. u. Frl. Manskaja, S. Die Entstehung d. Peroxydase in d. Pflanzen. Biochem. Zeitschr. **135**. 142. 1923.
15. Tiraboschi, C. La proteolisi negli Schizomiceti ed Ifomiceti. Giornal d. Sociètà di Igiene. Milano 1908 p. 45.
16. Utkina-Ljubowzowa, X. u. Steppuhn, O. Über d. Identität d. Zellen-proteasen verschiedensten Ursprungs. Biochem. Zeitschr. **220**. 41. 1930.
17. Wilson, Elisabeth D. Studies in bacterial proteases. The relation of protease production to the culture medium. Jour. Bacteriol. **20**. 41. 1930.
18. Willstätter, R., Lowry, CH. D. u. Schneider, K. Inwertinanreichung in der Hefe. Zeitschr. f. Physiol. Chemie **146**. 158. 1925.
19. Willstätter, R. u. Grassmann, W. Über d. Proteasen der Hefen. Zeitschr. f. Physiol. Chemie **153**. 250. 1926.
20. Vines, S. H. Szereg prac w Ann. of. Botany t. 16—21. 1902—1910.
21. Virtanen, L. u. Tarnauen, J. Das proteolyt. Enzymstudien der Gelatino-verflüssigenden Bakterien. Naturwissenschaft **19**. 397. 1931.

---

*) Literaturę uwzględniono głównie nowszą, od r. 1925; starszą znaleźć można u cyt. Oppenheimer'a.

RÉSUMÉ.

Dans le travail présent on a cherché à résoudre deux problèmes:

1) La libération de la protéase chez *Bact. prodigiosum* est-elle un processus vital ou se produit-elle après la mort;

2) Peut-on par le changement du milieu consistant en la concentration en H° ou des phosphates de K faire varier la propriété protéolytique du *Bact. prodigiosum* indépendamment de sa croissance.

On mettait en évidence la présence de la protéase dans la culture à l'aide de l'hydrolyse de la gélatine. On déposait une dose (de 0,3 cm³) de culture à la surface de la gélatine, contenue dans un tube à essai et la hauteur de la gélatine liquéfiée indiquait la quantité de l'enzyme dans la culture. On supprimait l'influence des cellules vivantes par l'introduction du toluol ou par la centrifugation.

On cultivait les bactéries dans un milieu peptoné (1% de peptone Witte) additionné de 0,5% de NaCl et de la quantité convenable de NaOH n/1 ou HCl n/1.

On appréciait le développement des cultures en évaluant le nombre des cellules vivantes. On prélevait dans ce bût dans certains intervalles de temps les échantillons des cultures et après les avoir convenablement dilués, on les introduisait dans la gélatine liquide de 12% dans les boîtes de Petri. Au bout de 1—2 jours de séjour à la température de 23° C. on comptait les colonies bactériennes sur les plaques de gélatine solidifiée. Les chiffres fournis dans la rubrique R des tables, expriment en millions les quantités des bactéries dans 0,1 cm³ de culture. L'augmentation ou la diminution du nombre des bactéries indiquait le développement ou la régression de la culture.

Cette méthode est tout à fait satisfaisante pour le premier stade du développement, lorsque les bactéries sont en train de se multiplier incessamment et la quantité des cellules mortes est relativement minime; mais la méthode doit être moins précise pour la deuxième période du développement, où la quantité des cellules mortes domine le nombre des cellules nouvellement parues.

Les recherches fûrent exécutées sur deux souches de *Bact. prodigiosum*, marquées par les lettres M. et Kr. Les résultats tournis dans ce travail concernent surtout la souche M.

1) *Apparition de la protéase dans la culture de Bact. prodigiosum.* Les expériences de la table Nr. 1 ainsi que les courbes N. 68, 69, 70 montrent, que la protéase n'apparaît point dans la première période du développement de la culture; à ce stade les cellules se divisent abondamment et le nombre des bactéries mortes est négligeable. Par contre la protéase commence à se manifester au début de la période de la régression de la culture, période caractérisée en même temps par une forte déperdition des cellules.

2) Les expériences de la table Nr. 2 confirment le fait que *la bactérie ne sécréte pas de protéase pendant sa vie, mais la libére après sa mort.* Des deux cultures identiques l'une était laissée au repos, l'autre était souvent secouée. A la suite de l'accés plus facile de l'oxygène de l'air, la culture secouée se développait plus abondamment (50% — 150%), mais la propriété protéolytique ne s'y manifestait point; par contre cette propriété apparaissait nettement dans les cultures au repos, où le développement était moins fort. (Dans l'expérience N. 3 la protéolyse existe aussi dans la culture secouée, mais nettement plus faible que dans la culture correspondante au repos). L'absence de coloration dans les cultures remuées (exception faite pour l'expérience N. 3) indique l'absence des cellules mortes dans ces cultures.

3) *Influence du toluol, de l'éthèr, du chloroforme sur la libération de la protéase.* On se servait pour ces expériences de cultures jeunes (l'absence de coloration) et artificiellement multipliées par la centrifugation. Bien que la quantité des cellules dans les cultures ainsi obtenues dépasse trois fois la quantité des cellules des cultures normales au développement maximal, l'addition du toluol, de l'éthèr et du chloroforme ne provoque pas malgré cela de la libération de l'enzyme protéolytique. Les expériences de la table Nr. 3 ne démontrent en effet aucune faculté protéolytique.

4) *Influence de la concentration en H^0.* La table N. 5 montre une série de cultures en présence des différents pH initiaux; le pH de chaque culture varie sous l'influence de la bactérie: ainsi les cultures acides deviennent alcalines et les alcalines subissent une acidification passagère.

L'influence du pH sur le développement de la culture est différente de celle qu'elle produit sur la propriété protéolytique. La faculté protéolytique malgré le développement plus faible de la bactérie se manifeste de façon plus forte dans le milieu acide (pH initial = 4,5 — 6.0), que dans le milieu neûtre ou légérement alca-

lin (pH = 7,0 — 8,0); dans ces deux derniers milieux le développement des bactéries se produit par contre plus fortement.

On peut constater l'action semblable du pH dans les milieux tamponnés par les phosphates de K. (K_2HPO_4 + KH_2PO_4 à la concentration de 1/12 mol. dans le substratum).

5) *Influence des phosphates de K.* On peut démontrer également l'influence différente des phosphates de K. sur le développement des bactéries d'un côté et la faculté protéolytique de l'autre.

Dans les expériences de la table N. 7 la concentration des phosphates de K. est de 1/8, 1/12, 1/15 mol. à pH = 6.30 — 6.35.

En comparant les expériences N. 1 et 3, on constate que les phosphates plus concentrés renforcent le développement des cultures (+ 50%), mais affaiblissent manifestement la propriété protéolytique de ces cultures (+300%).

Les résultats énumérés ci-dessus permettent de tirer des conclusions suivantes:

1. La protéase de Bact. prodigiosum se manifeste en dehors de la cellule exclusivement après la mort de la bactérie;

2. La faculté protéolytique et le développement de la bactérie sont indépendants l'une de l'autre.