

Mikrobiologiczny rozkład alkaloidów tropanowych

Microbiological decomposition of tropane alkaloids

J. KĄCZKOWSKI

Większość cytowanych w literaturze prac na temat bakteryjnego rozkładu alkaloidów posiada charakter jakościowy. Prace Behrensa (1894 i 1896), Faitelowitz (1930), Łypacewicz (1930), Werlego (1938 i 1940), Bucherera (1942a, 1942b), Küstera (1952), Graya i Lachance'a (1956) oraz Możejko (1952) wykazały istnienie szczepów bakterii, głównie glebowych, zdolnych do korzystania z różnych rodzajów alkaloidów jako źródła azotu czy węgla.

O istnieniu bakterii, rozkładających alkaloidy tropanowe donieśli: Łypacewicz (1930), Küster (1952) i Możejko (1952). Autorzy ci wyodrębnili i zidentyfikowali szczepy, korzystające z tych alkaloidów jako jedyne źródła azotu i węgla.

W ostatnich latach szereg autorów zajęło się przebadaniem mechanizmu bakteryjnego rozkładu alkaloidów. Prace te dotyczyły głównie alkaloidów tytoniu, przy czym autorzy uzyskali i zidentyfikowali szereg produktów pośrednich tego rozkładu, jak również wyodrębnili i opisali pewne enzymy, biorące udział w tym rozkładzie. Z autorów tych należy wymienić: Wada i Yamasaki (1954), Frankenburga (1956), Wada (1956), Toczko (1958) i Hochsteina i Rittenberga (1959a, 1959b). Ponadto Możejko-Toczko (1958) przeprowadziła badania nad mikrobiologicznym rozkładem lupaniny w różnych organach łubinu wąskolistnego.

Główne alkaloidy tropanowe, występujące w rodzajach bielunia (*Datura*), wilczej jagody (*Atropa*) i lulka (*Hyoscyamus*), są związkami o charakterze estrów. Najbardziej znanym alkaloidem z tej grupy jest atropina, którą stosowano w niniejszych badaniach. Jest to mieszanina racemiczna d- i l-hioscyjminy.

Podstawowym założeniem niniejszej pracy jest zidentyfikowanie produktów powstałych przy rozkładzie alkaloidów tropanowych, mogących

być równocześnie związkami przejściowymi w biosyntezie tych zasad. Przedstawione są również próby wyodrębnienia i bliższego scharakteryzowania enzymów, katalizujących te przemiany. Poznanie tych związków i enzymów mogłoby rzucić światło na końcowe odcinki biosyntezy alkaloidów tropanowych.

I. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Izolowanie i identyfikacja czystych kultur bakterii

Bakterie rozkładające atropinę wyizolowano z gleby, stosując selektywne pożywki, przy czym postępowanie było następujące:

Próbki gleby pobierano z pola doświadczalnego SGGW, na którym w poprzednim roku prowadzono doświadczalną hodowlę bielunia (*Datura stramonium*). Około 10 gramów gleby wytrząsano w 1 litrze wody i przenoszono stąd 1 ml zawiesiny do 100 ml pożywki, według K. Bassalika, o następującym składzie, podanym przez Możejko-Toczko (1958):

0,03% KH_2PO_4	0,05% NaCl
0,03% K_2HPO_4	0,05% MgSO_4

Pożywka zawierała ponadto 0,02% siarczanu atropiny. Po trzech pasażach, przy użyciu analogicznej pożywki i po przygotowaniu odpowiednich rozcieńczeń, zawiesinę bakteryjną przenoszono do pożywki o powyższym składzie, zestawionej przez dodanie 1,4% agaru i wylewano na szalki Petriego. Na szalkach uzyskano kolonie o następującej charakterystyce: okrągłe, błyszczące o brzegach gładkich, strukturze jednolitej i zabarwieniu początkowo żółtym, następnie ciemniejącym aż do odcienia czerwono-pomarańczowego, i o konsystencji mazistej.

Czystą kolonię uzyskanego szczepu przeniesiono do pożywki selektywnej i po 2 dniach przeszczepiono na skos agarowy i w takiej postaci przechowywano.

Wyizolowany szczep posiadał następujący obraz mikroskopowy: nieruchliwe pałki, układające się w figury geometryczne o końcach zaokrąglonych i bokach nierównoległych.. Wymiary: średnica — 0,60—0,90 μ , długość około 3 μ . Po 5 dniach następuje degeneracja i rozpad komórek.

Wyizolowany szczep oznaczono według Bergey'a (1957) i stwierdzono, że należy on do klasy *Schizomycetes*, rzędu *Eubacteriales*, rodziny *Corynebacteriaceae* i wykazuje duże podobieństwo do *Arthrobacter terregens*, opisanego przez Lockheeda i Burtona (1953). W stosunku do opisanego, wyizolowany szczep wykazuje następujące różnice. Bakterie

te są gram-dodatnie, na ziemniaku i na mleku rozwijają się, jednak w tym ostatnim nie powodują zmiany odczynu. Na pozostałych standardowych pożywkach również się rozwijają i dopiero po około 12 miesiącach od momentu izolowania z gleby wydawnie spada ich zdolność do rozwoju.

Równocześnie wyizolowano drugi szczep bakterii, rozkładających atropinę, ponieważ jednak jego aktywność była znacznie mniejsza, nie stosowano go w dalszych badaniach.

Przy badaniu optymalnych warunków działania szczepu uwzględniono wpływ temperatury, odczyn, rodzaj podawanego alkaloidu i wykorzystanie azotu i węgla. Bakterie hodowano na pożywkach o pH 5,8 (str. 678). Przy badaniu rodzaju wykorzystywanego alkaloidu do pożywki mineralnej dodawano l-hioscyjaminę, atropinę, skopolaminę i homatropinę. Stopień wykorzystania alkaloidów przez bakterie w wspomnianych warunkach stwierdzano przez oznaczanie ich ubytków.

2. Chemiczna preparatyka pochodnych atropiny

W wyniku chemicznej hydrolizy atropiny uzyskuje się kwasy tropowy i atropowy, oraz zasadę — tropinę. Badając produkty bakteryjnego rozkładu atropiny stwierdzono również produkty kwaśne i zasadowe. Chromatogramy produktów bakteryjnego i chemicznego rozkładu były identyczne z wyjątkiem dodatkowej zasadowej plamy z rozkładu bakteryjnego. Powyższe obserwacje nasunęły wniosek, że wczesne produkty rozkładu bakteryjnego mogą być identyczne z produktami hydrolizy chemicznej. W związku z tym wykonano preparaty tropiny, kwasu tropowego i atropowego w celu ich późniejszego porównania z nieznanymi preparatami, otrzymanymi w wyniku rozkładu bakteryjnego.

Preparaty te otrzymano stosując hydrolizę atropiny przy pomocy stężonego kwasu solnego (Lossen 1866) w zatopionej rurce z grubego szkła w temp. 120—130° (Kraut 1863). Produkty kwaśne hydrolizy rozfrakcjonowano i oczyszczono metodami opisanymi przez Lossena (1866). Tropinę uzyskano z roztworu po hydrolizie po wymyciu frakcji kwaśnej i po alkalizacji, wytrząsając ten roztwór wielokrotnie z chloroformem. Surową zasadę oczyszczano jako krzemowolframian, z którego wolną tropinę uzyskano przy pomocy wodorotlenku sodowego. Temp. topnienia krystalicznego preparatu wynosiła 51—52°, zgodnie z temp. topnienia preparatu uzyskanego przez Amenomiya (1902). Wartość ta dla tropiny, przyjęta w literaturze wynosi 62°.

Preparat tropigeniny otrzymano ze spreparowanej uprzednio tropiny zmodyfikowaną metodą Willstättera (1896).

3. Hodowla bakterii i wydzielenie produktów rozkładu atropiny

W celu uzyskania produktów bakteryjnego rozkładu w większych ilościach, oraz masy bakteryjnej w ilości wystarczającej do sporządzenia z niej wyciągu enzymowego, prowadzono hodowlę bakterii w 5 l pożywki o składzie podanym na str. 678, ze zwiększoną jednak zawartością alkaloidu do 0,05%. W tym celu pożywkę sterylizowano w kolbie na 10 l w autoklawie pod ciśnieniem 2 at, jednorazowo przez godzinę, po czym zaszczepiono ją 50 ml uprzednio przygotowanej gęstwy bakteryjnej. Hodowlę prowadzono w ciągu 12 dni, stosując codzienne napowietrzanie pożywki przy pomocy mieszadła magnetycznego. Po uzyskaniu prawie całkowitego rozkładu zawartego w pożywce alkaloidu (co sprawdzano chromatograficznie), bakterie odwirowano na szybkoobrotowej wirówce typu Servall przy 8500 obr/min ($9260 \times g$). Gęstwę bakteryjną przechowywano do dalszej pracy w próżni w temp. 0° , a klarowny płyn z nad osadu zagęszczono do objętości około 200 ml, silnie zakwaszono stężonym kwasem siarkowym do pH poniżej 1 i wytrząsano 5-krotnie z 50 ml eteru etylowego. Prowadząc rozdzielanie kwaśnego eterowego wyciągu w sposób analogiczny do stosowanego przy preparatyce, uzyskano dwa preparaty, zidentyfikowane w toku badań.

Roztwór pozostały po oddzieleniu frakcji eterowej zagęszczono na łaźni wodnej do zaniku zapachu eteru. Po ostudzeniu roztwór ten silnie alkaliczowano przy pomocy stężonego wodorotlenku sodowego i wytrząsano 6-krotnie z 20 ml chloroformu. Wyciąg chloroformowy zagęszczono do objętości około 10 ml, uzyskując żółty roztwór o konsystencji syropu, zawierający produkty zasadowe. Produkty te rozdzielono chromatograficznie na bibule, stwierdzając obecność 2 związków zasadowych, 3 i 4. Po elucji i ponownej chromatografii otrzymano te związki w stanie czystym.

4. Otrzymanie preparatu enzymatycznego i badanie jego aktywności

Przechowywaną w próżni gęstwę bakteryjną użyto do spreparowania proszku acetonowego, według metody podanej przez Appleyarda i Woodsa (1956). Uzyskany proszek acetonowy inkubowano z 0,2 molarnym buforem fosforanowym o pH 6,0 przez 2 godz. w temp. 0° , po czym uzyskany wyciąg odwirowywano od pozostałości.

Przebadano aktywność uzyskanego wyciągu enzymowego w zależności od czasu inkubacji i od stężenia enzymu. W tym celu próbki alkaloidu w ilości około 1,5 mg atropiny w 0,2 molarnym buforze fosforanowym o pH 6,0 traktowano odpowiednią ilością wyciągu enzymowego i przetrzymywano w ciągu określonego czasu w termostacie o temp. 27° . Stosowano 2 rodzaje prób kontrolnych: 1) alkaloid + bufor, i 2) alkaloid + bufor + wyciąg enzymowy, inaktywowany w temp. 100° przez 3 minuty.

Równocześnie wykonano orientacyjne próby rozkładu alkaloidu przy pomocy enzymów, nie wyługowanych z proszku acetonowego. W tym celu sporządzano zawiesinę odwirowanego proszku acetonowego w świeżym buforze o pH 6,0 i całość traktowano roztworem, zawierającym około 1,5 mg alkaloidu. Próbę kontrolną przeprowadzano analogicznie inaktywując jednak enzymy bezpośrednio po dodaniu roztworu alkaloidu przez 3-minutowe gotowanie we wrzącej łaźni wodnej. Zawartość alkaloidu oznaczano w próbie kontrolnej oraz w próbach badanych po 1, 2 i 4 godz. inkubacji.

5. Metody analityczne

a) Oznaczanie zawartości alkaloidów w pożywkach przeprowadzano szybką mikrometodą Reifera, Buchowicza (1955). Obniżono jednak stężenie wodorotlenku sodowego z 2 n do 1 n i próbki przy oznaczeniach seryjnych wytrząsano natychmiast z chloroformem, ponieważ w odczynie zasadowym alkaloid ulega dość szybkiej hydrolizie. Ponieważ zawartość atropiny oznaczano przy dużych stężeniach produktów jej hydrolizy, przebadano, czy produkty te nie przeszkadzają w oznaczeniu. Stwierdzono, że kwas tropowy w ogóle nie daje barwnej reakcji w tych warunkach, a ilość tropiny, odpowiadająca ilości alkaloidu, powoduje błąd nie przekraczający 2%.

b) Metody chromatografii bibułowej. Do wstępnych badań bakteryjnego rozkładu alkaloidów, do identyfikowania uzyskanych produktów, a także do preparatywnego rozdzielania pochodnych zasadowych, stosowano metodę chromatografii bibułowej.

Chromatografia związków o charakterze kwaśnym. Do identyfikowania związków frakcji kwaśnej eterowej stosowano zarówno metodę chromatografii wstępującej, jak i zstępującej na bibule Whatman Nr 1 i Nr 3. Badane substancje наносzono na paski długości 45 cm i szerokości, zależnej od ilości nakraplanych plam. Stosowano 2 rodzaje fazy ruchomej: mieszaninę n-butanolu, kwasu octowego lodowatego i wody w stosunku 50:3:25, gdzie górnej warstwy butanolowej używano do rozwijania, a dolnej, wodnej do wysycania komory jako fazy stałej. Drugą stosowaną fazą była mieszanina 96-procentowego etanolu, stężonego amoniaku i wody w stosunku 80:4:16 (Long i in. 1951). W pierwszym przypadku stosowano dwugodzinną klimatyzację przygotowanego do rozwijania chromatogramu. Czas rozwijania chromatogramów na fazie I na bibule Nr 1 wynosił 30—40 godz., a na bibule Nr 3 — około 16 godz., na fazie II czas ten wynosił w przypadku bibuły Nr 1 około 48 godz., a w przypadku bibuły Nr 3 godzin 28—30. Przy stosowaniu metody zstępującej czas rozwijania był o około

10% krótszy. Po rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej i wywoływano przez spryskiwanie jednym z wywoływaczy wskaźnikowych.

Chromatogramy wywoływano roztworami zieleni bromokrezolowej, błękitu bromotymolowego oraz jego mieszaniny z czerwienią metylową (Block i in. 1955), przy czym ten ostatni roztwór dawał najlepsze wyniki. Spryskany tym wywoływaczem chromatogram kilkakrotnie poddawano działaniu par amoniaku na kilkanaście sekund i uzyskiwano czerwone plamy na żółtozielonym tle, wracającym szybko do czerwonego zabarwienia. Plamy wywołane w atmosferze amoniaku znikły bardzo szybko, co uniemożliwiało wykonanie fotografii chromatogramów.

Chromatografia związków zasadowych. Produkty zasadowe z alkalicznego wyciągu chloroformowego wstępnie identyfikowano stosując I fazę, to znaczy n-butanol, kwas octowy lodowaty i wodę w stosunku 50:3:25. Chromatogramy wykonywano na paskach bibuły Whatman Nr 1 i Nr 3 długości około 45 cm, stosując metodę zstępującą. Analogicznie postępowano przy chromatograficznym badaniu kolejności powstawania zasadowych produktów rozkładu i badaniu aktywności wyciągów z bakteryjnego proszku acetonowego. Przy identyfikacji zasadowych produktów bakteryjnych za pomocą chromatografii bibułowej stosowano ponadto jako fazę ruchomą mieszaninę toluenu i izo-butanolu w stosunku 1:1, wysuszoną wodą (Büchi, Schumacher 1957), jednak bibułę impregnowano przed nakraplaniem nie buforem boranowym o pH 6,6, lecz buforem fosforanowym o pH 6,5. Ponadto stosowano tę samą fazę z dodatkiem 1% stężonego kwasu solnego, przy czym w tym przypadku nie stosowano impregnacji bibuły. Wysuszone chromatogramy wywoływano przez spryskiwanie zmodyfikowanym odczynnikiem Dragendorffa (Bettschart 1954).

Rozdziálu dwóch zasadowych produktów rozkładu atropiny (3 i 4) dokonano również przy pomocy chromatografii bibułowej. Na arkusz bibuły Whatman Nr 3 o długości 45 cm i szerokości 25 cm nakraplano linią ciągłą chloroformowy wyciąg mieszaniny produktów zasadowych w ilości odpowiadającej 2—3 mg suchej masy i rozwijano w ciągu 18—20 godzin. W tym czasie czoło fazy ruchomej dochodziło do końca arkusza. Wysuszony na powietrzu chromatogram spryskiwano zmodyfikowanym odczynnikiem Dragendorffa i po wysuszeniu wycinano oddzielnie rejony odpowiadające poszczególnym związkom. Drobnopokrajane skrawki bibuły przenoszono do rozdzielacza, traktowano 2 n wodorotlenkiem sodowym w ilości potrzebnej do odbarwienia brązowo zabarwionej bibuły, co było równoznaczne z rozkładem kompleksu zasady z odczynnikiem Dragendorffa. Uwolnioną zasadę eluowano do chloroformu przez 5-krotne wytrząsanie z porcjami po 10 ml tego odczynnika, chloroform odparowywano do objętości około

2 ml, a uzyskany wyciąg zanieczyszczony jeszcze małymi ilościami drugiego składnika oczyszczano ponownie przez rechromatografię. W ten sposób uzyskano oba zasadowe produkty bakteryjnego rozkładu atropiny w ilościach wystarczających do chromatograficznej identyfikacji.

c) Identyfikacja spektrofotometryczna. Jedną z metod identyfikacji, dotyczącą kwasu tropowego, było spektrofotometryczne wyznaczenie wierzchołków krzywej absorpcji w zakresie widma ultrafioletowego. Pomiary przeprowadzono w spektrofotometrze typu „Algerie” firmy A. Jobin i G. Yvon, przy zastosowaniu lampy wodorowej jako źródła światła.

II. WYNIKI

1. Badanie warunków aktywności bakterii

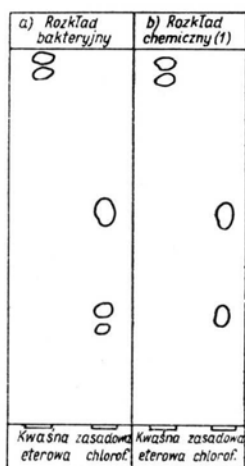
Z przebadanych 4 alkaloidów: atropiny, 1-hioscyjminy, skopolaminy i homatropiny wyizolowany szczep najlepiej wykorzystywał skopolaminę, nieco gorzej atropinę i 1-hioscyjminę, natomiast wykorzystanie homatropiny było wyraźnie słabsze. Optymalną temperaturą rozwoju bakterii jest 25–27°. Poniżej 18° i powyżej 33° rozkład atropiny jest nieznaczny. Optymalne pH wynosi około 5,0–6,0. Przy pH 4,0 osiągnięto około 80%-owy rozkład alkaloidu. Wyższe pH nie sprzyja rozwojowi bakterii, a pH 8,0 powoduje już chemiczny rozkład alkaloidu na skutek nadmiaru jonów OH (K a c z k o w s k i 1959).

2. Wstępne badania produktów rozkładu bakteryjnego

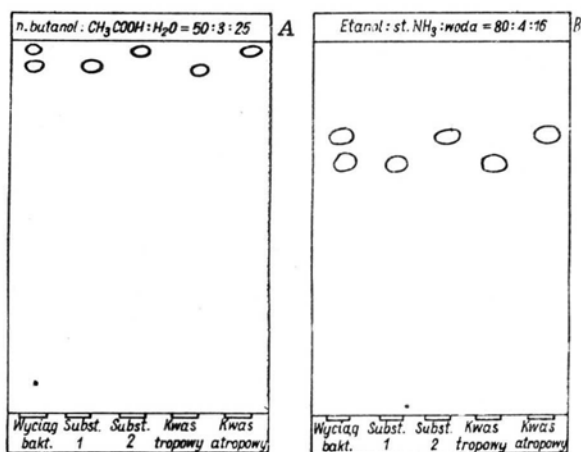
Zagęszczona pożywka po 12-dniowej działalności bakterii i ich odwirowaniu, nakroplona na chromatogram po rozdziale na 2 frakcje kwaśną eterową i zasadową chloroformową i po wywołaniu odczynnikami wskaźnikowym przedstawiała obraz podany na rysunku (ryc. 1a).

Z frakcji eterowej uzyskano 2 plamy kwaśne o wartościach $R_f = 0,90$ i $0,94$, a z frakcji chloroformowej 3 plamy zasadowe: bardzo intensywną i dużą o $R_f = 0,58$, równie intensywną, choć mniejszą o $R_f = 0,31(3)$, oraz niewielką plamę o $R_f = 0,25(4)$. Jak stwierdzono przez wykonanie porównawczego chromatogramu, zasadowa plama o $R_f = 0,58$ odpowiada nie rozłożonej atropinie. Dla porównania przeprowadzono chemiczną hydrolizę atropiny, stosując jako czynniki hydrolizujące gotowanie przez 27 godzin w wodzie (A m e n o m i y a 1902), stężony kwas solny (L o s s e n 1866), 0,1 l n wodorotlenek sodowy (Z w i r b l i s i i n. 1956), oraz 0,1 l n i n a s y c o n y wodorotlenek barowy (K r a u t 1863, L o s s e n 1866).

Hydrolizaty rozfrakcjonowano analogicznie jak w przypadku rozkładu bakteryjnego na frakcję kwaśną eterową i zasadową chloroformową i wykonano chromatogramy. Obrazy były we wszystkich przypadkach analogiczne do przedstawionego na rysunku (ryc. 1b) dla hydrolizy wodnej (Amenomiy a 1902), a różniły się pod względem ilościowym, to znaczy intensywnością i wielkością poszczególnych plam. Z porównania chromatogramów rozkładu bakteryjnego i hydrolizy chemicznej widać, że w obu



Ryc. 1. Chromatograficzne porównanie produktów hydrolizy chemicznej z produktami rozkładu bakteryjnego atropiny (rozwijane w układzie I)



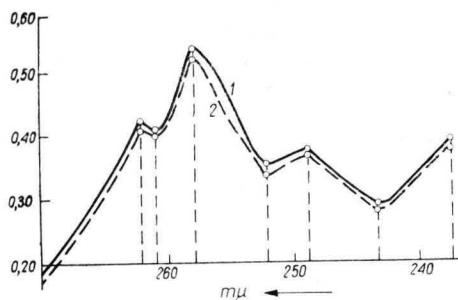
Ryc. 2. Chromatograficzna identyfikacja kwaśnych produktów (nr 1 i nr 2) bakteryjnego rozkładu atropiny. A — w układzie I, B — w układzie II

wypadkach uzyskano analogiczne produkty kwaśne oraz produkt zasadowy o $R_f = 0,31$. Na podstawie tych wstępnych badań nasunęło się przypuszczenie, że produkty kwaśne bakteryjnego rozkładu atropiny to kwasy tropowy i atropowy, natomiast produkt zasadowy to tropina, gdyż według wymienionych wyżej autorów te właśnie produkty powstają w czasie hydrolizy chemicznej atropiny.

3. Identyfikacja poszczególnych produktów rozkładu atropiny

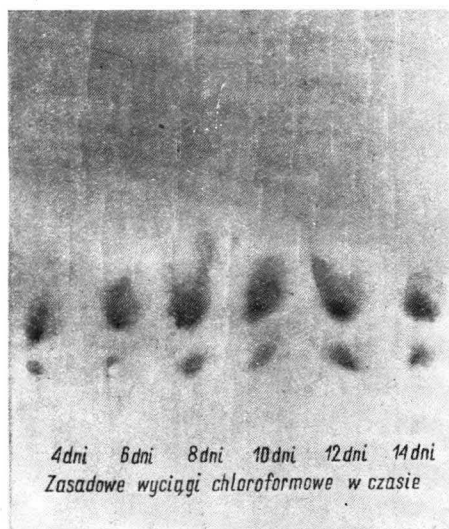
a) Produkty frakcji kwaśnej. Dotychczas nie zidentyfikowane kwaśne produkty rozkładu bakteryjnego chromatografowano równolegle z produktami rozkładu chemicznego atropiny — kwasem tropowym i atropowym jako wzorcami, stosując fazy I i II. Obrazy tych chromatogramów są przedstawione na rycinach 2A i 2B.

Jak wynika z przedstawionych rysunków chromatogramów, wartości R_f dla substancji 1 w obu fazach odpowiadają wartościom R_f dla kwasu tropowego. Stąd nasuwa się wniosek o identyczności substancji 1 z kwasem tropowym. Analogicznie wartości R_f dla substancji 2 są równe wartościom



Ryc. 3. Spektrofotometryczne krzywe absorpcji kwasu tropowego i związku bakteryjnego nr 1

R_f dla kwasu atropowego w wymienionych dwóch układach, co z kolei prowadzi do wniosku o identyczności substancji 2 z kwasem atropowym. Wnioski te potwierdzono w dalszych badaniach. Przede wszystkim ozna-



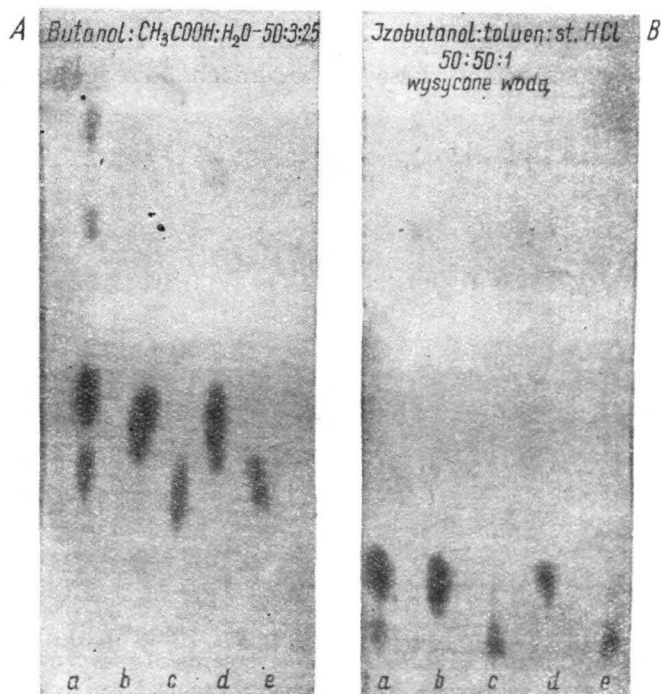
Ryc. 4. Chromatograficzne badanie kolejności powstawania zasadowych produktów bakteryjnego rozkładu atropiny (rozwijane w fazie I)

czono temperaturę topnienia obu tych związków. Uzyskano dla związku Nr 1 temp. topnienia 114° , natomiast dla związku Nr 2 — 108° . Temperatury te są w przybliżeniu zgodne z temp. topnienia podanymi w literatu-

rze dla kwasu tropowego (116°) i atropowego (106°), a zupełnie zgodne z temp. topnienia uzyskanych kwasów tropowego i atropowego drogą chemicznej hydrolizy w toku niniejszych badań.

W końcu wyznaczono krzywe absorpcji widma w granicach 270—230 m μ (w 0,1 n kwasie solnym) dla chemicznie otrzymanego kwasu tropowego i dla bakteryjnego produktu Nr 1. Krzywe te przedstawione są na rycinie 3.

b) Produkty frakcji zasadowej. Wstępny chromatogram, zamieszczony na rycinie 1 wskazuje, że tropina o $R_f = 0,31$, która pojawia się w wyniku wszystkich rodzajów hydrolizy chemicznej, jest również produktem rozkładu bakteryjnego. W odróżnieniu od hydrolizy chemicznej, wyciąg chloroformowy produktów bakteryjnego rozkładu poza postulowaną tropiną, zawierał dodatkowo drugi związek. Związki te należało przeto rozdzielić i otrzymać w stanie chemicznie czystym, jak również przebadać kolejność ich powstawania.



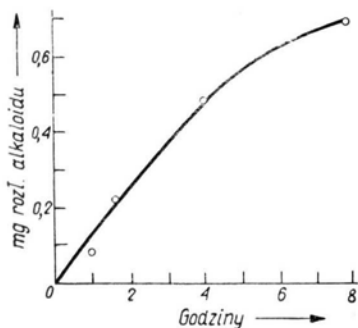
Ryc. 5. Chromatograficzna identyfikacja produktów zasadowych rozkładu bakteryjnego atropiny, nakropionych równolegle z tropiną i tropigeniną: A — w układzie I; B — w układzie: izo-butanol, toluen, st. HCl = 50:50:1, wysyczone wodą; a — wyciąg bakteryjny, b — substancja nr 3, c — substancja nr 4, d — tropina, e — tropigenina

Przytoczony na rycinie 4 chromatogram, na który nakraplano wyciągi chloroformowe z kultur o różnym czasie inkubacji, wskazuje, że jako pierwszy pojawia się związek o $R_f = 0,31$, po nim dopiero związek o $R_f = 0,25$.

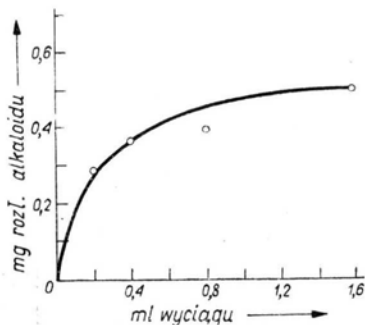
Chloroformowy roztwór związku 3 o $R_f = 0,31$ nakraplano na chromatogramy, na których porównywano ten związek z nakroploną równocześnie, preparatywnie otrzymaną tropiną, jako wzorcem. Chromatogramy rozwijano w dwóch fazach o składzie podanym w metodyce.

Załączone na rycinach 5A i 5B chromatogramy wykazują, że zarówno preparowana tropina, jak i badany związek zasadowy posiadają analogiczne wartości R_f w obu układach. Na tej podstawie wnioskuje się, że pierwszym produktem zasadowym bakteryjnego rozkładu atropiny jest tropina powstająca obok kwasu tropowego w reakcjach hydrolizy atropiny.

W celu zidentyfikowania związku 4, dającego w układzie I plamę o wartości $R_f = 0,25$, przebadano chromatograficznie produkty ważniejszych przekształceń chemicznych tropiny, jak utlenianie jej do tropinonu



Ryc. 6. Zależność enzymatycznego rozkładu atropiny od czasu przy użyciu 0,5 ml wyciągu



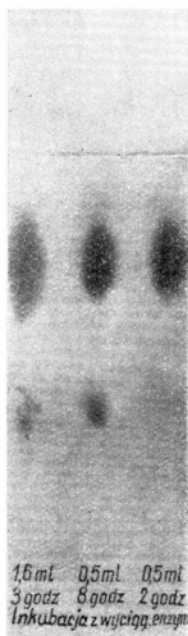
Ryc. 7. Zależność enzymatycznego rozkładu atropiny od stężenia wyciągu enzymowego, przy czasie inkubacji = 3 godz.

i kwasu tropinowego oraz przemiany do tropigeniny, tropidyny i dwu-hydroksytropidyny. Były to teoretycznie najbardziej prawdopodobne przekształcenia, obejmujące takie reakcje, jak utlenianie, demetylację i dehydratację cząsteczki tropiny. Stwierdzono chromatograficznie, że tropigenina — powstająca w wyniku demetylacji tropiny — daje po wywołaniu odczynnikami Dragendorffa lub odczynnikami wskaźnikowym silnie zasadową plamę o R_f analogicznym do tej wartości dla zasadowego związku nr 4, uzyskanego w rozkładzie bakteryjnym. W celu ściślejszego zidentyfikowania badanego związku, otrzymano z tropiny preparatywnie tropigeninę w postaci karbaminianu o temp. topnienia = 158° , według metody

podanej w części doświadczalnej. Otrzymaną tropigeninę nakraplano w charakterze wzorca na chromatogramy obok związku, otrzymanego z rozkładu bakteryjnego, i rozwijano je w dwóch układach, podanych przy identyfikowaniu tropiny. Obrazy uzyskane na chromatogramach, przedstawionych na ryc. 5, wykazują, że oba powyższe związki układają się w obydwu fazach w miejscach o jednakowych wartościach R_f . Bardzo małe ilości czystego związku bakteryjnego uniemożliwiły otrzymanie pochodnych o znanej temp. topnienia. Wniosek, że tropigenina jest również jednym z produktów rozkładu bakteryjnego, opiera się więc wyłącznie na identyfikacji chromatograficznej.

4. Badanie aktywności enzymów, uzyskanych z bakterii

W celu bliższego scharakteryzowania enzymów biorących udział w wyżej opisanych przemianach, wykonano z gęstwy bakteryjnej proszek acetonowy, stosując postępowanie podane w metodyce. Do sporządzenia



Ryc. 8. Chromatogram produktów rozkładu atropiny pod działaniem wyciągu z proszku acetonowego

proszku acetonowego użyto około 30 mg bakterii. Uzyskany proszek inkubowano z około 7 ml buforu fosforanowego o pH 6,0. Przebadano wpływ czasu na stopień rozkładu atropiny przy 0,5 ml wyciągu enzymowego

oraz wpływ stężenia enzymu przy czasie inkubacji = 3 godz. Zależności te podane są na wykresach umieszczonych na rycinach 6 i 7.

Aktywność uzyskanego wyciągu enzymowego była stosunkowo niska. Znacznie aktywniejszy od wyciągu był sam proszek acetonowy, z którym inkubowano alkaloid w pH 6,0. Uzyskane wyniki, podane w tabeli 1 wskazują, że już po 4 godzinach zostało rozłożone 90% atropiny.

Tabela 1
Inkubacja proszku acetonowego z bakterii
z 1,275 mg atropiny

Czas w godz.	Zawartość alkaloidów w próbie w mg	Alkaloid rozłożony w mg	% rozkładu
1	0,925	0,350	27,4
2	0,400	0,875	68,6
4	0,125	1,150	90,5

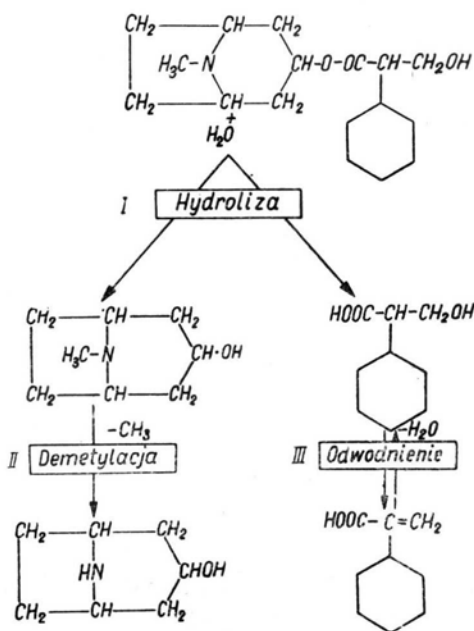
Sporządzone chromatogramy zasadowych, chloroformowych wyciągów produktów rozkładu enzymatycznego atropiny wykazały obecność tylko jednego produktu zasadowego o $R_f = 0,31$, zidentyfikowanego uprzednio jako tropina (ryc. 8). Uzyskany enzym ma więc charakter esterazy, gdyż powoduje hydrolizę atropiny do tropiny, bez dalszego jej rozkładu.

III. DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach nad bakteryjnym rozkładem atropiny doprowadziły zasadniczo do sformułowania trzech typów reakcji przebiegających w początkowych stadiach tego rozkładu. Pierwszą z tych reakcji jest hydrolityczny rozpad atropiny jako estru na produkt kwasowy — kwas tropowy, i produkt o charakterze alkoholowym — tropinę. Istnienie tych związków wśród produktów rozkładu można uznać za udowodnione, szczególnie zaś kwasu tropowego, zidentyfikowanego przy pomocy chromatografii bibułowej w dwóch układach, temp. topnienia i widma absorpcyjnego w zakresie fal 270—240 m μ . Wprawdzie widmo wyizolowanej i oczyszczonej substancji wykazuje tylko 3 maksima i 3 minima, a nie 4 maksima i minima, jak to w swych badaniach sugerują Thies i Storgenfrey (1958), ale wykazane szczyty są prawie zgodne z podanymi przez wymienionych autorów. Brak czwartego maksimum jest być może maskowany przez ślady benzenu, który był stosowany do wyimywania kwasu atropowego.

Drugą reakcją, przebiegającą tylko do pewnego stanu równowagi, jest odwodnienie kwasu tropowego do atropowego. Powstawanie tej substancji można także uznać za udowodnione chromatograficznie i przez oznaczenie temp. topnienia wyizolowanego, czystego związku. Niezależnie od czasu działania bakterii na alkaloid, uzyskiwano zawsze mieszaninę tych dwóch kwasów z znaczną przewagą kwasu tropowego. Oba te związki były produktami końcowymi przemiany materii opisanego szczepu, gdyż bakterie te nie rozwijały się na mieszaninie wymienionych kwasów, nawet po dodaniu azotu mineralnego w postaci soli amonowej.

Trzecią reakcją, którą sugerują przedstawione na ryc. 5 chromatogramy, byłaby reakcja demetylacji tropiny, w wyniku której powstaje



Ryc. 9. Schemat pierwszych stadiów bakteryjnego rozkładu atropiny (objaśnienia w tekście)

tropigenina. Demetylacja tropiny do tropigeniny została dowiedziona jedynie chromatograficznie, gdyż otrzymano z rozkładu bakteryjnego bardzo nieznaczne ilości tego związku. Jednakże porównanie substancji bakteryjnej z chemicznie otrzymaną tropigeniną w dwóch fazach na drodze chromatografii bibułowej pozwala przyjąć, że demetylacja przebiega również w procesie bakteryjnego rozkładu tropiny. Schemat omówionych reakcji jest podany na rycinie 9.

Z enzymów, katalizujących wyżej omawiane reakcje otrzymano w wyciągu z proszku acetonowego i bliżej przebadano jedynie esterazę atropiny, katalizującą hydrolizę estru do kwasu tropowego i tropiny. Aktywność uzyskanego wyciągu była stosunkowo niska bądź na skutek nieodpowiednich warunków ekstrakcji, bądź na skutek nierozpuszczalności enzymu rozkładającego jedną z optycznych form atropiny. Przypuszczenie takie byłoby zgodne z doniesieniami Gocheaux i Moyens (1949), oraz Wernera (1958), którzy z serum krwi królika otrzymali esterazę atropiny, rozkładającą tylko 1-formę. Atropina, inkubowana nie z buforowym wyciągiem, lecz z suchym proszkiem acetonowym, uległa prawie całkowicie rozkładowi, co świadczy o obecności w nim enzymów hydrolizujących obie formy optyczne alkaloidu. Obecności innych enzymów, katalizujących pozostałe opisane dwie reakcje, nie badano w bakteryjnym proszku acetonowym.

Tropina i tropigenina mogą być bezpośrednimi prekursorami biosyntezy hioscyjminy w roślinach wyższych, zgodnie z postulowanym założeniem niniejszej pracy — odwracalnością reakcji enzymatycznych w przemianach alkaloidów tropanowych. Przemawiają za tym rozważania Cromwella (1943), Diaperà i in. (1951), oraz Robinsona (1953), według których szkielet tropanowy powstaje przed metylacją azotu. Autorzy ci podają w swych przypuszczeniach, że jednym z przejściowych związków w biosyntezie może być nor-tropinon. Dotychczas nie wiemy, czy metylacja azotu następuje przed czy też po redukcji grupy ketonowej nor-tropinonu do grupy wodorotlenowej, przeto nie można wykluczyć możliwości metylacji po redukcji nor-tropinonu do tropigeniny (nor-tropiny). Z drugiej strony stwierdzenie przez Bendikà i in. (1958) wolnej tropiny w *Scopolia carniolica* wskazywałoby na syntezę hioscyjminy bezpośrednio poprzez esteryfikację, a zatem tropina byłaby również związkiem przejściowym tej biosyntezy.

Kierownikowi Katedry, Panu prof. dr I. Reiferowi za cenne rady i pomoc w czasie wykonywania niniejszej pracy oraz Pani dr M. Toczko za pomoc przy wykonywaniu części mikrobiologicznej autor składa na tym miejscu serdeczne podziękowanie.

STRESZCZENIE

1. Wyizolowano z gleby i bliżej przebadano szczep bakterii, zdolnych do korzystania z alkaloidów tropanowych, jako jedyne źródła azotu i węgla. Szczep ten oznaczono według Bergeya i stwierdzono, że jest on bardzo podobny do *Arthrobacter terregens*.

2. Wyizolowano i zidentyfikowano 4 produkty bakteryjnego rozkładu atropiny: kwasy tropowy i atropowy, oraz tropinę i tropigeninę.

3. Otrzymano z bakterii proszek acetonowy i wyciąg wodny z tego proszku, w którym stwierdzono esterazę atropiny, katalizującą rozkład tego alkaloidu do tropiny i kwasu tropowego, oraz wykonano wstępne badania nad kinetyką tego enzymu.

4. Dyskutowana jest możliwość roli wymienionych produktów bakteriynego rozkładu alkaloidów tropanowych jako związków przejściowych ich biosyntezy.

Katedra Biochemii

*Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie*

(Wpłynęło dn. 17.7.1959)

SUMMARY

1. A bacteria, utilizing tropane alkaloids as the sole source of carbon and nitrogen, has been isolated from soil. Its properties have been investigated. This strain possesses many characteristics of *Arthrobacter terregens*.

2. Four products of bacterial decomposition of atropine have been isolated and identified. These products are: tropic acid, atropic acid, tropine and tropigenine.

3. Acetone powder has been prepared from the bacteria and aqueous buffered extract contained atropine esterase, which catalysed the decomposition of this alkaloid to tropine and tropic acid. Preliminary investigations, concerning kinetics of this enzyme were carried out.

4. The possibility of the role of these decomposition products as possible precursors in the biosynthesis of tropane alkaloids are discussed.

Chair of Biochemistry

College of Agriculture

Warsaw, (Poland)

LITERATURA

- Amenomiya T., 1902, Überführung des Atropins in d- und l-Hioscyamine, Arch. Pharm. 240: 498—504.
- Appleyard C., Woods D., 1956, The Pathway Creatin Catabolism by *Pseudomonas ovalis*, J. Gen. Microbiol. 14(2): 351—365.
- Behrens J., 1894, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze, Land. Vers. Stat. 46: 271.
- Behrens J., 1896, Über Mikroorganismen des Tabaks nach der Ernte, Land. Vers. Stat. 46: 163.
- Bendik J., Bauerowa O., Bauer S., Mokry J., Tomko J., 1958, Alkaloidy zo *Scopolia carniolica*. Chem. Zvesti 12(3): 181—184.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, VII Ed. Bailliere, Tyndall and Cox LTD London 1957.

- Bettschart A., 1954, Über die Eignung chromatographischer Verfahrens für die Trennung der Alkaloidgemischen unter besonderer Berücksichtigung der Tropin- und der Opium-alkaloide, Zürich (praca doktorska).
- Block R. J., Durrum E. L., Zweig G. A., 1955, A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, Acad Press New York, p. 160.
- Bucherer R., Enders C., 1942a, Abbau von Histamin und Nicotin durch Bakterien, Biochem. Z. 310: 222.
- Bucherer H., 1942b, Über den mikrobiellen Abbau von Giftstoffen, Mitt II, Zentr. f. Bact. II. 105: 445.
- Büchi J., Schumacher H., 1957, Die Reinheitsprüfung der Alkaloide mit Hilfe der Papierchromatographie. I. Solanaceae Alkaloide, Pharm. Acta Helv. 32(2): 75—98.
- Cromwell B. T., 1943, Studies on the Synthesis of Hyoscyamine in *Atropa belladonna* L. and *Datura stramonium* L., Biochem. J. 37: 717—726.
- Diaper D. G. M., Kirkwood S., Marion L., 1951, The Biogenesis of Alkaloids. III. A Study of Hyoscyamine Biosynthesis using Isotopic Putrescine, Canad. Journ. Chem. 29(11): 964—969.
- Duncan R. E. B., Porterus J. W., 1953, The Identification and Determination of the Lower Straight-Chain Fatty Acids by Paper Partition Chromatography, Analyst 78: 641—646.
- Faitelowitz A., 1930, Zur Kenntnis des Nicotinabbaus im Tabak, Biochem. Z. 224: 460.
- Frankenburg W. G., 1955, Nicotine Degradation in vitro Induced by Agents from Tobacco Seed., Nature (Lond.) 175(4465): 945.
- Gocheaux, Moyens, 1949, Investigations into Atropine Metabolism in the Animal Organism, Acta Pharmacol. et Toxicol. 5: 95—109.
- Gray P. H., Lachance R. A., 1956, Assimilation of Berberine by Bacteria, Nature (Lond.) 177: 1182.
- Hochstein L. J., Rittenberg S. C., 1959 a, The Bacterial Oxidation of Nicotine. I. Nicotine Oxidation by Cell Free Preparations, J. B. C. 234(1): 151—155.
- Hochstein L. J., Rittenberg S. C., 1959b, The Bacterial Oxidation of Nicotine. II. The Isolation of the First Oxidation Product and its Identification as (1)-6-hydroksynicotine, J.B.C. 234(1): 156—160.
- Kączkowski J., 1959, Badania nad biologicznym rozkładem alkaloidów tropanowych w powiązaniu z drogami ich biosyntezy (praca doktorska wykonana w Kat. Biochemii SGGW, nie opublikowana).
- Kraut K., 1863, Über das Atropin, Annalen 128: 280—285.
- Lockheed, Burton, 1953, Canad. J. Botany 31, 7. L. C. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology VII Ed. London 1957, p. 611—612.
- Long A. G., Quagh J. R., Stedman R. J., 1951, The Separation of Acids by Paper Partition Chromatography, J. Chem. Soc. 2197—2201.
- Küster E., 1952, Abbau heterocyclischer N-Verbindungen durch verschiedene Bodenmikroorganismen, Zbl. Bacter. Parasit. 158: 350—357.
- Lossen W., 1866, Über das Atropin, Annalen 138: 231—241.
- Łypacewicz J., 1930, Rozkład alkaloidów przez bakterie, Acta Soc. Bot. Pol. 7(4): 553—582.
- Możejko M., 1952, Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe (praca magisterska wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin UW pod kierunkiem K. Bassalika, nie opublikowana).

- Możejko-Toczko M., 1958, Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini* (praca doktorska, wykonana w Zakładzie Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, nie opublikowana).
- Reifer I., Buchowicz J., 1955, Mikrometoda oznaczania alkaloidów tropowych w materiale roślinnym, *Acta Biochim. Polon.* 2: 187—198.
- Robinson R., 1955, Biogenesis of Alkaloids in Solanaceae, *Nature (Lond.)* 172: 344—345.
- Thies H., Storgenfrey Cl. H., 1958, Über die spektrophotometrische Bestimmung von Alkaloiden in ultravioletten Spektralbereich bei 2637 Å, *Arch. Pharm.* 291/63 (2): 68—76.
- Toczko K., 1958, Mikrobiologiczny rozkład nikotyny, *Acta Biochim. Polon.* 5(4): 373—379.
- Wada E., 1956, Microbial Degradation of Nor-nicotine, *Arch. Biochem. Biophys.* 64: 244.
- Wada S., Yamasaki K., 1954, Degradation of Nicotine by Soil Bacteria, *J. Am. Chem. Soc.* 76: 155.
- Werle E., 1938, Über Entgiftung von Nicotin durch tierische Gewebe, *Biochem. Z.* 298: 267.
- Werle E., Über die Histamin-zerstörende Fähigkeit von Bakterien, *Biochem. Z.* 306: 265.
- Werner G., 1958, Untersuchungen über den Abbau von Tropan-Alkaloiden durch Esterasen, IV International Congress of Biochemistry, Wien, Abstracts of Communications 4—3, 37.
- Willstätter R., 1896, Zur Kenntnis von Tropinon und Nortropinon, *B.* 29: 1575 i 1584.
- Zwirblis P., Socholitzky I., Kondritzer A. A., 1956, The Kinetics of Hydrolysis of Atropine, *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 45(7): 450—454.