ANTONI KOZŁOWSKI

(Zakład Botaniki Ogólnej, Poznań).

CHROMOGEN RESPIRACYJNY W NASIONACH GROCHU (*PISUM SATIVUM* L.).

A respiratory chromogen in the seeds of pea
(*Pisum sativum* L.).

(Wpłynęło 27.XII. 1936).

W S T Ę P.

W procesach oksydacyjno - redukcyjnych pośredniczą w tkankach roślinnych nie tylko takie substancje, jak cysteina wzgl. glutation, lecz także pewne związki, zdolne do wytwarzania barwików czyli chromogeny lub też związki barwne, które Palladin określił ogólnie jako barwiki respiracyjne (Atmungspigmente). Substancje te, dzięki łatwemu przyłączeniu i uwalnianiu czynnego wodoru, przyspieszają pewne procesy przemiany materii, jakie bardzo wyraźnie zaznaczają się w przypadkach anaerobijnego oddychania, jak np., w procesach fermentacji alkoholowej i kwasu mlekowego, a więc w pierwszych zasadniczych fazach przemiany heksoz także w procesie aerobijnego oddychania u roślin wyższych.

Jak już w poprzedniej notatce ¹⁾ zaznaczono, w nasionach grochu występuje, obok ksantofilu, chromogen bezbarwny, który łatwo ulega utlenieniu (odwodornieniu) na barwik żółty a w końcu na czerwony i z powrotem da się zredukować na związek bezbarwny. Wobec tej łatwo odwracalnej przemiany, związek ów bierze niezawodnie czynny udział w procesach

¹⁾ Acta Soc. Bot. Pol. 12. 275 (1935).

wymiany wodoru i dzięki temu może być zaliczony do chromogenów respiracyjnych. W kiełkujących nasionach znajduje się on zarówno w postaci bezbarwnej, jak i żółto zabarwionej; widocznie więc układa się tam pewien stan równowagi według następującego schematu:

Czynny wodór, potrzebny do redukcji barwika żółtego, pobierany jest od pewnych produktów rozkładu glukozy i zostaje odstępowany przez tak utworzony chromogen odpowiednim innym substancjom. Zachodzi więc tu proces analogiczny, jak w przypadku działania błękitu metylenowego, który pod wpływem wodoru, pobranego od pewnych składników treści komórki, przechodzi w bezbarwny leukozwiązek, a ten, odstępując ów nabyty wodór innym substancjom organicznym lub tlenowi powietrza, odtwarza z powrotem barwik niebieski.

Grupa chromoforowa chromogenu respiracyjnego nasion grochu jest bardzo nietrwała i ulega z biegiem czasu pewnym nieodwracalnym zmianom już w samych nasionach, jak o tym można wnioskować z faktu, że o wiele więcej można go wyizolować w formie pierwotnej z dojrzałych nasion świeżych, niż ze starych, które już straciły zdolność kiełkowania. To samo zachodzi też podczas wyciągania owego związku, wskutek czego ekstrakt stary nie da chromogenu, któryby można utlenić na barwik czerwony. Związek ów jest glukozydem aromatycznym, niewykazującym cech związków flawonolowych lub flawinowych; struktura chemiczna jego drobiny będzie rozpatrywana później; w niniejszej notatce podane są tylko niektóre szczegóły, dotyczące jego lokalizacji w tkankach, sposobu jego wyizolowania oraz niektórych jego charakterystycznych własności fizyko-chemicznych.

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA.

1. LOKALIZACJA CHROMOGENU RESPIRACYJNEGO W GROCHU.

Związek ów występuje w nasionach tylko w liścieniach; brak go w kielku i w łusce nasion. Pozostaje w liścieniach podczas całego okresu kiełkowania i rozwoju rośliny aż do zupełnego wyczerpania substancji zapasowych. Nie zauważono jego wędrówki do kielka.

Jeśli kiełkowanie nasion wcześniej przerwiemy przez dodanie kilku kropel toluolu do napęczniałych nasion, zawartych w naczyniu niezbyt szczelnie zamkniętym, nastąpi utlenienie chromogenu, wskutek czego powierzchnia liścieni przybierze w ciągu 24—48 godzin barwę różową. Reakcja ta jest znacznie przyspieszana przez światło słoneczne. To samo nastąpi, jeśli napęczniałe nasiona zostawimy w naczyniu szczelnie zamkniętym. W ciągu pierwszych trzech dni rozwija się energicznie alkoholowa fermentacja a następnie zaczną działać bakterie gnilne. Po upływie 4—5 dni nasiona wykażą zabarwienie popielato-niebieskie ale tylko na tych częściach liścieni, które nie były zanurzone w płynie; jeśli wówczas przepłuczemy nasiona wodą i wystawimy na działanie powietrza, wszystkie ziarna przybiorą barwę popielato-niebieską na całej powierzchni liścieni. I tu również reakcja jest wyraźnie przyspieszana przez światło słoneczne.

Podczas dwutygodniowego rozwoju roślin w ciemności nie zauważono pojawiania się owego chromogenu respiracyjnego ani w pędach ani w korzeniach młodych roślin; jeśli jednak 18-dniowe etiolowane rośliny, trzymane w kulturze piaskowej, wystawiono na działanie światła słonecznego w temperaturze niskiej, już po upływie pięciu dni zdołano wyizolować ów chromogen ale tylko z pędów lecz nie z korzeni. Widocznie do syntezy owego związku jest niezbędne bezpośrednie działanie promieni świetlnych. Stosunkowo najwięcej tej substancji znaleziono w liściach, zwłaszcza w przylistkach, znacznie mniej natomiast w szczytach pędów.

Jeśli rośliny zielone poddamy na świetle głodzeniu a podtrzymamy ich wegetację w kulturach piaskowych przez podlewanie tylko wodą wodociągową, nastąpi stopniowy zanik chlorofilu i zamieranie liści z równoczesnym pojawieniem się barwika czerwonego w przylistkach. Z zamierających liści wyizolowano chromogen niezmieniony. Korzenie pozostawały nadal wolne od owego związku, jakkolwiek zawierały jakiś inny chromogen, który dał się utlenić na barwik żółty lecz nie na czerwony. Z liścieni nasion, zupełnie wyczerpanych z substancji zapasowych w ciągu 8-tygodniowego rozwoju roślin, wyizolowano chromogen zasadniczo niezmieniony lecz zhydrolizowany; widocznie cukier, jaki był z nim związany, został zużyty przez roślinę lub też przez drobnoustroje.

Nie zdołano wykazać obecności owego chromogenu w dojrzewających lecz jeszcze zielonych nasionach; zato znaleziono go w zielonych strąkach. Ten ostatni fakt wskazuje, że owa substancja stoi w stosunku genetycznym z antocjanem, jaki występuje obficie w niektórych odmianach, jak np., w strąkach holenderskiej odmiany *Pisum sativum* Capucijnders vroege Beemster i C. o. Amsterdamsche blauwschak.

2. WYIZOŁOWANIE CHROMOGENU RESPIRACYJNEGO Z NASION GROCHU.

a) Wyciąganie gorącą wodą.

Nasiona zadano podwójną objętością wody wodociągowej i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 18 godzin; potem wsypało je do wrzącej wody i dalsze ogrzewanie przerywano, skoro temperatura wzrosła do 85°—90°. Materiał pozostawiono przez 12 godzin w temperaturze pokojowej, po czym płyn odłano, zakwaszono kwasem octowym i strącono roztworem octanu ołowiu. Filtrat po osadzie, zawierający pewien nadmiar soli ołowiu, zalkalizowano nieznacznie wodorotlenbaru; wypadł żółty osad, który na powietrzu przybrał barwę pomarańczową. Ten roztarto z niedużą ilością 10% kwasu siarkowego. Filtrat po siarczanie ołowiu miał barwę intensywnie czerwoną. Jeśli zamiast kwasu siarkowego użyto kwasu szczawiowego, występowała, w chwili rozcierania osadu ołowiowego, barwa różowo-czerwona, która jednak przechodziła szybko w barwę brudno czerwoną.

W powyższy więc sposób nie udaje się wyciągnąć chromogenu w stanie niezmienionym; zachodzi bowiem bardzo łatwo jego utlenienie częściowo już podczas wyciągania przez czas dłuższy a do reszty po strąceniu go octanem ołowiu. Jeśli zamiast wody wodociągowej, zawierającej nieco żelaza, użyto wody destylowanej a czas wyciągania skrócono do 3 godzin, ekstrakt nie wykazał, po zakwaszeniu kwasem siarkowym, barwy czerwonej, lecz mimo to po rozłożeniu osadu ołowiowego większość chromogenu znaleziono w formie utlenionej. W każdym razie, sposób ów nadaje się do szybkiego stwierdzenia, czy badany materiał zawiera wyżej omawianą substancję.

b) Wyciąganie metanolem.

Napęczniałe nasiona grochu zadano podwójną objętością metanolu i pozostawiono przez 18 godzin w temperaturze pokojowej. Ekstrakt, uwolniony od metanolu przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem, był żółto zabarwiony i nie wykazał barwy czerwonej po ogrzaniu go w obecności 2% kwasu siarkowego lecz dopiero po uprzednim dodaniu kropli 0,01% roztworu chlorku żelaza.

Powyższy przeto sposób nadaje się do wyizolowania chromogenu w stanie naturalnym; lecz także w tym przypadku należy unikać strącania octanem ołowiu. Jeśli bowiem ekstrakt metanolowy zadamy octanem ołowiu i zalkalizujemy wodorotlenkiem baru, wypadnie osad żółty, który na powietrzu przybierze barwę pomarańczową a po rozłożeniu go kwasem siarkowym lub solnym w wodzie czy też w metanolu, da płyn intensywnie czerwono zabarwiony.

3. WŁASNOŚCI FIZYCZNO-CHEMICZNE CHROMOGENU RESPIRACYJNEGO.

Chromogen respiracyjny, wyizolowany z grochu, jest łatwo rozpuszczalny w wodzie i w alkoholu metylowym, trudniej zaś w alkoholu etylowym a wcale nie w eterze. Poddany hydrolizie zapomocą 2% kwasu siarkowego, daje aglukon barwy brunatnej, trudno rozpuszczalny w wodzie, łatwo zaś w alkoholu etylowym, nierozpuszczalny w eterze i wykazujący wszystkie reakcje barwne jego naturalnego glukozydu.

Chromogen wyizolowany z nasion grochu, wykazuje bardzo silne własności redukcyjne; jeśli roztwór jego zadamy kroplą roztworu chlorku żelaza i niezwłocznie kroplą roztworu żelazicyanku potasu lub w porządku odwrotnym, wystąpi obficie błękit Turnbulla.

Wodny roztwór chromogenu, zadany małą ilością 10% kwasu siarkowego i kroplą roztworu chlorku żelaza, przybierze po krótkim zagotowaniu barwę czerwoną, która znika po następnej redukcji zapomocą cynku w obecności 18% kwasu solnego a powraca po odlaniu płynu i pozostawieniu go na powietrzu. Żelazo działa w powyższej reakcji utleniania tylko jako katalizator i nie jest niezbędne do otrzymania barwika czerwonego, który powstaje też w przypadku wyżej wspom-

nianego działania octanu ołowiu a nadto przy działaniu roztworu dwuchromianu potasu na roztwór wodny chromogenu w obecności nieco kwasu siarkowego oraz przez działanie jodu, rozpuszczonego w alkoholu, lub przy pomocy wody bromowej przy reakcji kwaśnej; unikać przy tym należy nadmiaru odczynnika. Barwik czerwony, otrzymany którąkolwiek z powyższych metod, poddany hydrolizie w obecności 2% kwasu siarkowego, daje osad brunatny, który rozpuszcza się w alkoholu, barwiąc go fioletowo-czerwono, a w przeciwstawieniu do barwnego jego glukozydu przechodzi w warstwę alkoholu amyłowego podczas strząsania jego wodnej zawiesiny analogicznie jak to obserwujemy w przypadku antocjaniny przed i po hydrolizie.

STRESZCZENIE.

W zielonych liściach, w strąkach i w dojrzałych nasionach grochu znajduje się chromogen w postaci glukozydu, odznaczający się silnymi własnościami redukcijnymi i odgrywający, dzięki temu, prawdopodobnie bardzo doniosłą rolę w procesach oddychania.

Chromogen ów da się łatwo wykryć dzięki jego łatwemu utlenianiu się na barwik czerwony.

Powstawanie jego w roślinie jest ściśle zależne od bezpośredniego działania światła słonecznego.

SUMMARY.

There was found in the green leaves, green pods and in the ripe seeds of pea a glucoside with a strong reducing property which may play an important part as a respiratory chromogen.

It was extracted from the seeds by means of water at 80—90° C or by means of methanol at room temperature, and was precipitated by means of lead acetate upon an addition of some barium hydroxide; a yellow precipitate thus formed was decomposed by means of a diluted sulfuric or hydrochloric acid in water or in methanol; a filtrate was of a red colour.

A similar pigment was obtained by oxidation of that substance in the presence of traces of iron salts and of 2 per

cent solution of sulfuric acid at a high temperature or by means of iodine, bromine and chromic acid respectively in the presence of 2 per cent sol. of sulfuric acid at room temperature. The red pigment did not pass from its solution in water into a layer of amyl alcohol unless it was first hydrolyzed. Its solution became decolorized by reduction, and regained its former colour upon reoxidation.

The aglucon of the chromogen and of the red pigment was not soluble in water and ether, but quite readily soluble in methyl- and ethyl alcohol; a solution of the former was of a brown-yellow colour but changed to a violet-red upon oxidation which was characteristic for the solution of the latter.

That glucoside was not found in the roots and in the stems of the etiolated plants; its production depends upon an immediate action of sunlight.