BULLETIN DE L'ACADÉMIE
POLONAISE DES SCIENCES
Cl. V. — Vol. VIII, No. 10, 1960
Série des sciences biologiques

BIOCHEMISTRY

The Influence of Certain Metabolites Formed During Microbial Dissimilation of Carbohydrates on the Formation of 2,3 Butanediol in the Cultures of *B. polymyxa*

by

KRISHNA BAHADUR and S. RANGANAYAKI

Presented by E. PIJANOWSKI on August 24, 1960

The formation of 2,3 butanediol in the cultures of *B. polymyxa* has been studied in considerable detail [1], [2] and several carbohydrates have been used as substrate for this fermentation [3], [4]. It has been suggested that 2,3 butanediol is formed as reserve food for the microorganism and on increasing the period, the quan ity of 2,3 butanediol considerably decreases [5]. Several organisms have been reported which consume 2,3 butanediol as the sole source of carbon food [6] in which process it is converted to pyruvic acid and acetaldehyde, through methyl acetyl carbinol stage. It has been reported that 2,3 butanediol is formed by the reduction of methylacetylcarbinol which in its turn is formed by the condensation of pyruvic acid and acetaldehyde [8]. Both of these are formed according to the classic mechanism of ethyl alcohol formation sugges ed by Kluyver and Meyerhof [9], [10].

In the ethyl alcohol fermentation, acetaldehyde, glycerol, glyceraldehyde, malic acid and acetates are the chief metabolites. This work has been carried out with a view to verify whether the formation of 2,3 butanediol occurs through the py uvic acid stage, and whether it results from the condensation of acetaldehyde under the influence of specific enzymes, and so an effort has been made to investigate the possibility of increasing the 2,3 butanediol in the cultures of *B. polymyxa* by the addition of small doses of acetaldehyde, malic acid, glycerol, glyceraldehyde and acetate which are formed during the course of alcoholic fermentation.

Experimental

Molasses was diluted and a known volume of the solution was taken in six flat bottom flasks and diluted to 150 ml while adjusting its *pH* to 6.4. The amount of sugar present in each was determined by analyzing the same volume of diluted molasses. To five of the flasks the different organic substances were added in the given volume or weight as the case may be. Some of them, due to their volatile nature, were added after sterilization. The flasks were cotton plugged and sterilized in an autoclave at 15 lb. pressure for 20 min. The culture media were allowed to incubate at 30°C

for 24 hours and resterilized as above. After cooling, they were inoculated with an actively growing culture of *Bacillus polymyxa*.

The cultures were kept in an incubator at 30°C for 15 days and they were analyzed for their acid, sugar, and butanediol contents. For the analysis 50 ml of each culture were pipetted out under sterile conditions so as to avoid the cultures becoming infected.

The analysis revealed that in the cultures containing glycerine and acetaldehyde, the amount of butanediol present was quite appreciable. So a second set of cultures was prepared as follows.

The following substances were weighed out:

$CaCO_3$—0.2 g; $MgCO_3$—0.2 g, Na_2HPO_4—0.2 g, K_2SO_4—0.2 g, NaCl—0.2 g.

They were digested in a minimum quantity of dilute hydrochloric acid, and 2 g of ammonium sulphate was added to the mixture. The mixture was made up to 400 ml while adjusting the *pH* to 6.5, and 50 ml of this solution were pipetted out into each of five round bottom flasks. To four of them, 1, 2, 4 and 6 g of glycerine were added. To the last, 5 g of sucrose were added. These were diluted to 175 ml each. The flasks were cotton plugged and sterilized as described before. After resterilization, they were inoculated with 25 ml of the above glycerine culture. Glycerine culture was selected due to the fact that glycerine is converted into acetaldehyde according to the accepted scheme of alcoholic fermentation.

After forty days of incubation, the cultures were analyzed. The sugar present in the glycerine cultures was due only to the seed culture.

The amount of the sugar, acid and diol contents of the culture used in inoculum was taken into consideration while determining their contents in the culture.

The analysis of reducing substances expressed as invert sugar was carried out by directly titrating a standard Fehling's solution at its boiling point with the culture solution using methylene blue as indicator. To determine the total sugar present, a known volume of the culture solution was first hydrolyzed with diluted hydrochloric acid by boiling the mixture for 5 min. To the mixture was added, after cooling, sodium hydroxide followed by excess of Fehling's solution. This mixture was boiled till the precipitation of copper oxide was complete. The precipitate was filtered, washed and dissolved in ferric sulphate solution. The resulting ferrous sulphate was titrated against a standard dichromate solution using N-phenyl anthranilic acid as indicator. From this value, the amount of sugar in the culture was calculated. Standardization of the dichromate solution was done by a similar titration with a standard solution of sugar.

Butanediol was estimated by the method of Mouren and Dode [11] with a slight modification. Instead of precipitating the acetoin formed as Ni-dimethylglyoxime, it was allowed to be trapped in a solution of dinitrophenylhydrazine. The hydrazone formed was allowed to stand overnight in the reagent solution to ensure complete precipitation. The precipitate was filtered, washed, dried and its weight was determined. From this the quantity of butanediol formed in the culture was determined.

The results of the analyses of the two sets of cultures are tabulated below. The amounts of the different substances are per 100 ml of the fermented medium (next page).

Results

The cultures containing acetaldehyde indicate the largest yield of 2,3 butanediol in the culture. It appears that acetaldehyde is one of the intermediates in the formation of 2,3 butanediol. This may be ascribed to the condensation of pyruvic acid and acetaldehyde to give acetylmethylcarbinol as suggested by Slade [8].

Glycerine also sustains the yield of 2,3 butanediol considerably high. Acetate formed by the action of acetic acid, calcium carbonate and malic acid favours

TABLE

Effect of different metabolites on butanediol formation in *B. polymyxa* cultures
Amount of sugar initially present — 5.07 g

Name of org. compouds added	Quantity in 100 ml	Acid produced in g eqvts	Reducing sugar present after fermentation in g	Total sugar left in g	Total sugar consumed	Butanediol present after fermentation	% yield on the basis of sugar added	% yield on the basis of sugar consumed	Amount of glycerine	Acid formed in g eqvts	Reducing sugar present in g	Total sugar present in g	Butanediol formed	Total sugar consumed	% yield on the basis of sugar consumed
Acetaldehyde	2 ml	0.0008	1.65	3.64	1.43	0.23	4.54	16.1	1 g	0.0045	0.22	0.06	—	0.57	—
Malic acid	2 g	0.0236	3.84	4.77	0.30	0.09	1.77	30	2 g	0.0035	0.45	0.14	—	0.49	—
$CaCO_3$ + acetic acid	1 g + 2 ml	alkaline	2.00	3.80	1.27	0.101	1.99	7.2	4 g	0.0035	0.14	0.15	—	0.58	—
Glycerine	2 ml	alkaline	4.14	2.53	2.54	0.22	4.33	8.7	6 g	0.0025	0.15	0.05	—	0.58	—
Glyceraldehyde	2 ml	alkaline	0.99	4.79	0.28	0.06	1.18	21.4	5 g sucrose	0.0005	0.78	0.56	0.048	5.07	0.95

the increase of 2,3 butanediol formation. A considerable quantity of reducing substances is formed when malic acid or glycerine is added to the culture.

The cultures which contained different concentrations of glycerine as the chief source of carbon did not indicate any formation of 2,3 butanediol, when analyzed after 40 days, though a thick growth of organism was observed in the culture.

These experiments indicate that *B. polymyxa* grows in sucrose cultures forming 2,3 butanediol together with other metabolites. The cultures which contained additional acetaldehyde, glycerol or acetate, show considerable increase in the yield of 2,3 butanediol. The glycol formation is least in cultures which contain glyceraldehyde or malic acid.

It has been further observed that in the presence of malic acid or glycerine in *B. polymyxa* cultures containing molasses sugar as the source of carbon, a high yield of reducing material is obtained the quantity being least in the culture containing glyceraldehyde or acetaldehyde. However, in the case of glyceraldehyde the production of the diol is also least. Thus, it appears that the presence of acetaldehyde not only helps in the formation of 2,3 butanediol but it also keeps the oxidation-reduction potential of the culture from becoming positive by increasing the reducing property and also by reducing the acidity of the culture.

The low yield of 2,3 butanediol in cultures containing malic acid can be accounted for by the fact that, though a considerable quantity of reducing material is formed in the culture, a large quantity of acid is initially present. This increase in the acidity of the cultures decreases the negative oxidation reduction potential of the culture and the resultant potential is not favourable for the formation of the glycol.

The cultures, containing different concentrations of glycerols as the chief source of carbon, indicate the formation of very little reducing material in the culture together with the formation of acidity in the culture. These two factors adversely affect the optimum oxidation reduction potential of the culture. Thus glycerol helps in the formation of 2,3 butanediol when present in the cultures of *B. polymyxa* containing molasses sugar as the source of carbon, a considerable quantity of reducing materials are formed in the culture, and the *pH* of the culture remains towards the alkaline side. If glycerol is used as the chief source of carbon for the organism, the organism does grow in the culture, but the formation of reducing material in the culture is low. A little of acid is formed and 2,3 butanediol is not at all produced.

Summary

The cultures of *B. polymyxa* containing molasses sugar as the source of carbon indicate larger yield of 2,3 butanediol if a small quantity of acetaldehyde is added to the culture. Other substances which also help in increasing the diol yield are glycerine and acetate. A large quantity of reducing materials are formed in the cultures which contain glycerol or malic acid together with molasses sugar as the source of carbon. No such reducing material is formed if glycerol is used as the chief source of carbon and though an appreciable growth of the micro-organism is observed in the cultures, there is no formation of 2,3 butanediol.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, ALLAHABAD UNIVERSITY, ALLAHABAD (INDIA)

REFERENCES

[1] G. A. Ledingham, G. A. Adams and R. Y. Stanier, Can. J. Research, F **23**, (1945), 48.

[2] G. A. Adams and J. D. Leslie, Can. J. Research, F. **24** (1946), 12.

[3] A. C. Neish and G. A. Ledingham, Can. J. Research, **27B** (1949), 694—704.

[4] G. A. Adams and R. Y. Stanier, Can. Research **B. 23** (1945), 1.

[5] M. Mooreman, J. P. Aubert, M. Lemoigne and J. Millet, Ann. inst. Pasteur, **78** (1950), 497—511.

[6] Elliot Juni and Gloria, A. Meym., J. Bacteriol., 2. (1956), 425—32.

[7] J. Harold, Strecker and Isac Hanary, J. Biol. Chem., **211** (1954), 263—70.

[8] H. D. Slade and C. H. Werkman, Arch-Biochem., **2** (1943), 97—111.

[9] Kluyver A. J., Ergeb. Enzymforch., **4** (1935), 230—273.

[10] O. Meyerhof, Nature, **141** (1938), 855.

[11] H. Moureu and M. Dode, Bull. Assoc. chim. sucr. dist., **51** (1943), 247—50.

SEPARATUM

XXII 1-VI-1960 Fasc. 1

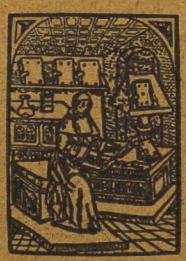
ENZYMOLOGIA

ACTA BIOCATALYTICA

Fundator: C. OPPENHEIMER
Edenda Curavit: W. ROMAN

EDITORES:

F. CEDRANGOLO, Napoli — V. DEULOFEU, Buenos Aires — W. A. ENGELHARDT, Moskva — L. GENEVOIS, Bordeaux — F. HAUROWITZ, Bloomington, Ind. — O. HOFFMANN-OSTENHOF, Wien — K. P. JACOBSOHN, Lisboa — E. J. KING, London — K. MYRBÄCK, Stockholm — A. OPARIN, Moskva — D. L. SHRIVASTAVA, Lucknow — A. SZENT-GYÖRGYI, Woods Hole, Mass. — K. YAMAFUJI, Fukuoka



KRISHNA BAHADUR AND VISHNU CHANDRA

(Chem. Dept., Allahabad Univ. and Balwant Rajput Coll., Agra, India)

Studies on the influence of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean (Glycine Soja) urease

UITGEVERIJ DR W. JUNK — DEN HAAG — 1960

STUDIES ON THE INFLUENCE OF STANNOUS CHLORIDE ON THE DECOMPOSITION OF UREA BY SOYABEAN *(GLYCINE SOJA)* UREASE

BY

KRISHNA BAHADUR AND VISHNU CHANDRA

(Chem. Dept., Allahabad Univ. and Balwant Rajput Coll., Agra, India)

(with 5 figs.)

(18—I—1960)

Introduction

The influence of a large number of different types of substances including metallic ions on the decomposition of urea by urease has been reported in the literature. Metallic ions have usually acted as inhibitors. Silver ions were found to be strong inhibitors in citrate buffer at pH = 5.6 by KISTIAKOWSKY and coll.[1]). The influence of a large number of metal e.g. As, Se, Sb, Mn, Sn, Pb, Cd, Fe, Bi, Zn, Mg, Te, Hg, Co, Cu, and Ag was studied by A. J. J. VAN DE VELDE[2]). He found that certain elements like S, Se, As, Sb, Mn and Sn showed scarcely any effect on the decomposition of urea by urease obtained from soyabean meal. Pb, Cd, Fe, Bi and Zn were found to be clearly toxic and Ni, Mg, Te, Hg, Co, Cu and Ag were found to be strong inhibitors. RUKHELMAN[3]) reported that lead acted as an activator in a quantity of 50—350 g. An investigation about the influence of Pb^{++} ions was undertaken by us also, and it was found that it acted as an inhibitor in the decomposition of urea for some time, but after some time it activated the enzyme.

In the present investigation, an attempt has been made to study the influence of Sn^{++} on the decomposition of urea by urease. Tin belongs to the same group of the periodic table as lead, and it was expected that their influence on the urease activity may be similar, but it has been found, contrary to all expectations, that Sn^{++} ions act as strong activators for the enzyme.

Experimental

The following solutions were used:

Urea solution: A 4.0% solution of urea (A.R., B.D.H.) has been used.

Soyabean powder extract: A 0.5% suspension of soyabean (*Glycine soja* beans) powder (obtained by grinding Soyabean seeds) in distilled water was prepared. It was stirred for 15 minutes and then allowed to settle. The super-

natant liquid was filtered through glass wool. Stannous Chloride solution: A 0.2748 % solution of $Sn\,Cl_2.\,2\,H_2O$ (B.D.H.) in distilled water has been used. Phosphate buffer has been used.

Experiment No. 1. This experiment was done to study the influence of different concentrations of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean urease. A 4.0 % solution of urea has been decomposed by 20 ml of 0.5 % solution of soyabean powder in presence of different volumes (ranging from 2 ml to 25 ml) of a 0.2748 % solution of $SnCl_2.2\,H_2O$ at pH = 8.8.

11 flasks were set up each of which contained 60 ml 4.0 % urea solution (except for flask XI which did not contain any urea solution), 20 ml 0.5% soyabean powder extract, 20 ml phosphate buffer solution of pH = 8.8 and the following amounts of stannous chloride solution and water:

Flask	ml $SnCl_2$ solution	ml water
I	2	23
II	4	21
III	8	17
IV	12	13
V	15	10
VI	18	7
VII	21	4
VIII	23	2
IX	25	0
X	0	25
XI	0	45

The solutions in all the flasks were kept tightly corked and were covered by a few ml of soluene to prevent bacterial contamination and this was done in all the experiments.

5 ml of the reaction mixture from the different flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid daily for five days. Methyl red has been used as the indicator for titrations in all the experiments. The results are given in Table I and fig. 1.

TABLE I.

Influence of Stannous Chloride concentration on the decomposition of urea by soyabean urease (at pH = 8.8), as observed by the ml of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals

Flask	0 hr. 30° C	24 hrs. 29° C	48 hrs. 29° C	72 hrs. 30° C	96 hrs. 31° C	120 hrs. 31° C
I	1.70	2.70	3.35	3.55	3.95	4.40
II	1.75	3.60	5.10	5.05	6.05	6.00
III	1.70	5.65	8.75	8.90	11.65	11.10
IV	1.70	8.10	13.05	15.00	17.55	18.80
V	1.55	11.05	16.85	19.40	22.80	23.00
VI	1.45	15.40	21.00	24.40	26.70	28.80
VII	1.25	15.60	25.10	27.50	32.00	33.35
VIII	1.20	19.25	29.20	32.90	38.25	40.00
IX	1.05	21.50	33.85	37.95	43.30	45.70
X	1.85	2.35	2.95	3.20	3.55	4.20
XI	1.80	1.70	1.70	1.80	1.75	1.80

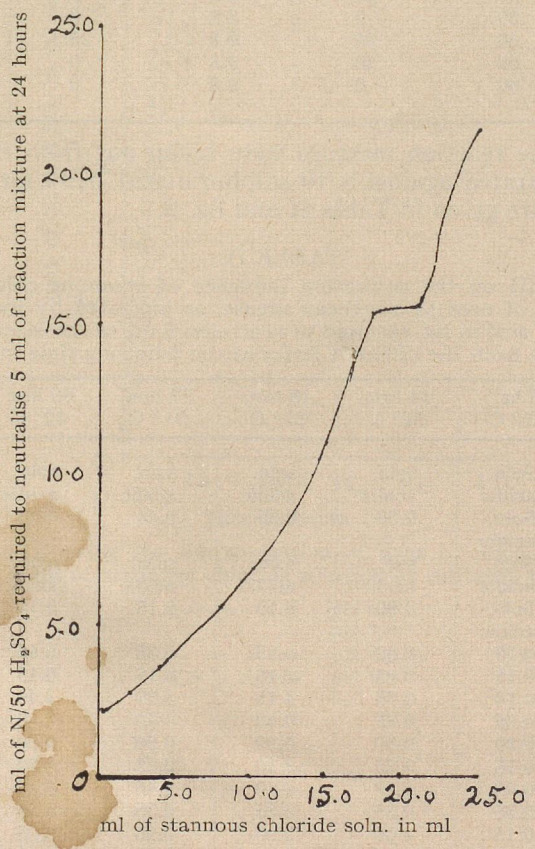


Fig. 1. Graph showing the influence of different volumes of stannous chloride solution on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 8.8, after 24 hrs (Table I)

Experiment No. 2. In this experiment, the decomposition of a 4.0% solution of urea by 20 ml of 0.5% soyabean powder extract in presence of 25 ml of 0.2748% solution of stannous chloride, at pH = 5.8, 6.8, 7.8, 8.8 and 9.8 has been studied.

The following were the contents of the different flasks:

	ml 4% urea soln.	ml 0.5% Soyabean extract	20 ml buffer soln. of pH	ml Stannous Chloride soln.	ml water
I	60	20	5.8	25	0
II	60	20	5.8	0	25
III	60	0	5.8	0	45
IV	60	20	6.8	25	0
V	60	20	6.8	0	25
VI	60	0	6.8	0	45
VII	60	20	7.8	25	0
VIII	60	20	7.8	0	25
IX	60	0	7.8	0	45
X	60	20	8.8	25	0
XI	60	20	8.8	0	25
XII	60	0	8.8	0	45
XIII	60	20	9.8	25	0
XIV	60	20	9.8	0	25
XV	60	0	9.8	0	45

5 ml of the reaction mixture were taken out from the various flasks, and titrated against N/10 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table II and fig. 2.

TABLE II.

Influence of pH on the activating influence of stannous chloride in the decomposition of urea by soyabean urease, as indicated by the volume of N/10 sulphuric acid in ml, required to neutralise 5 ml, of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following time intervals

Flask	0 hr. 31° C	24 hrs. 31° C	48 hrs. 31° C	72 hrs. 31° C	96 hrs. 32° C	120 hrs. 32° C
I	Soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
II	Soln. acidic	0.30	0.35	0.40	0.40	0.40
III	Soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
IV	Soln. acidic	3.90	6.10	6.15	6.15	6.25
V	0.15	0.30	0.35	0.35	0.40	0.50
VI	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
VII	0.10	3.35	4.15	4.30	4.40	4.45
VIII	0.35	0.35	0.40	0.40	0.40	0.45
IX	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
X	0.15	3.25	3.20	3.25	3.40	3.40
XI	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.45
XII	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
XIII	0.15	4.00	3.95	3.95	3.95	4.00
XIV	0.35	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
XV	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35

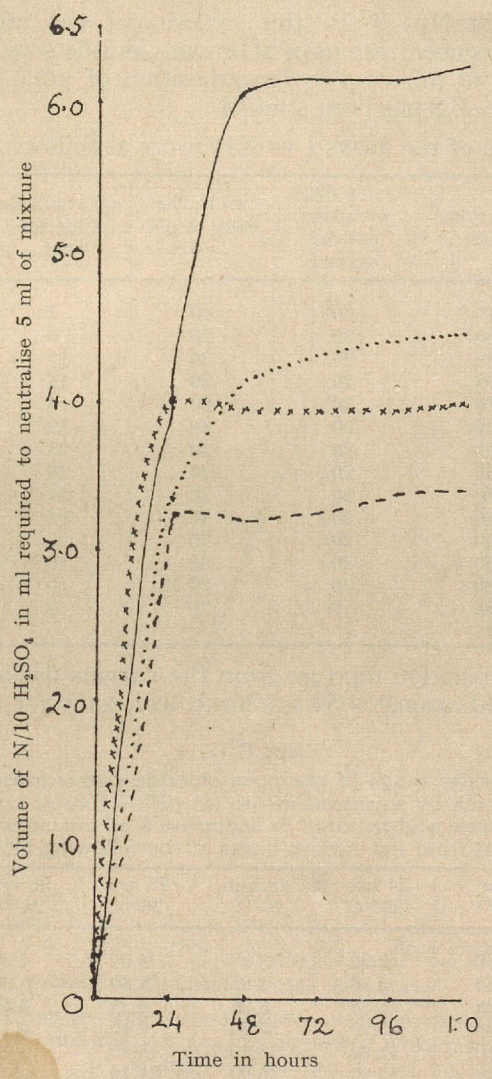


Fig. 2. Graph showing the decomposition of urea by soyabean urease in presence of 25 ml of stannous chloride solution at different pH. (Table II)

———— pH 6.8
. . . . . pH 7.8
— — — — pH 8.8
× × × × × × pH 9.8

Experiment No. 3. In this experiment the influence of a wider range of concentrations of stannous chloride solution (varying from 2 ml to 40 ml) on the decomposition of urea by soyabean urease at pH = 6.8 has been studied.

The contents of the flasks I to XIV were as follows:

	4% urea soln.	ml 0.5% soyabean powder extract	ml buffer soln. of pH = 6.8	ml stannous Chloride soln.	ml water
I	60	20	20	2	38
II	60	20	20	6	34
III	60	20	20	10	30
IV	60	20	20	14	26
V	60	20	20	18	22
VI	60	20	20	22	18
VII	60	20	20	25	15
VIII	60	20	20	28	12
IX	60	20	20	31	9
X	60	20	20	34	6
XI	60	20	20	37	3
XII	60	20	20	40	0
XIII	60	20	20	0	40
XIV	60	0	20	0	60

5 ml of the reaction mixture from the various flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days.

TABLE III.

Influence of a wider range of stannous chloride concentration on the decomposition of urea by soyabean urease (at pH = 6.8) as observed by the ml of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml of the reaction mixture taken out from the various flasks at the following intervals.

Flask	0 hr. 30° C	24 hrs. 29° C	48 hrs. 27° C	72 hrs. 26° C	96 hrs. 25° C	120 hrs. 24° C
I	0.60	2.60	3.30	4.00	4.00	4.05
II	0.50	3.10	4.65	5.80	5.90	6.50
III	0.35	3.55	5.25	6.55	6.55	7.90
IV	0.30	5.20	7.20	9.40	9.75	10.90
V	0.10	11.80	13.60	15.40	15.40	16.05
VI	soln. acidic	16.20	20.00	24.10	24.00	25.90
VII	soln. acidic	27.10	30.85	38.80	42.70	44.50
VIII	soln. acidic	27.20	29.10	36.00	38.25	38.80
IX	soln. acidic	24.65	28.95	35.30	38.25	38.85
X	soln. acidic	16.75	17.90	26.45	26.65	28.00
XI	soln. acidic	0.30	2.65	4.30	4.30	4.80
XII	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
XIII	0.75	1.60	1.85	1.90	1.90	2.10
XIV	0.65	0.65	0.60	0.60	0.60	0.60

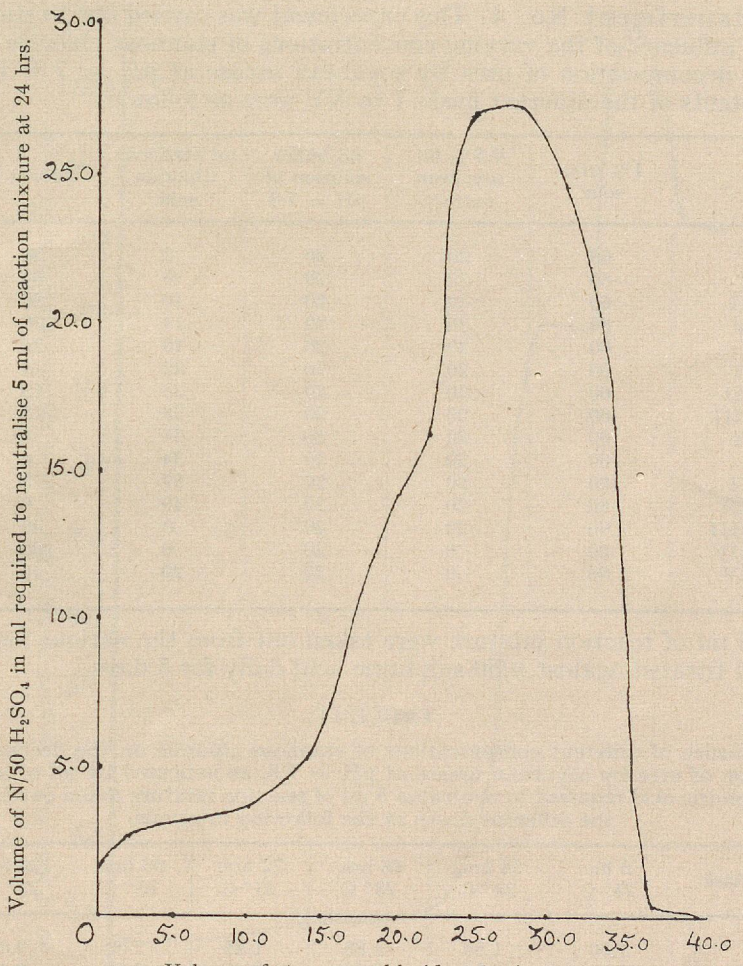


Fig. 3. Graph showing the influence of different volumes of stannous chloride solution on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 6.8 (after hours) (Table III).

Experiment No. 4. This experiment was carried out to study the influence of the varying concentrations of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean urease at pH = 7.8. The contents of the different flasks I to XV were as follows:

	4% urea soln.	0.5% ml soyabean extract	ml buffer solution of pH = 7.8	ml Stannous Chloride soln.	ml water
I	60	20	20	2	38
II	60	20	20	6	34
III	60	20	20	10	30
IV	60	20	20	14	26
V	60	20	20	18	22
VI	60	20	20	22	18
VII	60	20	20	25	15
VIII	60	20	20	28	12
IX	60	20	20	31	9
X	60	20	20	34	6
XI	60	20	20	37	3
XII	60	20	20	40	0
XIII	60	20	20	0	40
XIV	60	0	20	0	60
XV	60	0	20	20	40

5 ml of reaction mixture were taken out from the various flasks and titrated against N/50 sulphuric acid daily for 5 days.

TABLE IV.

Influence of different concentrations of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean urease at pH = 7.8, as indicated by ml of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml of reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 hr. 24° C	24 hrs. 24° C	48 hrs. 23° C	72 hrs. 23° C	96 hrs. 23° C	120 hrs. 23° C
I	1.50	1.55	1.85	1.85	2.00	2.00
II	1.40	1.60	2.10	2.20	2.40	2.40
III	1.25	1.75	2.20	2.45	2.70	2.70
IV	1.10	1.85	2.45	2.80	3.00	3.15
V	1.05	1.90	2.70	3.00	3.40	3.50
VI	0.85	2.15	3.00	3.40	3.85	4.30
VII	0.85	3.75	4.55	4.85	5.50	5.70
VIII	0.60	9.90	11.65	12.15	12.80	13.20
IX	0.50	9.80	13.30	13.30	13.25	13.25
X	0.50	13.90	14.85	15.90	16.70	16.80
XI	0.25	11.35	14.40	15.80	16.65	16.90
XII	0.15	11.20	12.30	15.75	17.80	17.80
XIII	1.60	1.70	1.70	1.70	1.70	1.80
XIV	1.45	1.45	1.45	1.45	1.50	1.50
XV	0.85	0.45	0.35	0.35	0.35	0.35

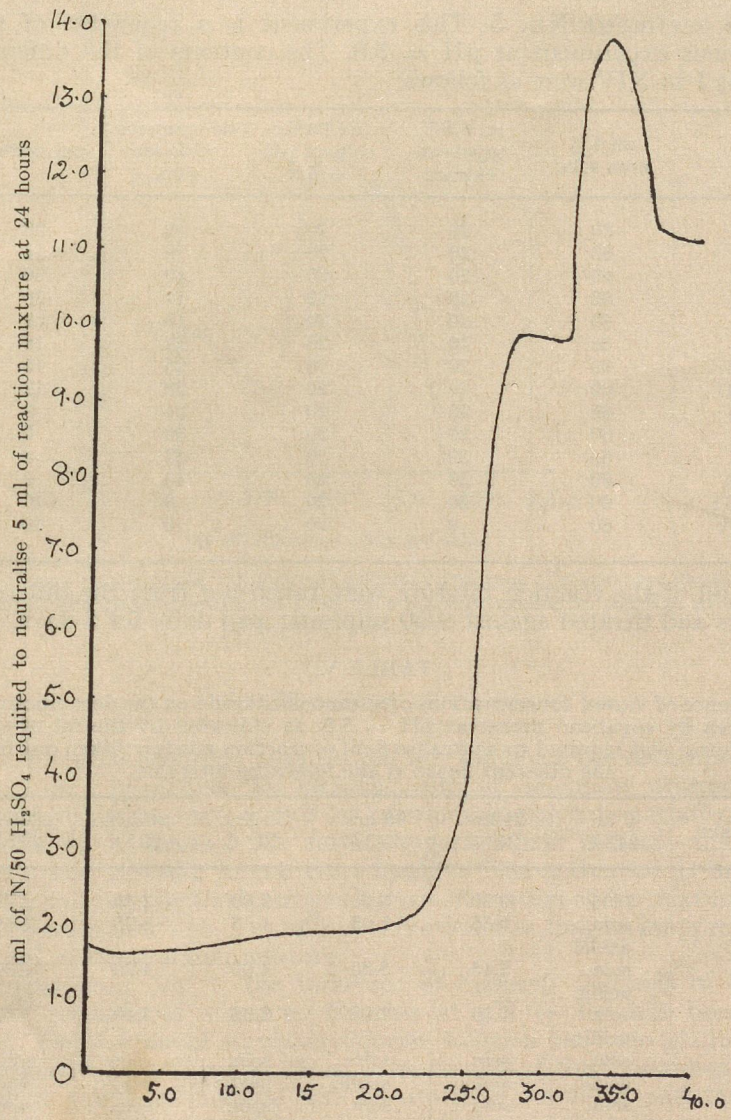


Fig. 4. Graph showing the influence of different volumes of stannous chloride solution on the decomposition of urea by urease at pH 7.8, after 24 hours (Table IV).

Experiment No. 5. This experiment is a repetition of the previous experiment at pH = 5.8. The contents of the different flasks I to XIV were as follows:

	ml 4 % urea soln.	ml 0.5 % soyabean extract	ml buffer soln. of pH = 5.8	ml stannous chloride soln.	ml water
I	60	20	20	2	38
II	60	20	20	6	34
III	60	20	20	10	30
IV	60	20	20	14	26
V	60	20	20	18	22
VI	60	20	20	22	18
VII	60	20	20	25	15
VIII	60	20	20	28	12
IX	60	20	20	31	9
X	60	20	20	34	6
XI	60	20	20	37	3
XII	60	20	20	40	0
XIII	60	20	20	0	40
XIV	60	0	20	0	60

5 ml of the reaction mixture were taken out from the different flasks and titrated against N/50 sulphuric acid daily for 5 days.

TABLE V.

Influence of varied concentrations of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean urease at pH = 5.8, as indicated by the ml of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml of reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flasks	0 hr. 24° C	24 hrs. 24° C	48 hrs. 24° C	72 hrs. 23° C	96 hrs. 23° C	120 hrs. 23° C
I	0.05	0.90	1.65	2.00	2.45	2.70
II	soln. acidic	0.55	1.05	1.55	1.75	2.15
III	soln. acidic	2.15	3.80	4.00	4.20	4.20
IV	soln. acidic	1.80	2.75	2.95	3.40	3.65
V	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
VI	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
VII	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
VIII	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
IX	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
X	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	so.n. acidic
XI	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
XII	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic	soln. acidic
XIII	0.15	1.00	1.40	1.55	1.60	1.80
XIV	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

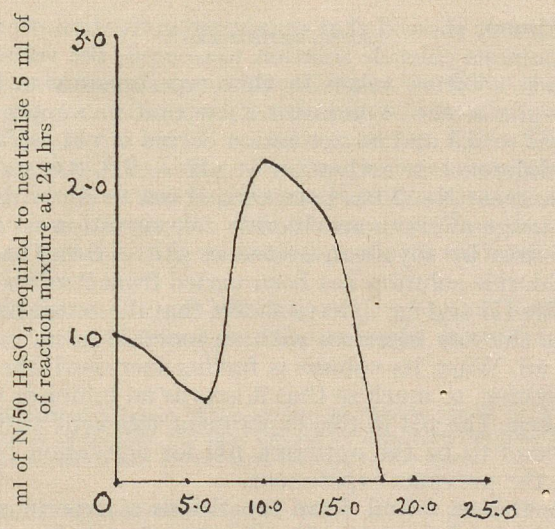


Fig. 5. Graph showing the influence of different volumes of stannous chloride solution on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 5.8, after 24 hours (Table V).

Discussion

V. D. VELDE[2]) observed that tin did not influence the decomposition of urea by urease. He included sulphur, selenium, arsenic, antimony and manganese in this list of minerals which do not affect the reactivity of urease. The results reported here indicate that stannous ions activate urease considerably. This activation is influenced, however, by the hydrogen ion concentration of the mixture and it appears that V. D. VELDE's observation was due to inappropriate pH of the reaction mixture.

In experiment No. 1, the influence of different volumes of a 0.2748% solution of stannous chloride at pH = 6.8 has been studied. The volume of stannous chloride solution has been gradually increased from 2 ml to 25 ml. The results of the experiment show that stannous chloride acts as a strong activator and the activation goes on increasing with an increase in the volume of stannous chloride solution as evident from the figures of Table I.

The experiment No. 2 has been carried out to study the effect of pH on the influence of stannous chloride in the decomposition of urea by soyabean urease. Buffer solutions of 5 different pH levels ranging from 5.8 to 9.8 have been tried. As the results of the pre-

vious experiment showed that maximum activation occurred when 25 ml of stannous chloride solution were used, the volume of stannous chloride solution taken in this experiment was kept at 25 ml. The results of the experiment show that maximum activation occurs at pH = 6.8 and no activation occurs at pH = 5.8. There is not much difference in activation at pH = 7.8, 8.8 and 9.8.

The experiment No. 3 has been carried out to study the influence of a wider range of stannous chloride concentration on the decomposition of urea by soyabean urease at pH = 6.8. The volume of stannous chloride solution has been varied from 2 ml to 40 ml. The results (Table III and fig. 3) have shown that the activating influence of stannous chloride increases with an increase in its volume from 2 ml to 25 ml. When its volume is further increased, the activation goes on lessening, so much so that it acts as an inhibitor when 40 ml of it are taken. The pH in this experiment was kept at 6.8, because this was found to be the optimum pH for activation by stannous chloride in the previous experiment.

Experiment Nos. 4 and 5 are repetitions of experiment No. 3 at pH = 7.8 and 5.8 respectively. Results of experiment No. 5 (at pH = 7.8) show that the activating influence of stannous chloride increases with an increase in its volume from 2 ml to 34 ml. When its volume is increased further, there is a slight decrease in the decomposition of urea during the first 48 hours (s. Table IV, flask X—XII). After this time the decomposition of urea is more or less equal with different volumes (ranging from 34 ml to 40 ml) of stannous chloride solution.

Results of experiment No. 5 (at pH = 5.8) show that maximum activation occurs with 10 ml of stannous chloride solution (Fig. 5). If the volume is increased further, the activation becomes less till with 18 ml of its solution, it acts as an inhibitor. It can thus be concluded that activation with stannous chloride increases with an increase in its concentration to a certain extent and then with a further rise in its concentration, the activation become less and finally with a still greater amount of it, it acts as an inhibitor.

Summary

The influence of varying concentrations of stannous chloride on the decomposition of urea by soyabean urease has been investigated at pH = 5.8, 6.8, 7.8 and 8.8. It has been observed that the activating influence of stannous chloride increases with a rise in its concentration to a certain limit, but that the activation decreases sharply at higher Sn^{++} concentrations until it finally acts as an inhibitor. The optimum pH for activation by stannous ions has been found to be 6.8. Small concentrations of stannous ions act as strong activators at this pH.

Zusammenfassung

Der Einfluss verschiedener Konzentration von Zinn-II-chlorid auf die Zersetzung von Harnstoff durch Sojabohnen-Urease wurde im pH-Bereich pH = 5,8 bis pH = 8,8 untersucht. Es wurde gefunden, dass Zinn-II-chlorid die Urease-Wirkung mit zunehmender Konzentration aktiviert, aber nur in geringen Konzentrationen. In höheren Konzentrationen nimmt die Aktivierung des Zinn-II-chlorids mit zunehmender Sn^{++}-Ionen-Konzentration ab, bis schliesslich diese als Hemmstoffe wirken.

Das pH-Optimum für die Wirkung der Sn^{++}-Ionen liegt bei pH = 6,8, bei welchem pH Sn^{++}-Ionen bedeutende Aktivierung hervorrufen.

Acknowledgement: Thanks of the authors are due to Dr. R. N. SINGH Head of the Department of Chemistry, Balwant Rajput College Agra, for allowing the necessary laboratory facilities and for his kind interest in the work.

1) F. Amrose, G. B. Kistiakowsky, G. Kridl, Jl. Am. chem. Soc. **73**, 1232-6 (1951).
2) A. J. J. Vande Velde, Mededel. Koninkl. Vlaam. Acad. Wetenschap. Belgium, Klasse Wetenschap **9**, No. 12, 13 (1947).
3) A. A. Rukhelman, Ukrain, Biokhem. Zhur. **10**, 5 (in Russian) (in French 21-2) (1937).

A COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF PO_4''' CONCENTRATION OF THE ASSIMILATION OF Ca^{++}, Mg^{++}, AND PO_4''' BY PICHIA INDICA UNDER AEROBIC AND ANAEROBIC CONDITIONS

KRISHNA BAHADUR AND HARISH CHANDRA VERMA

Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahahad

REPRINTED FROM
THE JAPANESE JOURNAL OF MICROBIOLOGY
Vol. 4, No. 3, pp. 243~248, July, 1960

PUBLISHED BY
THE JAPAN BACTERIOLOGICAL SOCIETY
TOKYO, JAPAN

Japan. J. Microb., Vol. 3, No. 1, 1960 UDC: 576. 882. 822. 095. 3

A COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF PO_4''' CONCENTRATION OF THE ASSIMILATION OF Ca^{++}, Mg^{++}, AND PO_4''' BY PICHIA INDICA UNDER AEROBIC AND ANAEROBIC CONDITIONS

KRISHNA BAHADUR AND HARISH CHANDRA VERMA

Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad

(Received February 20, 1960)

It has been known that oxygen profoundly influences the growth of most microorganisms. It was Pasteur[1] who had first noted that aerobic conditions favored growth of the yeast cells and anaerobic conditions led to faster utilization of sugar. Delbruch and Hayduck[2] also supported the view of Pasteur and confirmed the importance of oxygen in yeast growth. Windisch[3] observations support the above statement. Mayerhof[4] found that in the presence of oxygen, the fermentation was reduced. Brown[5] observed that under anaerobic conditions the fermentation can take place with the reproductive yeast cells. Though much work has been done on the effect of carbon dioxide or oxygen on the yield and growth of yeasts and other microorganisms, very little work has been done on the influence of aerobic and anaerobic conditions on the comparative assimilation of essential mineral nutrients by the cells.

In this paper the influence of PO_4''' concentration on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++}, and PO_4''' by Pichia indica[6] and on the metabolism of carbon and nitrogen of the yeast cells has been studied under aerobic and anaerobic conditions. (If the results of both aerobic and anaerobic conditions are compared in mgm of minerals assimilated for the growth of one gram of yeast cells). It is interesting to note that though the growth of yeast cells remains small under anaerobic conditions, a fairly large quantity of minerals are assimilated by the cells.

EXPERIMENTAL

Eight culture media were prepared, each containing calcium carbonate 0.1 gm, sodium chloride 0.1 gm, magnesium carbonate 0.15 gm, potassium sulphate 0.15 gm, zinc sulphate 0.025 gm, ammonium sulphate 1.25 gm and sucrose 10 gm. Appropriate amounts of disodium hydrogen phosphate to supply the quantity of PO_4''' indicated in the table were added to the culture media.

The above minerals were weighed and digested with a small amount of dilute hydrochloric acid and distilled water. The total volume of each culture

medium was made up to 200 ml and their pH was adjusted to 4.5.

The culture media were sterilized in an autoclave for half an hour at 15 lbs pressure. On cooling, the culture media were seeded with a trace of an activated sample of *Pichia indica* using a sterilized platinum wire.

To four culture media, 20 ml of sterilized liquid paraffin were added carefully to avoid the contact of the culture media with atmospheric air.

The cultures were kept at room temperature, which varied between 28° and 32°C during the period of fermentation. These culture media were analysed after 18 days. Before fermentation, each culture medium contained 10 gm of sucrose, 25.0 mgm of nitrogen, 41.50 mgm of Ca^{++} and 43.35 mgm of Mg^{++}.

Determination of Yeast weight:

The yeast cells were separated from the culture solution by filtration through a dried and weighed filter paper. Yeast cells were washed 3 or 4 times with distilled water, dried at 70°~80°C in an air oven, cooled in a desiccater and weighed.

Culture solution:

The culture solution together with the washings of the yeast cells were collected in a 250 ml volumetric flask and brought to the volume.

Estimation of sucrose:

Sucrose was estimated by Lane Eynen method[7].

Estimation of nitrogen:

Table 1. The influence of PO_4''' concentration of the nitrogen utilisation and the yeast growth under aerobic conditions.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mgm)	Total nitrogen utilized by yeast cells (mgm)	Amount of nitrogen utilized per gram of yeast cells (mgm)	Yeast grown (gm)
1	26.50	105.4	110.1	0.9568
2	53.00	73.5	59.9	1.2424
3	79.50	120.0	113.2	1.1492
4	132.50	87.16	78.2	1.1068

Table 2. The influence of varying the PO_4''' concentration on the nitrogen utilization and the growth of yeast under anaerobic conditions.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mgm)	Total nitrogen utilizen by yeast cells (mgm)	Amount of nitrogen utilized per gram of yeast cells (mgm)	Yeast grown (gm)
1	26.50	10.6	108.6	0.0976
2	53.00	26.9	130.8	0.2056
3	79.50	5.1	35.9	0.1420
4	132.50	18.8	181.4	0.1036

Table 3. The influence of PO_4''' on the consumption of sucrose and the percentage yield of yeast on the basis of sucrose consumed under aerobic conditions.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mgm)	Total sucrose consumed by yeast cells (gm)	Amount of sucrose consumed per gram of yeast cells (gm)	% yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed
1	26.50	5.55	5.80	17.28
2	53.00	4.79	3.85	25.80
3	79.50	6.07	5.28	18.92
4	132.50	6.37	5.75	17.36

Table 4. The influeuce of PO_4''' on the consumption of sucrose and the percentage yield of yeast on the basis of sucrose consumed under anaerobic conditions.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture (mgm)	Total sucrose consumed yeast cells (gm)	Amount of sucrose consumed per gram of yeast cells (gm)	% yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed
1	26.50	2.90	29.71	3.26
2	53.00	2.74	13.32	7.48
3	79.50	2.04	14.36	6.98
4	132.50	1.95	18.82	5.30

Table 5. The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' at different PO_4''' concentration in the culture medium under aerobic condition.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mgm)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mgm)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mgm)
1	26.50	10.79	11.24	10.83	11.32	13.43	14.04
2	53.00	12.29	9.89	12.28	9.88	18.16	14.62
3	79.50	15.13	13.26	14.45	12.57	27.24	23.70
4	132.50	13.8	12.49	13.72	12.40	23.63	21.35

Table 6. The ossilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' at different PO_4''' concentration in the culture medium under anaerobic conditions.

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially the culture medium (mgm)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mgm)	Total Mg^{++} abosrbed by yeast cells (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mgm)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mgm)
1	26.50	3.84	39.84	7.22	74.02	5.49	56.33
2	53.00	3.07	14.95	5.78	28.11	5.10	24.80
3	79.50	5.38	37.89	8.67	61.05	7.21	50.8
4	132.50	4.61	44.51	2.99	28.86	10.67	103.0

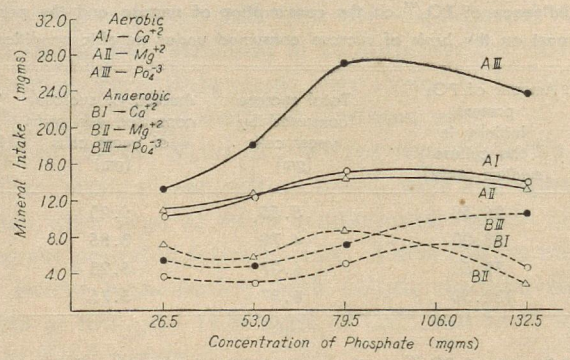


Figure 1. Total intake of the minerals by P. Indica under aerobic and anaerobic conditions.

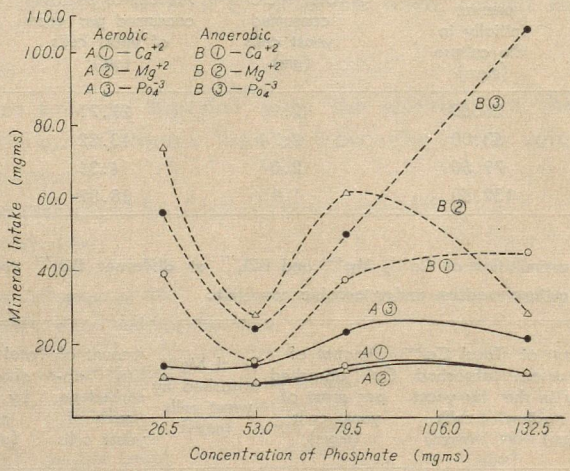


Figure 2. Minerals assimilated for the growth of one gram of the yeast under aerobic and anaerobic conditions.

The amount of nitrogen was estimated by Kjeldahl and Gunning method[8,9,10,11,12].

Estimation of phosphate, calcium and magnesium:

The phosphate[13], calcium[14], and magnesium[15] of the culture solution were estimated colorimetrically.

Observation:

The results obtained by the various estimations of the culture media are tabulated in Tables 1~6 and Figures 1~2.

DISCUSSION

It has been observed that air greatly influences the yeast yield. The growth

of yeast is slight under anaerobic conditions. Maximum growth is obtained at 53.0 gm of PO_4''' concentration per 200 ml culture medium in both cases; *i.e.*, under aerobic and anaerobic conditions.

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' increases with the increase in concentration of PO_4''' in the culture media up to 79.5 mgm per 200 ml. At a maximum concentration of PO_4''' in the culture medium, 132.50 mgm of PO_4''', the mineral intake is less as compared to that at lower concentrations. However, it is interesting to note that under aerobic conditions the assimilation of Mg^{++} and Ca^{++} is almost equal at all concentration, except at 79.5 mgm of PO_4''' concentration per 200 ml of culture medium where the intake of Mg^{++} is less than Ca^{++}.

The mineral intake is greatly influenced by the absence of air in the culture media. Under anaerobic conditions, the assimilation of Ca^{++} and Mg^{++}, and PO_4''' for the formation of one gram of yeast cells, increased considerably. It has been observed that at 53.0 mgm of PO_4''' concentration per 200 ml culture medium, a minimum intake of minerals has taken place.

Under aerobic conditions, maximum quantity of nitrogen is consumed at a concentration of 79.5 mgm of PO_4''' per 200 ml of the culture medium, while in the case of anaerobic condition the maximum quantity of nitrogen is consumed in the presence of maximum concentration.

Under aerobic conditions, the consumption of sucrose, on the basis of formation of one gram of yeast cells, is greater at a lower concentration except at the concentration which favours maximum yeast growth. However, under anaerobic conditions the total consumption of sucrose decreases with the increase in concentration of phosphate ions in the culture media.

SUMMARY

It has been observed that the presence of air greatly influences the assimilation of minerals, Mg^{++}, Ca^{++} and PO_4'''. Under anaerobic condition, mineral intake for the formation of one gram of yeast cells is high as compared to that under aerobic condition.

The yield of yeast is slight in culture media which were kept under anaerobic conditions. Maximum yield of yeast cells is observed at 53.0 mgm of PO_4''' concentration per 200 ml of the culture medium in both aerobic and anaerobic conditions.

Further, it is interesting to note that at the concentration of PO_4''' in the culture medium which forms maximum growth of yeast cells, the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' is least and also the consumption of sucrose and remains at a minimum. This has been found true for both aerobic and anaerobic conditions.

REFERENCES

(1) Pasteur, L., 'Etudes sur la Bier' (1876). Masson, Paris, Translated as "Studies on fermentation' (1928). The disease of Beer. Their causes and the means of preventing them by F. Faulkner and D. C. Robb., Am. Lib. Ser., New York (1945).
(2) Delbruch, M. and Hayduck, F., Die Garungs Fuhrung in Braweree, Brennerei and Presshefefabrik" Parey, Berlin, (1911), pp. 25-26.
(3) Windisch, F., Woehscher. Brau., 47, **33,** 45 (1930).
(4) Mayerhof, O., Biochem. Z., **162,** 43 (1925).
(5) Brown, J., Chem. Soc., **61,** 3 (1892).
(6) Bahadur, K., Zentr. Bakt. Parasit. Infect. Hyg., Abt. II, **110,** 305-308, (1957).
(7) Lane, J. H. and Eynon, L., J. Soc. Chem. Ind., **42,** 32 (1923).
(8) Kjeldahl, J., Z. Anal. Chem., **22,** 366 (1883).
(9) Gunning, J. W., Z. Anal. Chem., **28,** 188 (1889).
(10) Arnold, C., Chem. Zentr., 337 (1886).
(11) Arnold, C., and Wedemeyer, Z., Anal. Chem., **31,** 525 (1892).
(12) Moore, H. C., Ind. Eng. Chem. **12,** 669 (1920).
(13) Holman, W. M., and Pollard, A. G., J. Soc. Chem. Ind., **56,** 339T. (1937).
(14) Alten, F., Weiland, H., and Knippenberg, E., Biochem. Z., **265,** 85 (1933).
(15) Alten, F., Weiland, H., and Kurmies, B., Angew, Chem., **46,** 697 (1933).

Printed by
KASAI PUBLISHING & PRINTING CO.
(*Pan-Pacific Press*)
Minato-ku, Tokyo, Japan

A STUDY ON THE INFLUENCE OF HYDROGEN ION CONCENTRATION OF THE CULTURE MEDIA ON THE FORMATION OF ACETONE AND BUTANOL BY CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM, CLOSTRIDIUM BUTYLICUS AND CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM USING SUCROSE AS SUBSTRATE IN A SYNTHETIC MEDIA

KRISHNA BAHADUR AND KAMLESH KUMARI SAROJ

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad, India

REPRINTED FROM
THE JAPANESE JOURNAL OF MICROBIOLOGY
Vol. 4, No. 4, pp. 341~349, October, 1960

PUBLISHED BY
THE JAPAN BACTERIOLOGICAL SOCIETY
TOKYO, JAPAN

Japan. J. Microb., Vol. 4, No. 4, 1960 UDC: 576. 851. 55. 095

A STUDY OF THE INFLUENCE OF HYDROGEN ION CONCENTRATION OF THE CULTURE MEDIA ON THE FORMATION OF ACETONE AND BUTANOL BY CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM, CLOSTRIDIUM BUTYLICUS AND CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM USING SUCROSE AS SUBSTRATE IN A SYNTHETIC MEDIA

KRISHNA BAHADUR AND KAMLESH KUMARI SAROJ

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad, India

(Received March 24, 1960)

The hydrogen ion concentration of the culture media profoundly influences not only the growth of the micro-organism but also their various metabolic activities[1]. Thus when an organism is being used for some specific fermentation it is essential that the optimum pH for the production of a particular metabolite be investigated under the conditions of the fermentation.

Fermentation of carbohydrates by *Clostridium pasteurianum*[2], *Cl. butylicus*[1] and *Cl. acetobutylicum*[3] have been studied in the formation of acetone and *n*-butanol. Considerable data have been accumulated when starchy[4] and saccharic material[5,6] were used as the substrates in fermentation, and appreciable amount of work has been done to understand the influence of nitrogenous[7,8] and inorganic substances in fermentation. To date only limited numbers of investigations have been reported on the influence of pH of the culture media on the formation of butanol and acetone by these organisms, using sucrose as substrate in synthetic media. It has been reported that *Clostridium acetobutylicum* shows satisfactory fermentation between pH 4.7 to pH 8, of which the range between pH 5 to pH 7 is most satisfactory. This is too wide a range for some specific fermentation, because even slight variations of pH sometimes show a great difference in the formation of metabolites by the organism. Neish and Coworker[10], while studying 2, 3 butanediol fermentation, observed that a change of pH of a culture medium from 5 to 8 causes appreciable alteration in the formation of 2, 3 butanediol and acetoin. The most common mechanism of butanol fermentation is believed to be through butyric acid stage[11]. A strong reducing redox-potential of the culture medium is essential for the formation of butanol[12], and it is thus extremely important to study the optimum pH for the formation of *n*-butanol and acetone by these clostridium organisms.

In this paper the influence of pH on the formation of *n*-butanol and acetone by the three species of clostridium was investigated using sucrose as the substrate in a synthetic medium. These cultures were analysed after 30

days and 60 days incubation in order to determine how the pH of the medium controls the formation of the metabolites with the increase of fermentation period.

EXPERIMENTAL

The medium of the following composition was prepared as the basic substrate for the fermentation studies:—

(1) Ammonium sulphate—0.17 grams.

(2) Magnesium sulphate—0.08 grams. Water—100 ml.

To this culture medium 10 gms of cane sugar were added. To study the influence of pH on the production of the desired compound a buffer solution of monopotassium dihydrogen phosphate and sodium hydroxide was added to prepare three series with pH's 6, 6.5, 7, 7.5, and 8.

Culture media were sterilized for 30 minutes in an autoclave, incubated at 30°C for 24 hours and resterilized as above. On cooling one series was inoculated with *Clostridium pasteurianum* IZ (563) ATCC (0013) IZ m. 16. Institute Zimotecnico microbiology, the second series with *Clostridum butylicus* IZ (380) IAL (15-152) IZ m. 16. Institute Zimotecnico microbiology, and the third series with *Clostridum aceto-butylicum* NRRL. B. 527 Illinois. The flasked media were kept at 35°C in an incubator for fermentation. The cultures were analysed after 30 days and 60 days.

Reducing Sugar—Ten ml of the culture medium were removed and made up to 50 ml. This solution was titrated against a standard Fehling solution, using methylene blue as an indicator.

Total sugar. Then ml of the culture medium were hydrolysed with 2 ml of dilute hydrochloric acid and boiled for two minutes. After cooling, 2 ml of sodium hydroxide solution was added to neutralise the acid, and the whole solution was made up to 50 ml. This solution was titrated against a previously standardised Fehling solution, using methylene blue as an indicator.

Acidity. Five ml of the culture medium was titrated against N/10 sodium carbonate solution using methyl orange as an indicator.

Volatile acid. Five ml of the culture medium were placed in a 100 ml distilling flask and 20 ml of distilled water were added to this. The solution was distilled and the distillate was trapped in a known volume of N/10 sodium carbonate solution. The quantity of volatile acid was determined by back titration of the excess of sodium carbonate solution against standard sulphuric acid.

Acetone—The determination of acetone was performed according to the method described by Messinger[13].

Five ml of the fermented solution were placed in a glass stoppered flask, and 50 ml of distilled water were added. To this mixture, 50 ml of 1-normal

sodium hydroxide solution were added and allowed to stand at room temperature for 5 minutes. To this solution 50 ml of 0.2 N iodine solution were added slowly from a burette with constant shaking. The mixture was allowed to stand at room temperature for 10 minutes. Then 50 ml of 1-normal sulphuric acid were added followed by 5 ml of dilute acetic acid. The excess of iodine solution was titrated immediately with 0.1-N sodium thiosulphate solution to a starch end point. A blank titration was carried out without the fermented solution to determine the loss of iodine in the experiment.

The quantity of acetone was calculated by Messinger's equation

$$CH_3COCH_3 + 39_3 + 4NaOH \rightarrow CH9_3 + CH_3COONa + 3NaI + 3H_2O$$

Butanol—5 ml of the culture medium were placed in a 100 ml distilling flask and 10 ml of dilute sulphuric acid, 25 ml of 2 N potassium dichromate solution, and 20 ml of distilled water were added to this. The whole solution was distilled to 2/3 its original volume. The distillate was trapped in a known volume of N/10 sodium carbonate solution. The butanol was oxdized to butyric acid, which when distilled reacted with sodium carbonate solution. The excess of sodium carbonate solution was titrated with standard sulphuric acid solution using methyl orange as indicator.

Living Cells. The method of Otto Bala'zs[14] was used to determine the number of living cells which are present in the culture medium.

The method consists in estimating the degree of nitrogenetic radiation emitted by the living cells employing potassium dichromate as an oxidizing solution. The living cells emitting such radiations consume the oxidizing solution. The results have been mentioned in terms of ml of N/1000 potassium dichromate solution which is reduced by the living cells. This gives an idea of the living cells present in the culture medium.

25 ml of the culture medium and 10 ml of 0.001 N potassium dichromate solution were mixed. The solution was kept for 2 hours. After two hours the excess of potassium dichromate solution was titrated against standard sodium thiosulphate solution using starch as an indicator.

OBSERVATIONS

The results obtained by the analysis of various culture media are tabulated below. The results express the values obtained by analyzing 100 ml of the culture media.

Table 1. Influence of pH on the consumption of sugar and the formation of acids in cultures of *Clostridium pasteurianum*, after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Reducing sugar left in grams	Total sugar left in grams	Sguar consumed in grams	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralize volatile acid
1	6.0	1.45	5.44	4.56	0.0636	0.1272
2	6.5	3.54	6.97	3.03	0.0795	0.1240
3	7.0	2.32	6.78	3.22	0.1007	0.0996
4	7.5	4.71	6.27	3.73	alkaline	0.0530
5	8.0	3.56	6.43	3.57	alkaline	0.1219

Table 2. Influence of pH on the formation of acetone and butanol in the cultures of *Clostridium pasteurianum* after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sguar consumed	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	ml of N/1000 potasium dichromate used by living cells
1	6.0	0.0020	0.04	2.495	24.95	9.4
2	6.5	0.0556	1.80	1.244	12.43	14.8
3	7.0	0.0029	0.09	1.977	19.77	12.9
4	7.5	1.2306	23.95	2.029	20.29	8.62
5	8.0	0.8478	23.76	2.562	25.62	5.60

Table 3. Influence of pH on the sugar consumption and acid formation by *Clostridium pasteurianum* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of reducing sugar left	Grams of total sugar left	Grams of sugar consumed	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralize volatile acid
1	6.0	2.06	8.84	1.16	0.0636	nil
2	6.5	4.8	7.61	2.38	alkaline	nil
3	7.0	4.05	5.26	4.73	alkaline	0.0106
4	7.5	3.77	4.66	5.33	alkaline	0.0265
5	8.0	6.11	7.38	2.61	alkaline	nil

Table 4. Influence of pH on the formation of acetone and butanol by *Clostridium pasteurianum* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sugar consumed	ml of N/1000 potassium dichromate used by living cell
1	6.0	0.686	6.86	0.7427	63.90	50.50
2	6.5	0.491	4.92	0.8119	34.04	17.30
3	7.0	0.745	7.45	0.8032	16.90	25.7
4	7.5	4.293	43.00	0.7982	14.90	35.8
5	8.0	1.748	17.48	0.7544	28.80	23.9

Table 5. Influence of pH on sugar consumption and acid formation by *Clostridium butylicus* after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of reducing sugar left	Grams of total sugar left	Grams of sugar consumed	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralise volatile acid
1	6.0	1.62	4.90	5.09	0.1219	0.1272
2	6.5	0.984	4 19	5.80	0.0848	0.1240
3	7.0	3.96	5.21	4.28	0.1166	0.0996
4	7.5	1.39	7.20	2.80	0.0901	0.0530
5	8.0	6.51	7.86	2.14	alkaline	0.1219

Table 6. Influence of pH on the formation of acetone and butanol by *Clostridium butylicus* after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sugar consumed	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	ml of N/1000 potassium dichromate used by living cells
1	6.0	0.324	6.36	0.752	7.53	12.15
2	6.5	0.0946	1.62	0.985	9.85	22.15
3	7.0	0.0022	0.04	1.136	11.36	27.15
4	7.5	1.5075	53.78	2.358	23.5Z	64.20
5	8.0	0.8430	39.34	3.715	37.10	83.10

Table 7. Influence of pH on the consumption of sugar and acid formation by cultures of *Clostridium butylicus* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture	Grams of reducing sugar left	Grams of total sugar left	Grams of sugar consumed	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralize volatile acid
1	6.0	8.25	8.68	1.31	0.0583	nil
2	6.5	2.23	7.50	2.50	alkaline	0.0159
3	7.0	5.50	7.27	2.72	0.1272	nil
4	7.5	2.45	5.62	4.38	alkaline	0.0212
5	8.0	5.76	6.10	3.81	alkaline	nil

Table 8. Influence of pH on the formation of acetone and butanol by *Clostridium butylicus* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sugar consumed	ml of N/1000 potassium dichromate used by living cells
1	6.0	0.8029	8.03	0.6115	46.40	10.10
2	6.5	2.459	24.60	0.7515	30.05	47.80
3	7.0	2.452	24.53	0.7474	27.40	58.80
4	7.5	0.832	8.32	0.9192	20.01	8.30
5	8.0	2.832	28.32	0.8002	21.90	46.20

Table 9. Influence of pH on the sugar consumption and acid formation in the cultures of *Clostridium acetobutylicum* after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of reducing sugar left	Grams of total sugar left	Grams of sugar consumed	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralize volatile acid
1	6.0	2.72	9.15	0.85	0.0583	0.0212
2	6.5	0.75	5.69	4.31	0.0371	0.2014
3	7.0	1.83	7.98	2.02	0.0424	0.0954
4	7.5	5.69	7.17	2.83	0.0742	0.0530
5	8.0	Negligible	6.78	2.22	Alkaline	0.2321

Table 10. Influence of pH on the formation of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* after 30 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sugar consumed	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	ml of N/1000 potasium dichromate used by living cell
1	6.0	0.9462		2.9709	29.79	49.7
2	6.5	0.5790	13.40	1.135	11.34	26.66
3	7.0	1.294	64.21	2.423	24.23	18.7
4	7.5	1.452	51.40	2.117	21.17	74.2
5	8.0	0.2465	7.6	1.401	14.01	30.00

Table 11. Influence of pH on sugar consumption and acid formation by *Clostridium acetobutylicum* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of reducing sugar left	Grams of total sugar left	Grams of sugar consumed	Grams of sodium carbonate required to neutralize total acid	Grams of sodium carbonate required to neutralize volatile acid
1	6.0	5.21	7.87	2.13	alkaline	nil
2	6.5	1.84	8.04	1.96	alkaline	0.0424
3	7.0	2.32	6.11	3.89	alkaline	nil
4	7.5	3.07	5.32	4.68	alkaline	0.0106
5	8.0	3.04	8.77	1.23	alkaline	0.0424

Table 12. Influence of pH on the formation of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* after 60 days of fermentation.

Serial No.	pH of the culture medium	Grams of acetone formed	Percentage of acetone on the basis of sugar consumed	Grams of butanol formed	Percentage of butanol on the basis of sugar added	ml of N/1000 potassium dichromate used by living cells
1	6.0	0.1189	5.50	3.575	35.75	25.60
2	6.5	0.1856	9.40	0.780	7.798	7.20
3	7.0	0.1853	4.70	2.219	22.191	17.95
4	7.5	0.7338	15.60	0.978	9.781	25.70
5	8.0	0.2233	18.10	1.2018	12.018	2.90

DISCUSSION

Under the experimental conditions described above, *Clostridium pasteurianum* forms maximum quantity of butanol at pH 8 and acetone at pH 7.5. This is indicated by the analysis of the culture media after 30 days of fermentation. A pH of 6 is favourable for the formation of volatile acids. The optimum pH for the growth of clostridium is 7.5.

On analysis of the culture media after 60 days, maximum quantity of butanol is formed at about pH 7.5 and acetone yield is optimum at pH6. The acid content of the culture media is considerably decreased, and most of the cultures become alkaline. The number of living cells increases at pH 6, 6.5 and 7, but decreases at pH 7.5 and 8.

The analysis of the culture of *Clostridium butylicus* after 30 days indicates that the maximum quantity of acetone is formed at pH 7.5, and pH 8 favours the formation of maximum quantity of butanol. Acid formation is maximum at pH 6.5, and the optimum pH for the growth of the organism is 8.

The analysis of the above *Clostridium butylicus* cultures after 60 days show that maximum amount of acetone and butanol are formed at pH 8 and pH 6 respectively. However, the quantity is much less than what is obtained on the 30th day analysis. There is considerable increase in the number of living cells at pH's 7 and 6.5, but at pH's 8 and 7.5 the number of living cells are ocnsiderably lower.

Clostridium acetobutylicum gives maximum yelds of acetone and butanol at pH 7 and 6 respectively, but the optimum pH for its growth is 6 as is observed by the analysis of cultures after 60 days show an increase of butanol formation at pH 6, and the quantity of butanol formed is considerably decreased at other pH's. The quantity of acetone is considerably decreased at all pH's except 8. The number of living cells is considerably decreased in almost all of the culture media when the period of fermentation is increased.

The above observations indicate that the optimum pH necessary for the formation of butanol and acetone by three different *Clostridium* species varied. A pH of 8 is favourable for the formation of butanol by *Clostridium pasteurianum* and *Clostridium butylicus,* but maximum quantity of butanol formation is observed at pH 6 when *Clostridium acetobutylicum* is used as the fermenting organism. Usually these pH indicate optimum for butanol formation even after 60 days of fermentation with the exception of *Clostridium pasteurianum,* which shows maximum yield of butanol at pH 7.5 when the culture media is analysed after 60 days. The quantity of butanol decreases in most of the cases with the increase of period of fermentation, but it is interesting to note that the pH of the culture is also an important factor in this decrease. Thus the decrease cannot be accounted for by the loss of butanol due to slow evaporation only. It appears that the butanol which is once formed is subsequently changed to

some other compounds by certain enzymic systems which are differently affected by the pH of the medium.

The formation of acetone is maximum at pH 7.5 in the case of *Clostridium pasteurianum* and *Cl. butylicus,* but with *Clostridium acetobutylicum* the yield of acetone is maximum at pH 7. With an increase in the period of fermentation the formation of acetone is more at a comparatively lower pH in the case of *Cl. pasteurianum* and *Cl. butylicus; i.e.,* if the culture media are analyzed after 60 days, a maximum quantity of acetone is observed in culture having pH of 6. However, pH 8 is optimum for the formation of acetone by *Clostridium acetobutylicum* if the culture are analysed after 60 days.

SUMMARY

Clostridium pasteurianum, Clotridium bulylicus and *Clostridium acetobutylicum* can grow in a synthetic medium containing sucrose as the source of carbon. The optimum pH for the formation of butanol and acetone are different for the same organism and also varies wtih the organisms.

The range of pH's which are considered optimum for the formation of butanol, acetone and cell growth of the different clostridium species are as follows:—

Period of fermentation in days	Name of the organism	pH at which maximum yield of butanol is obtained	pH at which maximum yield of acetone is obtained	pH at which maximum cell growth takes place
30 days	Cl. pasteurianum	8.0	7.5	7.0
	Cl. butylicus	8.0	7.5	8.0
	Cl. aceto butylicum	6.0	7.0	6.0
60 days	Cl. pasteurianum	7.5	6.0	6.5
	Cl. butylicus	8.0	6.0	7.0
	Cl. aceto butylicum	6.0	8.0	7.5

REFERENCE

(1) Neish, A. C. *et al.*, Intern. Congr. Biochem. Abstrs. of Communs. 1st Congr. Cambridge, Engl. 533–5 (1949).
(2) Bowen, J. F. and Smith, E. S., Food Search, **20**, 650–8 (1955).
(3) McCoy, E. *et al.*, J. Infectious Diseases, **39**, 457 (1926).
(4) Underkolfler, L. A., Christengen, L. M. and Fulmer, C. I., Ind. Eng. Chem. **29**, 350 (1936).
(5) Sjolander, N. O., Langlykke, A. F. and Peterson, W. H., Butyl Alcohol Fermentations of Wood Sugars, Ind. Eng. Chem., **30**, 1251 (1928).
(6) Don Scott and Hiedrick, L. R., J. Bact., **63**, 795–803 (1952).
(7) Wilson, P. W., Peterson, W. H. and Fred, E. B., Jour. Bact., **19**, 231 (1930).
(8) Makoto Oda, J. Agr. Chem. Soc. Japan, **21**, 15 (1945).

(9) Prescott, S. C., and Dunn, C. G., Industrial Microbiology. Mc Grow-Hill Book Company 1 NC. 2nd edition, 325 (1949).
(10) Niesh, A. C. and Ledingham G. A., Can. J. Research, **273**, 694–704 (1949).
(11) Kluyver, A. J., "The Chemical Activities of Micro-organisms". University of London Press Ltd (1931).
(12) Hewitt, L. F., Oxidation Reducation Potentials in Bacteriology and Biochemistry. 5th Ed. London, Country Council, (1948).
(13) Messinger, J. Ber., **21**, 3366–72 (1888).
(14) Balazs Otto, Agrok'emsa' e's Talajtan, Tom, Tom. **3**, 1–2, 143 (1954).

Printed by
KASAI PUBLISHING & PRINTING CO.
(*PAN-PACIFIC PRESS*)
Minato-ku. Tokyo. Japan

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!
Sonderabdruck aus dem
Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 113
VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.
Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. ZLN 5087
1960

Nachdruck verboten.

[Chemistry Department, Allahabad University, India.]

The influence of aluminium oxide on the formation of 2,3 butanediol in the cultures of *Bacillus polymyxa*.

Krishna Bahadur and **S. Ranganayaki.**

The formation of 2,3 butanediol by the fermentation of carbohydrate materials has drawn a lot of attention during the recent years of rubber shortage for it can easily be converted into butadiene which is the basic material for the formation of Buna type of synthetic rubber. It has been observed that under the conditions optimum for cell growth the organisms which produce 2,3 butanediol as a metabolite during fermentation do not give a high yield of butanediol. It has also been observed that the 2,3 butanediol formed in the culture is reutilised by the organism if the period of fermentation is increased (1, 2, 3). Certain bacteria are known to assimilate 2,3 butanediol as the source of carbon (4) and it is suggested by HOOREMAN et al that the formation of 2,3 butanediol by the organism is only as an external reserve carbon for the organism (5).

Our observations under publication elsewhere indicate that the formation of 2,3 butanediol by the organism is minimum during the first active phase of fermentation which involves maximum sugar consumption. After this phase the sugar consumption remains low but the formation of 2,3 butanediol continues and a low rate of increase of its yield has been observed even up to 54 days of fermentation. The slow rate of formation of 2,3 butanediol is due to the formation of certain substances in the culture which act as inhibitors for the enzymic system responsible for the formation of 2,3 butanediol. The production of the diol does not take place directly from the substrate carbohydrate but from certain metabolites formed in the culture as the products of dissimilation of the parent carbohydrate during the first phase of fermentation and this also accounts for the slow rate of the glycol formation.

Our experiments with charcoal powder in the cultures of *B. polymyxa* (which will be published elsewhere) indicate that the rate of formation of 2,3 butanediol in the control culture is much less than in cultures containing charcoal even after 54 days of fermentation.

In this paper the possibility of absorption of the materials toxic to the enzymic system responsible for the formation of 2,3 butanediol, by aluminium oxide has been investigated.

Experimental.

Four culture media, each containing KH_2PO_4 — 0.30 gm; K_2HPO_4 — 0.70 gm; $MgSO_4$ — 0.16 gm; $(NH_4)_2SO_4$ — 0.34 gm; Sucrose — 20 gm were prepared. 250 c.c. sigcol flasks with flat bottom were used for the purpose. The volume of each was 150 c.c.

in the beginning. The flasks were cotton plugged after the addition of the required quantity of alumina. The media were sterilised at 15 lb. pressure for 20 minutes in an autoclave. They were allowed to incubate at 30° C for 24 hours and resterilised.

Each medium was seeded with 50 c.c. of an actively growing culture of *B. polymyxa*. The contents of the seed culture was analysed. The cultures were allowed to incubate at 30° C. After 10 days, 50 c.c. of culture was pipetted ot using a sterilised pipette under sterilised conditions. These were analysed for their contents. After a further lapse of 20 days the cultures were again similarly analysed. A third analysis was carried out after 50 days of fermentation.

The acid present was estimated by direct titration with a standard alkali. The reducing sugar present was estimated by direct titration between the culture solution and a standard Fehling's solution at boiling point using methylene blue as indicator near the end point. Total sugar estimation was carried out as follows. To 5 c.c. of the fermented solution dil. hydrochloric acid was added and the mixture boiled for 1 minute to ensure complete hydrolysis. This was cooled and neutralised with alkali. Excess of a Fehling's solution was added to this mixture and boiled. When the precipitation of copper oxide was complete it was filtered and washed. The precipitate was dissolved in ferric sulphate and the resulting ferrous sulphate was titrated against a standard solution of potassium dichromate. From this the amount of sugar was calculated. Butanediol was estimated by the method for Moureu and M. Dode (6).

The results obtained by the analysis are tabulated below (table 1). While calculating the result of the analysis of the seed culture was also taken into account.

Discussion.

The culture of *B. polymyxa* which contains 0,5 gm. of aluminium oxide with sugar as the substrate indicates more than twice the yield of 2,3 butanediol obtained in the control culture which contains no alumina. This yield decreases afterwards with the increase of the period of fermentation and becomes less than the yield from the control culture and remains so even after 50 days.

The culture containing 1 gm. of aluminium oxide indicates more yield of 2,3 butanediol than the control culture but less than the culture containing 0.5 gm. of aluminium oxide. The yield of 2,3 butanediol in this culture increases with the period of fermentation and after 50 days this culture shows a greater yield of 2,3 butanediol than the culture containing only 0.5 gm. aluminium oxide.

When the quantity of aluminium oxide is increased to 1.5 gm. in the culture the formation of 2,3 butanediol greatly decreases so much so that no glycol is detected in the culture after 10 days of fermentation. The analysis after 30 days indicate the presence of a little 2,3 butanediol in the culture which again disappears after 50 days. It is interesting to note that though the formation of 2,3 butanediol remains low in this culture the consumption of sugar is larger and goes on increasing even after 50 days as compared to the other cultures which do not indicate such a sharp increase in sugar consumption after the first 10 days of fermentation. In the control culture containing no aluminium oxide the quantity of reducing sugar decreases slowly after 10 days of fermentation and reaches a minimum after 30 days after which it slowly increases. In the culture containing 0.5 gm. of Al_2O_3 the quantity of reducing sugar slowly increases with the increase of the period of fermentation. The culture containing 1.5 gm. of aluminium oxide does not show much change in the quantity of reducing sugar present in it.

Table 1. Effect of alumina on *B. polymyxa*.

Period	Quantity of alumina added gm	Acid formed in gm. eqvts.	Red sugar left in gm.	Total sugar left in gm.	Total sugar consumed in gm.	Butanediol formed in gm.	Percentage yield on the basis of sugar added	Percentage yield on the basis of sugar consumed
10 days	0	0.002	4.95	6.07	4.71	0.364	7.51	3.37
	0.5	0.0002	3.96	4.26	6.52	0.792	12.14	7.34
	1.0	0.0002	4.45	4.84	5.94	0.438	7.37	4.52
	1.5	0.0003	4.84	4.68	6.10	—	—	—
30 days	0	0.0004	4.27	4.55	6.23	1.483	13.8	23.8
	0.5	0.0004	4.36	4.41	6.37	0.659	6.1	10.3
	1.0	0.0004	3.83	4.31	6.47	0.705	6.5	10.9
	1.5	0.0004	4.84	3.998	6.78	0.666	6.2	9.8
	0	0.0008	4.45	4.25	6.53	1.95	18	29.9
	0.5	0.0012	4.74	4.45	6.33	1.54	14.3	24.3
	1.0	0.0008	5.07	4.58	6.20	1.65	15.3	26.6
	1.5	0.001	4.95	3.56	7.22	—	—	—

Total sugar present in each culture — 10.78 gm.

The amount of total sugar present decreases with the increase of the period of fermentation in the control culture and in the culture containing 1.5 gm. of aluminium oxide, but in the cultures containing 0.5 or 1.0 gm. of alumina, the quantity of total sugar present in the culture shows a rising trend with the increase of fermentation.

Thus it appears that the presence of small quantities of alumina in the cultures of *B. polymyxa* increases the yield of 2,3 butanediol if the cultures are analysed after 10 days. A larger quantity of alumina not only absorbs the poisons of the enzymic systems which are responsible for the formation of 2,3 butanediol which are formed during fermentation but also absorbs either the activator of the systems or the enzymes responsible for the formation of 2,3 butanediol if they act outside the microbial cells and are secreted by the bacterial cells during fermentation. This aspect of the problem is under investigation.

Summary.

The yield of 2,3 butanediol can be doubled if o.5 gm. of aluminium oxide is added per 200 c. c. of the culture of *B. polymyxa* containing sugar as the substrate. High doses of alumina in the culture increases the sugar consumption of the cultures but hinders the formation of 2,3 butanediol. In the cultures of *B. polymyxa* containing no aluminium oxide the quantity of reducing sugar increases rapidly with the increase of the period of fermentation and reaches a constant value on prolonged fermentation but if 0.5 gm. of Al_2O_3/200 c. c. of the culture is added in the culture before fermentation the quantity of total sugar in the culture, instead of decreasing with time indicates a slow rise.

References.

1. McCall, Keith B., and Georgi, Carl E., Appl. Microbiol. **2**, 355—359 (1954). — 2. Orlova, N. V., Mikrobiologia **18**, 432—441 (1949). — 3. Ders., Mikrobiologia **19**, 326—337 (1950). — 4. Harold, Strecker, J., and Hanary, Isaac, J. Biol. Chem. **211**, 263—270 (1954). — 5. Hooreman, M., Aubert, J. P., Lemoigne, M., and Millet, J., Ann. inst. Pasteur **78**, 497—511 (1950). — 6. Moureu, Henri, and Dode, Maurice, Bull. Assoc. Chim. Sucr. dist. **51**, 247—250 (1934).

Anschrift:
Prof. Dr. Krishna Bahadur, 68. Dilkusha, New Katra, Allahabad, Indien.

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!
Sonderabdruck aus dem
Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 114
VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.
Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. ZLN 5087
1961

Nachdruck verboten

[From the Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad, India]

A comperative study of the influence of Hydrogen ion concentration and period of fermentation on yeast growth and assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' at different concentrations of phosphate ions in the culture media

Krishna Bahadur and **Harish Chandra Verma**

With 24 figures in the text

The hydrogen ion concentration of the culture media has profound influence on microbial physiology and growth. It has been observed by Arnon et al. (1) that the absorption of phosphate at different pH of the soil varies with different species of the plant. Hoagland and Broyer (2) have investigated the influence of hydrogen ion concentration on the absorption of inorganic nutrients i. e. Ca^{++}, Mg^{++}, K^{+}, NO_3^- and $H_2PO_4^-$. They observed that in tomato and lettuce plant, the absorption of calcium ions is lesser in the nutrient solution of lower pH value (pH 4—5), than what is observed at the higher pH value of the nutrient solution. However, according to the above authors the absorption of Mg^{++}, K^{+} and NO_3^- is not influenced by the pH value of the nutrient solution within pH range investigated i. e. from pH 4 to 9.

Hydrogen ion concentration plays an extremely important role on the growth and sporulation of fungi. It has been established that certain pH range is necessary for proper sporulation of various fungi but this range differs with different organisms. Lockwood (3) investigated that the acidity of the medium has pronounced influence on the formation of perithecia and asci in *Penicillium javanicum*, *Aspergillus herbariorum* and *Chaetomium globosum*.

Like other microorganisms, the physiological activities of yeast are greatly influenced by physico-chemical conditions of the culture media and hydrogen ion concentration is one of the most important factors which influences yeast growth.

Fermentation and growth of yeast depend to a large extent on the mineral and hydrogen ion concentrations of the nutrient medium. Hansen (4) observed that the optimum pH for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Sacch. ellipsoideus* was 4.4—4.8 pH.

Ranganayaki (5) investigated the influence of hydrogen ion concentration on the growth and metabolism of the Dhar yeast using different

concentrations of phosphate and she found that the amount of acid produced in the culture media increases with the pH value of the culture.

Slechta and Skoda (6) reported that the optimum pH for the assimilation of glucose by *Rhodotorula Gracilis* was 6.2—6.5. Ranganayaki (7) has investigated the influence of pH of the culture medium on the intake of minerals by *Pichia membranaefaciens*. The mineral content of the yeast was estimated by carefully preparing and weighing the ash of the yeast and it has been reported that in cultures containing 1.25 gm. ammonium sulphate per 400 ml., the ash content regularly decreases with the increase of pH from 3 to 5.5, and in the cultures containing 2.5 and 3.75 gm. of ammonium sulphate the ash content regularly increases upto pH 4.5.

Thus, it has been observed that the hydrogen ion concentration not only affects the growth, but it profoundly influences the mineral intake also. In this paper the influence of PO_4''' concentration on the intake of minerals i. e. Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *Pichia indica* (8) and *Saccharomyces cerevisiae* has been studied at different hydrogen ion concentrations of the culture media. The study had been continued for about 21 days and the influence of the period of fermentation on the intake of the minerals has also been investigated by analysis of the cultures at regular intervals. Sucrose and ammonium sulphate were used as sources of carbon and nitrogen respectively in above studies.

Experimental:

Preparation of buffer solution:

Normal acetic acid solution was prepared and standardised by titration against normal sodium hydroxide solution using phenolphthalein as indicator.

2.5 N acetic acid and 2.5 N sodium hydroxide were prepared. Normal sodium acetate solution was prepared by mixing 400 ml of 2.5 N acetic acid and 400 ml of 2.5 N sodium hydroxide and diluting it to 1000 ml with distilled water. Experiments were performed on pH value 3.8, 4.8 and 5.8. For adjusting these pH values of the culture media to 3.8, 4.8 and 5.8, 1.2 ml of N sodium acetate and 8.8 ml of N acetic acid: 5.95 ml of N sodium acetate and 4.05 ml of N acetic acid: 9.5 ml of N sodium acetate and 0.5 ml fo N acetic acid were added to them respectively.

Preparation of culture media:

Sixty six culture media were prepared, each containing calcium carbonate 25.0 mg, magnesium carbonate 37.50 mg, sodium chloride 25.0 mg, potassium sulphate 37.50 mg, zinc sulphate 6.20 mg, ammonium sulphate 312.5 mg and sucrose 2.50 mg. In each culture medium requisite amount of disodium hydrogen phosphate to supply the quantity PO'''_4 indicated in the table were added.

The above minerals were weighed and digested with the minimum quantity of dilute hydrochloric acid and distilled water. The pH values of the culture media were brought to the desired pH value by adding sodium acetate and acetic acid buffer as mentioned above and the total volume of each culture medium was made upto 50 ml.

The culture media were sterilised at 15 lbs pressure for half an hour in an autoclave. On cooling thirty three culture media were seeded with a trace of fresh sample of *Pichia indica* and thirty three culture media were seeded with a trace of fresh sample of *Saccharomyces cerevisiae* with the help of a sterilized platinum wire.

The culture media were analysed after 7 days, 14 days and 21 days of fermentation. The cultures were kept at room temperature, which varied during the period, between 28° and 34° C. Initially each culture contained 2.5 gm of sucrose, 10.37 mg of Ca^{++} and 10.83 mg of Mg^{++} before fermentation.

Determination of yeast weight:

The yeast cells were separated from the culture solution by filtration through a dried and weighed filter paper. Yeast cells were washed 3 or 4 times with distilled water, dried at 70°—80° C in an air oven, cooled in a desiccator and weighed.

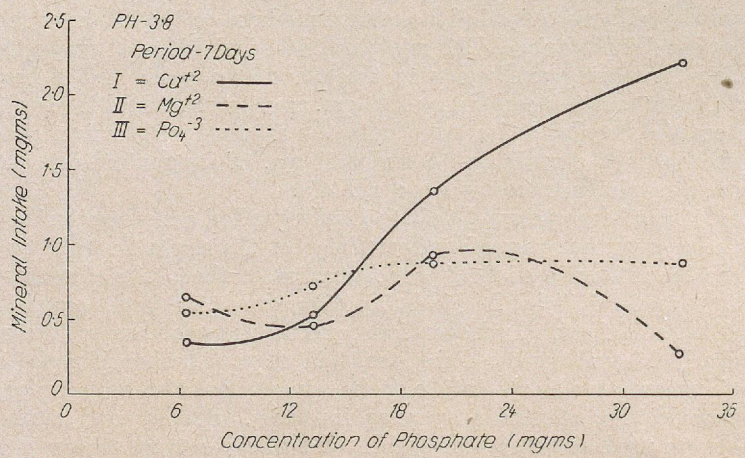


Fig. 1. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

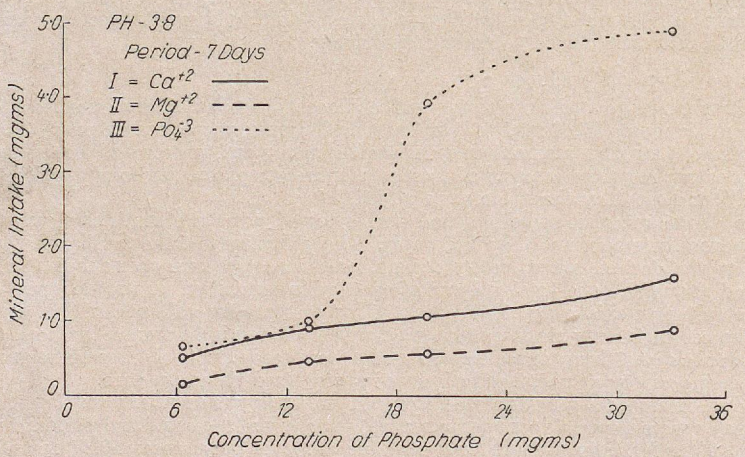


Fig. 2. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 1.

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different PO_4''' concentration in the culture medium of pH value 3.8 as observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	0.34	5.66	0.65	10.80	0.53	8.83	0.0600
2	13.250	0.51	7.84	0.47	7.23	0.71	10.92	0.0650
3	19.875	1.38	17.73	0.94	12.08	0.89	11.43	0.0778
4	33.125	2.07	32.85	0.28	44.44	0.89	14.12	0.0630

Table 2.

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different PO_4''' concentration in the culture medium of pH value 3.8 as observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	0.41	82.00	0.18	36.00	0.66	132.00	0.0050
2	13.250	0.82	51.25	0.47	29.37	0.99	61.97	0.0160
3	19.875	1.03	51.5	0.56	28.00	3.97	198.5	0.0200
4	33.125	1.65	64.96	0.84	33.07	4.96	195.27	0.0254

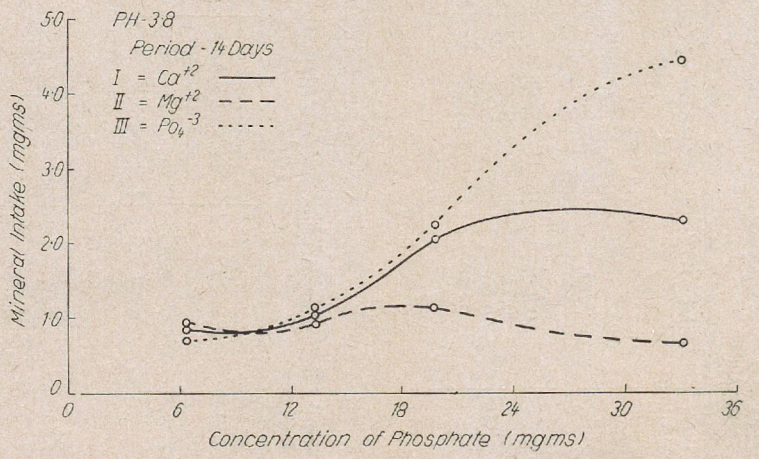


Fig. 3. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

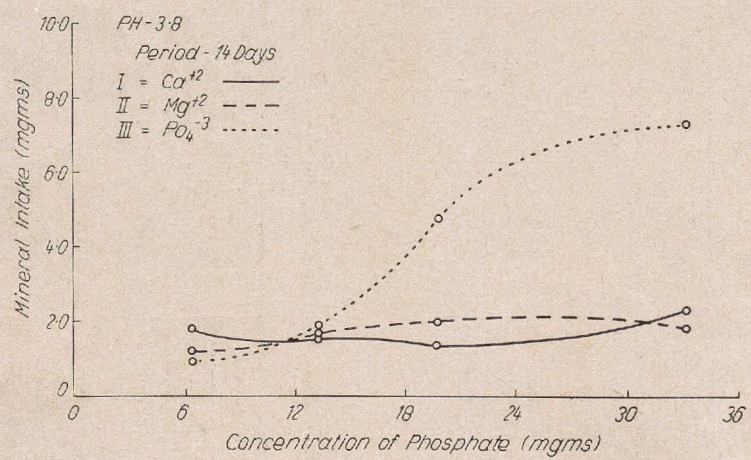


Fig. 4. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 3

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentration of PO_4''' in the culture medium of pH value 3.8 as observed on the 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	0.82	12.05	0.94	13.82	0.73	10.73	0.0680
2	13.250	1.04	12.83	0.94	11.60	1.10	13.58	0.0810
3	19.875	2.07	29.57	1.13	16.14	2.21	31.57	0.0700
4	33.125	2.28	32.11	0.65	7.26	4.42	62.25	0.0710

Table 4

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 3.8 as observed on the 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	1.79	30.65	1.29	22.08	0.94	16.09	0.0584
2	13.250	1.65	19.97	1.73	20.94	1.89	22.88	0.0826
3	19.875	1.38	12.45	1.99	17.76	4.73	42.68	0.1108
4	33.125	2.35	34.05	1.81	26.23	7.25	105.07	0.0690

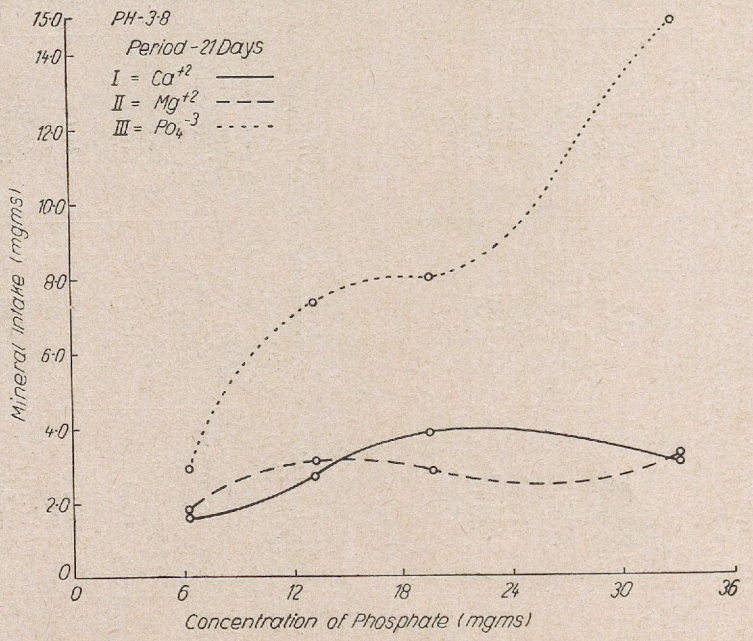


Fig. 5. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

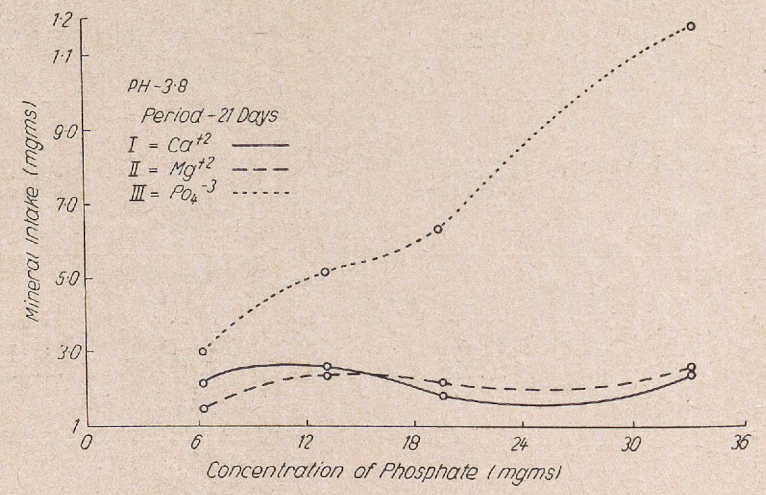


Fig. 6. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

*II

Table 5

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in culture medium of pH value 3.8 as observed on the 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	1.59	15.28	1.78	17.11	2.94	28.26	0.1040
2	13.250	2.71	5.53	3.10	6.32	7.36	15.02	0.4900
3	19.875	3.83	7.46	2.82	5.49	8.09	15.76	0.5130
4	33.125	3.19	6.78	3.29	7.00	14.72	31.31	0.4700

Table 6

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 3.8 as observed on 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.13	15.43	1.49	10.79	3.07	22.24	0.1380
2	13.250	2.59	14.90	2.42	13.92	5.17	29.74	0.1738
3	19.875	1.84	11.40	2.14	13.25	6.30	39.03	0.1614
4	33.125	2.41	10.76	2.52	11.26	11.79	52.68	0.2238

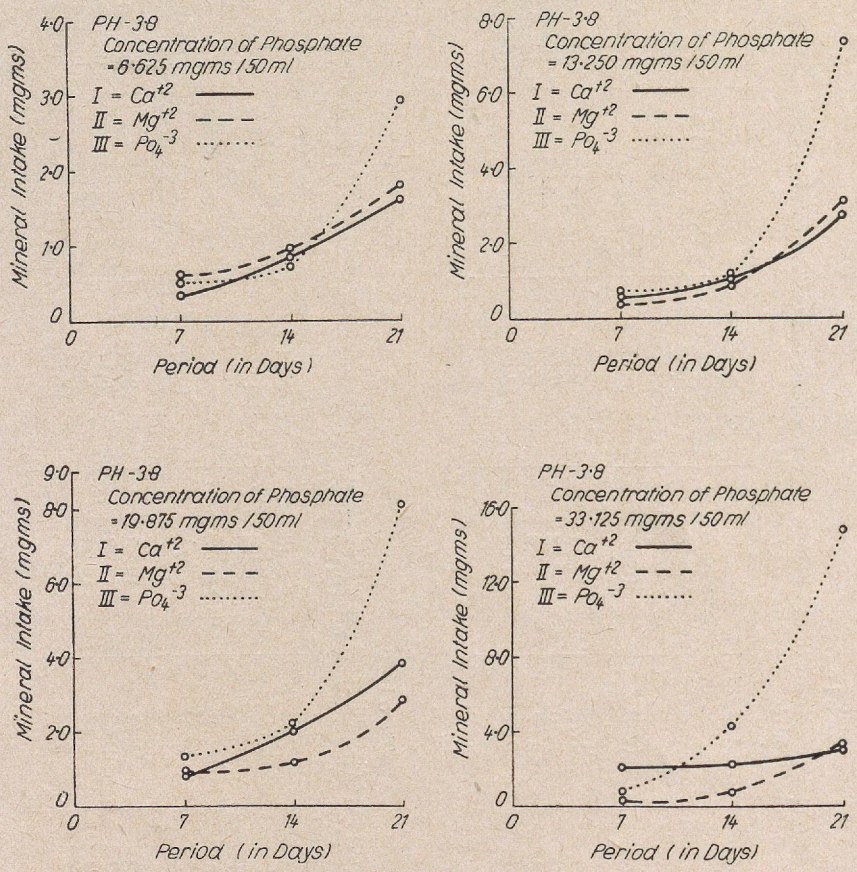


Fig. 7. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

Estimation of calcium, magnesium and phosphate:

After removing the yeast cells from the culture, the calcium (9), magnesium (10) and phosphate (11) of the culture solution were estimated colorimetrically.

Discussion:

The data of 7 th day analysis indicate that the yeast yield of both the yeasts examined is very little at pH 3.8. Maximum yield of the yeast cells in the case of *Pichia indica* culture is at 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml concentration and at pH 3.8, while in the case of *Sacch. cerevisiae* and in the culture medium having pH value 3.8 the yield increases with the increase of concentration of PO_4''' in the culture medium.

The increase of concentration of PO_4''' in the culture media increases the intake of Ca^{++} by *P. indica* cells. The assimilation of Mg^{++} regularly increases upto 19.875 mg of PO_4''' in the culture medium but further increase in PO_4''' concentration causes appreciable decrease in Mg^{++} intake.

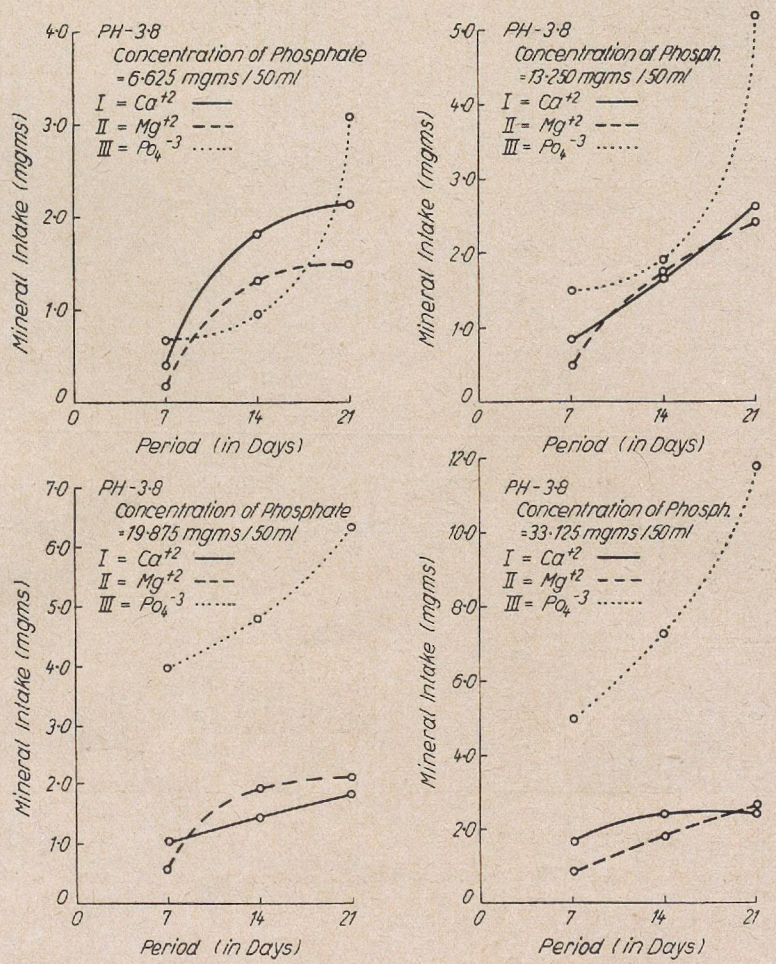


Fig. 8. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' *S. cerevisiae*

The intake of PO_4''' by *P. indica* cells increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture medium.

Total assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* increases with the increase of concentration of PO_4''' in the culture medium. But if the results are examined on the basis of ions assimilated for the formation of one gram of yeast cells, maximum quantity of Ca^{++} and Mg^{++} is assimilated at lower concentration of phosphate i. e. in the culture medium containing 6.625 mg of PO_4''' per 50 ml.

The analysis of the culture media after 14 days indicates that the quantity of yeast grown in the culture has increased. The culture media having 13.250 mg of PO_4''' per 50 ml of culture medium gives an yeast yield of 81.0 mg in *P.*

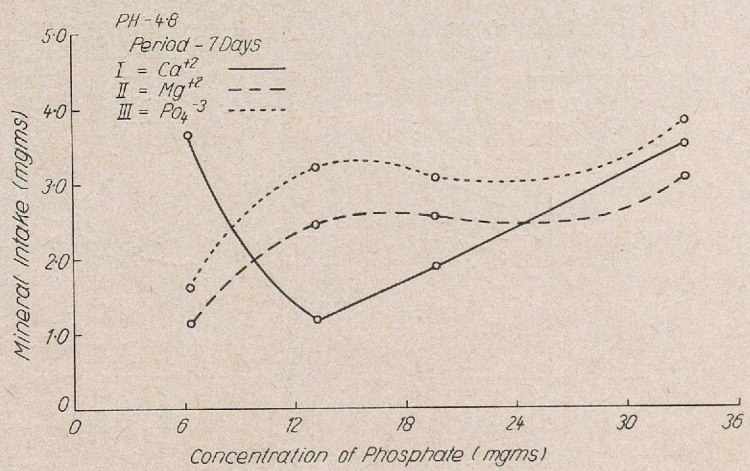


Fig. 9. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

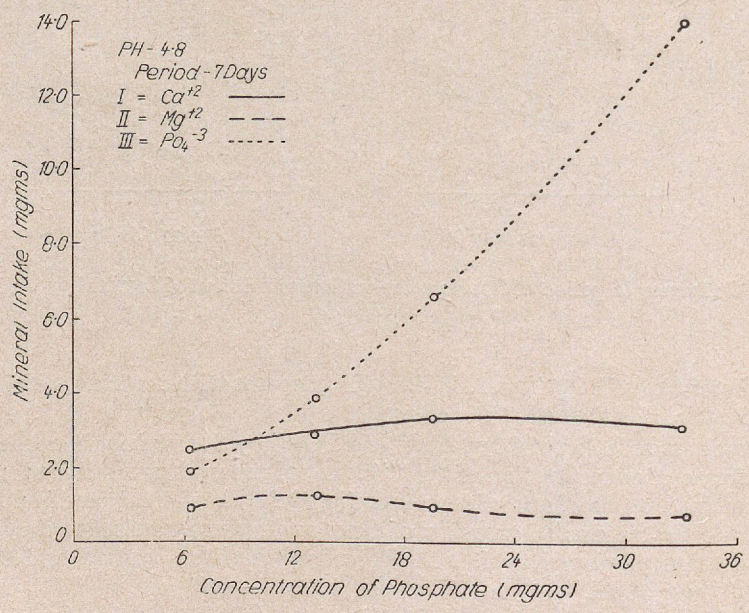


Fig. 10. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 7

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO''' in the culture medium of pH value of 4.8 as observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.63	36.30	1.13	11.30	1.61	16.10	0.1000
2	13.250	1.21	11.75	2.44	23.68	3.22	31.26	0.1030
3	19.875	1.90	17.49	2.54	23.38	3.04	27.99	0.1086
4	33.125	3.45	40.68	3.01	35.40	3.76	44.33	0.0848

Table 8

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 4.8 observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.48	16.82	0.94	6.37	1.98	13.43	0.1474
2	13.250	2.90	17.49	1.22	7.35	3.97	23.94	0.1658
3	19.875	3.31	19.77	0.94	5.61	6.62	39.54	0.1674
4	33.125	3.11	15.55	0.75	3.75	13.91	69.55	0.2000

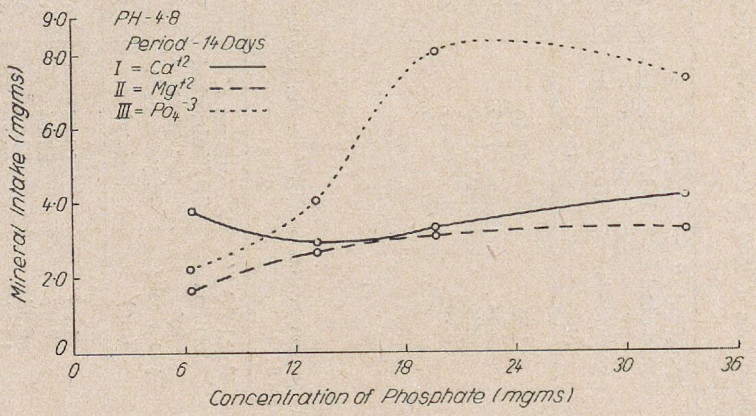


Fig. 11. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

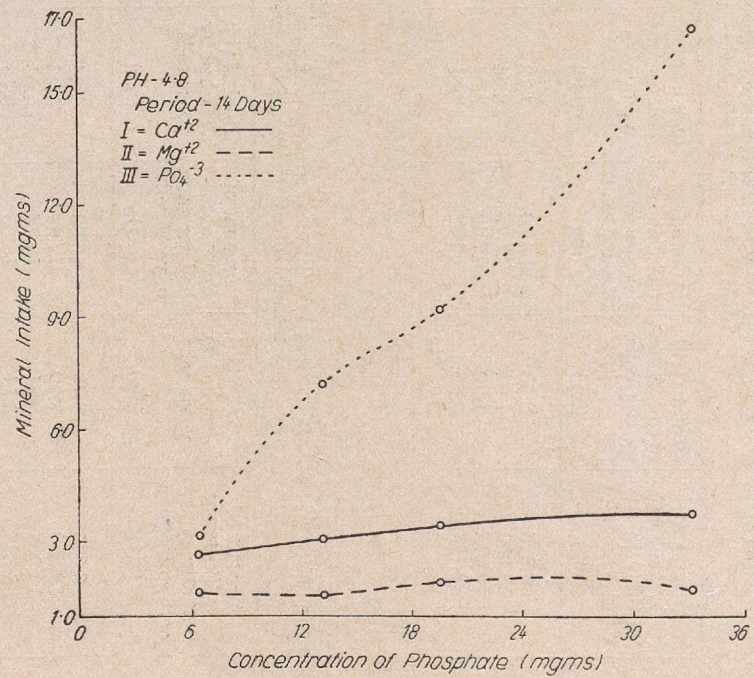


Fig. 12. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 9

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 4.8 as observed on 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.73	29.27	1.69	13.26	2.20	17.26	0.1274
2	13.250	2.90	22.20	2.82	21.59	4.05	31.01	0.1306
3	19.875	3.31	13.86	3.10	12.98	8.09	33.87	0.2388
4	33.125	4.14	19.25	3.20	14.88	7.36	34.23	0.2150

Table 10

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 4.8 as observed on 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.62	14.44	1.64	9.02	3.15	17.36	0.1814
2	13.250	3.04	12.66	1.55	6.45	7.25	30.20	0.2400
3	19.875	3.45	14.74	1.90	8.11	9.14	39.06	0.2340
4	33.125	3.73	16.41	1.73	7.61	16.77	73.81	0.2272

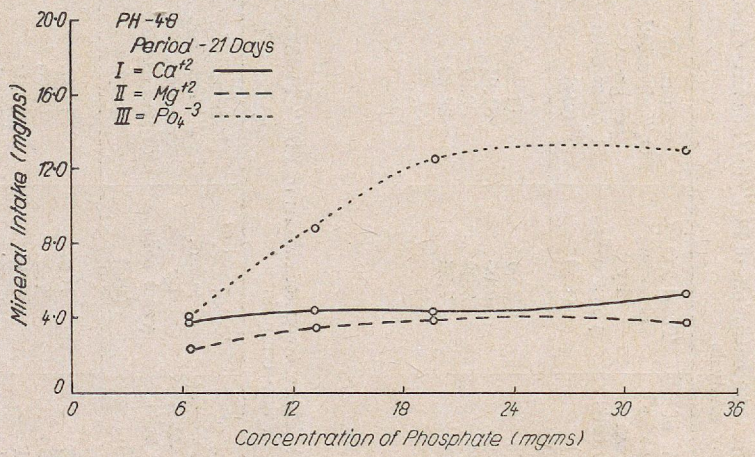


Fig. 13. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

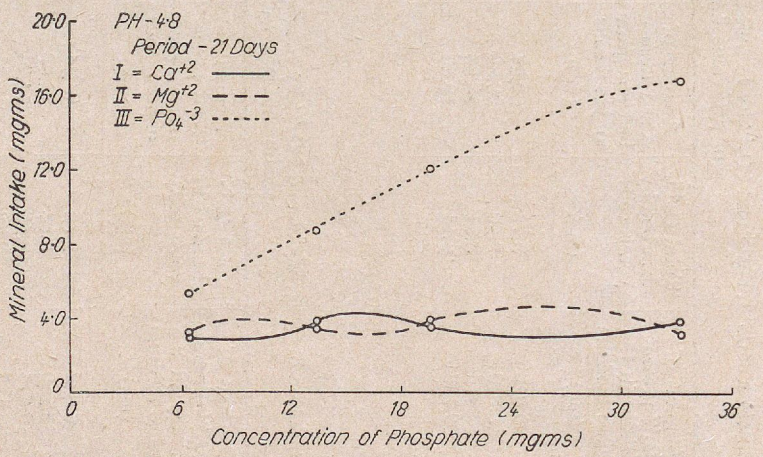


Fig. 14. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 11

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in culture medium of pH value 4.8 as observed on 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cell (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.99	15.80	2.35	9.30	4.04	16.00	0.2524
2	13.250	4.46	6.10	3.48	4.76	8.83	12.09	0.7300
3	19.875	4.30	6.47	4.04	6.07	12.51	18.82	0.6646
4	33.125	5.26	16.45	3.76	11.76	13.98	43.74	0.3196

Table 12

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and the yeast growth at different concentrations of PO_4''' in culture medium of pH value 4.8 as observed on 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cell (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.98	10.10	3.18	10.78	5.33	18.06	0.2950
2	13.250	3.97	8.90	3.54	7.93	8.72	19.55	0.4460
3	19.875	3.69	10.14	4.01	11.02	12.11	32.28	0.3638
4	33.125	3.97	19.95	3.26	9.84	16.97	51.11	0.3320

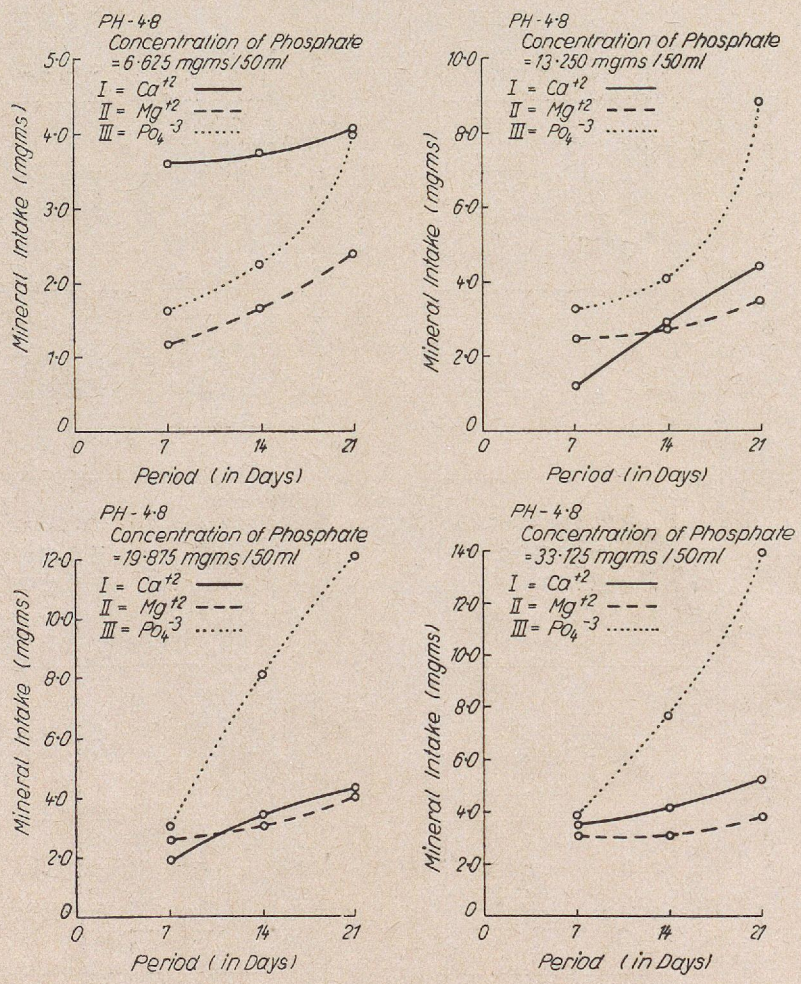


Fig. 15. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

indica culture, while in *S. cerevisiae* cultures the yield of yeast is maximum in culture medium containing 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml of the medium.

The assimilation of Ca^{++} and PO_4''' by *P. indica* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture medium. The intake of Mg^{++} increases upto 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml of the culture medium and further increase in PO_4''' concentration decreases Mg^{++} intake. The culture medium containing 13.250 mg of PO_4''' per 50 ml is exception to the above rules. This gives maximum yield of yeast and as observed in the previous examinations of the culture media described earlier the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions is minimum in this culture particularly if the results are considered in terms of mg of the ions assimilated per gram of yeast produced.

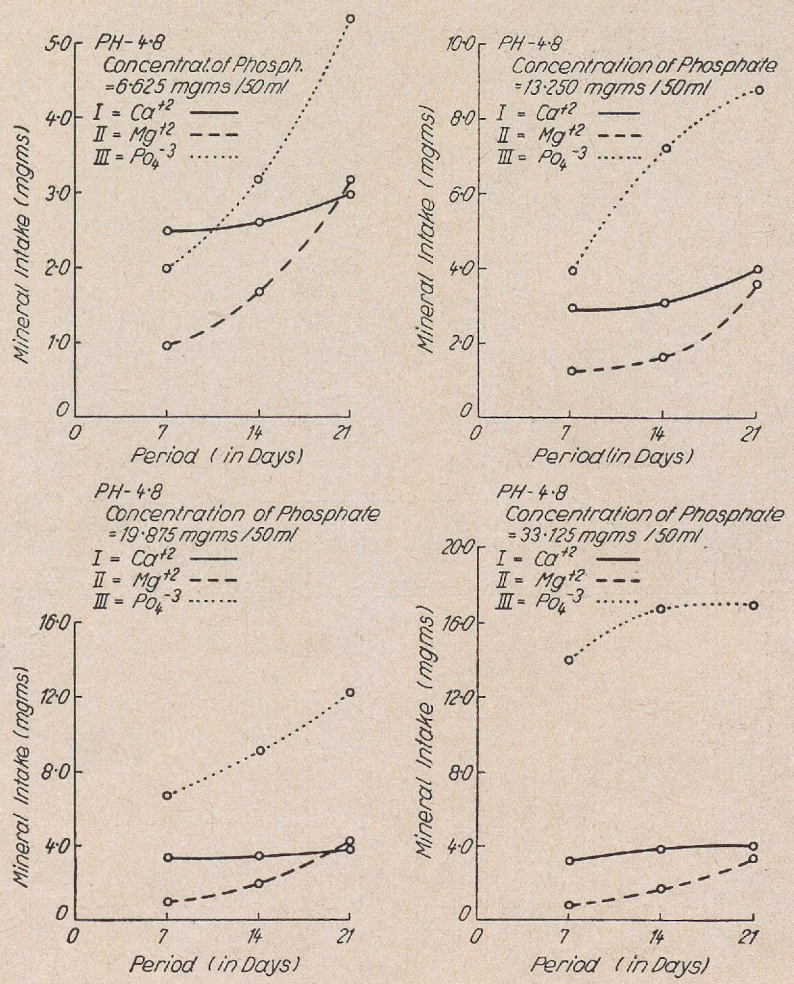


Fig. 16. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

The intake of Ca^{++} and Mg^{++} is different in the case of *S. cerevisiae*. The assimilation of PO_4''' increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media. It is interesting to note that the maximum yeast yield is in the culture medium containing 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml of the medium and in this medium there is minimum intake of Ca^{++} and Mg^{++} if the results are considered in mg of ions assimilated in the formation of one gram of yeast cells. The total assimilation of Ca^{++} decreases till the concentration of PO_4''' increases to 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml of the culture medium but further increase in PO_4''' concentration rapidly increases Ca^{++} intake. The intake of Mg^{++} increases with the increase of PO_4''' concentration upto certain limit

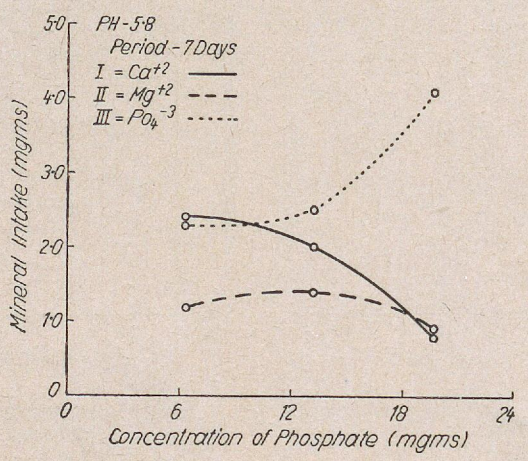


Fig. 17. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

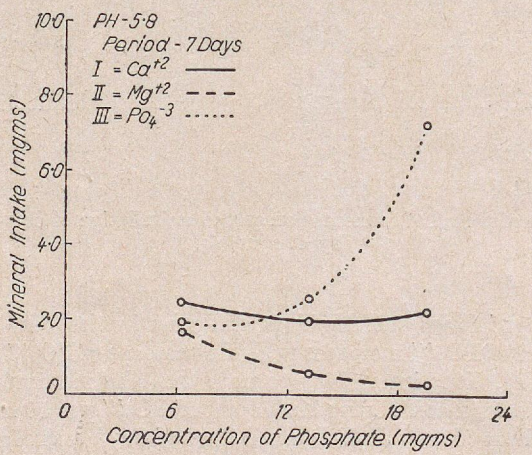


Fig. 18. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 13

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.42	23.26	1.22	11.51	2.32	21.8	0.1060
2	13.250	2.07	19.90	1.41	13.55	2.50	24.03	0.1040
3	19.875	0.86	8.88	0.94	9.71	4.11	42.45	0.0968

Table 14

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 7 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.48	20.66	1.60	13.33	1.98	16.50	0.1200
2	13.250	2.07	11.01	0.56	2.98	2.65	14.09	0.1880
3	19.875	2.28	12.80	0.37	2.07	7.28	40.89	0.1780

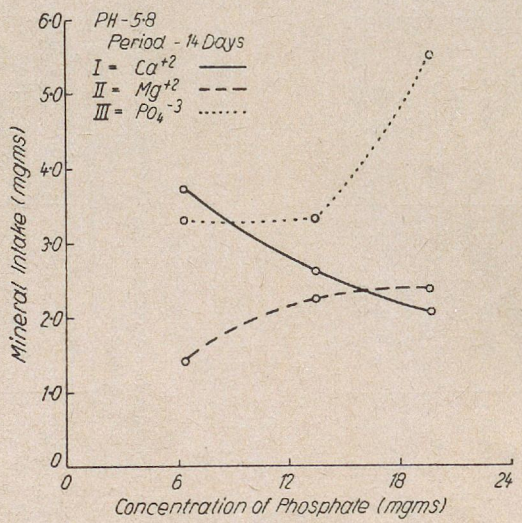


Fig. 19. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

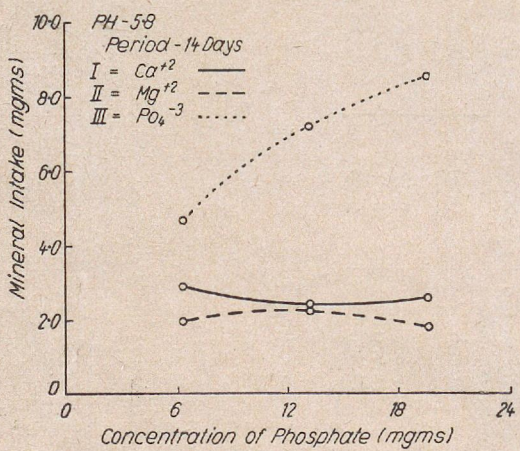


Fig. 20. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 15

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cell (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.73	28.64	1.41	10.82	3.31	25.42	0.1302
2	13.250	2.69	14.05	2.26	11.80	3.31	17.29	0.1914
3	19.875	2.07	20.91	2.35	23.73	5.52	55.75	0.0990

Table 16

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 14 th day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed pergram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	2.90	20.16	1.99	13.83	4.73	32.89	0.1438
2	13.250	2.48	12.08	2.33	11.35	7.25	35.33	0.2052
3	19.875	2.62	12.56	1.81	8.67	8.51	40.79	0.2086

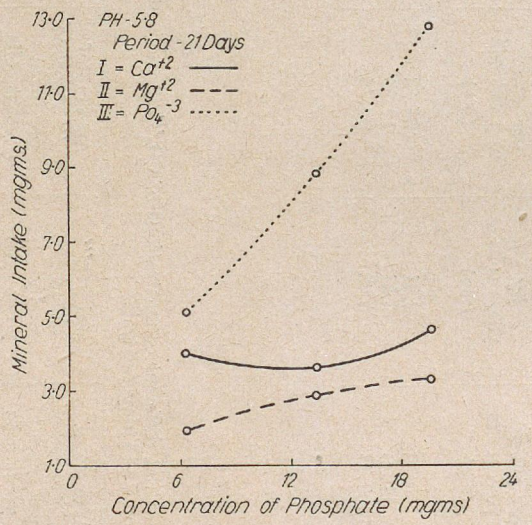


Fig. 21. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

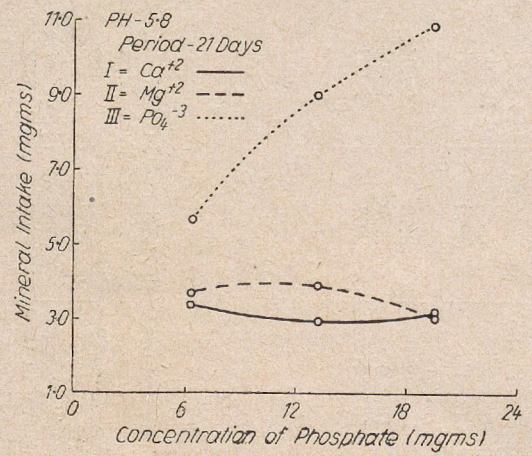


Fig. 22. Influence of PO_4''' on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

Table 17

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.99	17.22	1.97	8.54	5.15	22.23	0.2316
2	13.250	3.67	13.59	2.82	10.44	8.83	32.70	0.2700
3	19.875	4.62	21.03	3.29	14.98	12.88	5.86	0.2196

Table 18

The assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae* and yeast growth at different concentrations of PO_4''' in the culture medium of pH value 5.8 as observed on 21 st day analysis

Sl. No.	Amount of PO_4''' present initially in the culture medium (mg)	Total Ca^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Ca^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total Mg^{++} absorbed by yeast cells (mg)	Amount of Mg^{++} absorbed per gram of yeast cells (mg)	Total PO_4''' absorbed by yeast cells (mg)	Amount of PO_4''' absorbed per gram of yeast cells (mg)	Yeast grown (gm)
1	6.625	3.40	13.91	3.73	15.26	5.65	23.11	0.2444
2	13.250	2.98	7.70	3.92	10.12	9.04	23.35	0.3870
3	19.875	3.26	12.21	3.17	11.87	10.82	40.52	0.2670

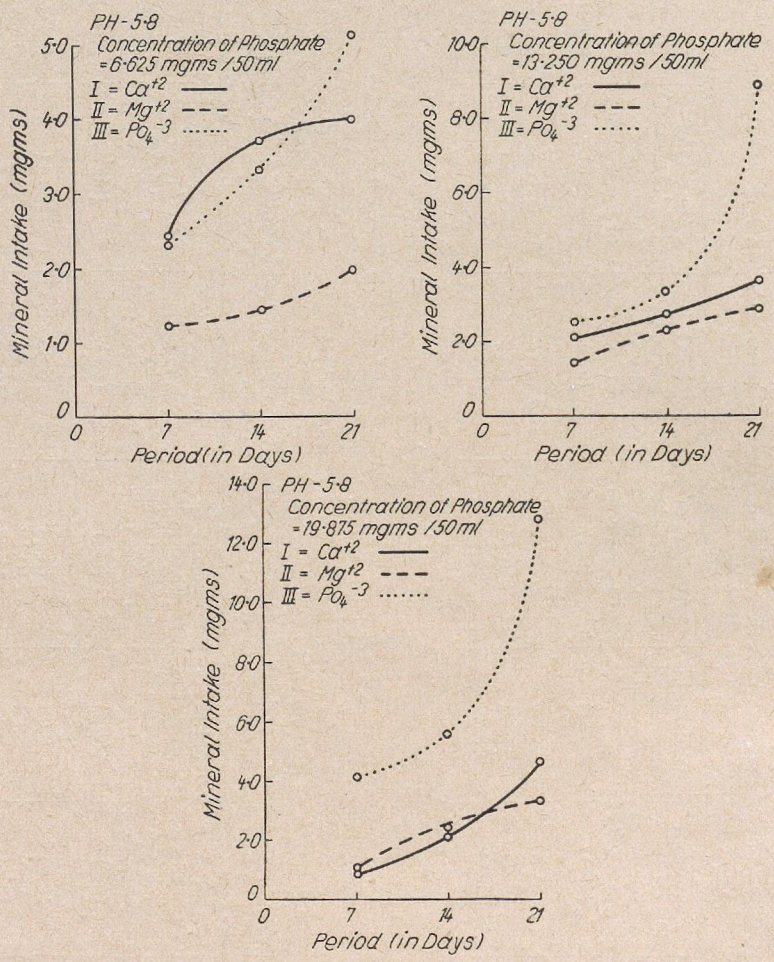


Fig. 23. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *P. indica*

i.e. till the concentration of PO_4''' is 19.875 mg of PO_4''' in the culture medium. However, further increase of PO_4''' concentration in the culture medium causes decrease in the intake of Mg^{++}.

The data of 21st day analysis indicate that much changes have taken place in the yeast yield. There is considerable yeast growth in the cultures as compared to what was observed in the 7th and 14th day analysis. In the case of *P. indica* the maximum growth is in the culture medium containing 19.875mg of PO_4''' in which it amounts to 513.0 mg. In the culture medium of *S. cerevisiae* the maximum growth of yeast is observed in the culture medium containing 33.125 mg of PO_4'''.

In the case of *P. indica* the intake of Ca^{++} increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture medium upto a certain limit but in-

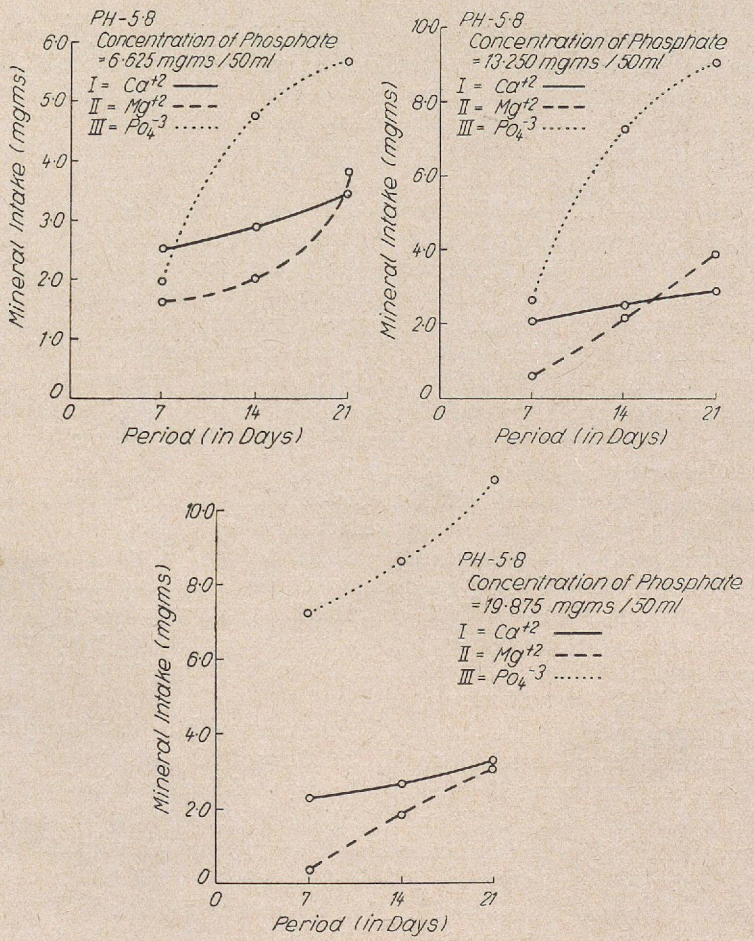


Fig. 24. Influence of period of fermentation on the assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' by *S. cerevisiae*

crease in the concentration of PO_4''' beyond this limit causes decrease in Ca^{++} assimilation. The intake of Mg^{++} for the formation of one gram of yeast cells is the least at that concentration of PO_4''' in the culture medium which indicates maximum yeast growth. The intake of PO_4''' increases with the increase of concentration of PO_4''' in the culture medium of *S. cerevisiae* and *P. indica*.

The 7 th day analysis of the culture media indicates, an increase in the yeast yield both in the case of *P. indica* and *S. cerevisiae* in the culture medium of pH value 4.8 as compared to the yeast yield at pH 3.8. The period of fermentation influences the yeast yield and the yield of yeast is considerably increased after 14 days of fermentation. It has been observed that in both the yeasts considered the increase of yeast yield is not appreciable upto 14 th

day but considerable growth of yeast takes place between 14 th day and 21 st day of fermentation.

The 7 th day analysis of culture medium of *P. indica* of pH value 4.8 indicates that the increase of PO_4''' concentration between 13.250 to 33.125 mg per 50 ml of the culture media causes increase in Ca^{++} assimilation. However, the intake of Ca^{++} is very high in the culture media which contain very little PO_4'''. Similar observations were found on analysing the culture media after 14 and 21 days of fermentation.

In the case of *S. cerevisiae* the assimilation of Ca^{++} increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media till 19.875 mg of PO_4''' is present per 50 ml. of the culture; with the further increase of PO_4''' concentration, the intake of Ca^{++} decreases. The analysis of the culture media on 14 th and 21 st day of fermentation, however, indicates that the assimilation of Ca^{++} increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture medium between 13.250 mg and 33.125 mg of PO_4''' in the culture media.

The assimilation of Ca^{++} at different concentrations of PO_4''' in the culture and with the increasing period of fermentation follows the similar course both in the case of *P. indica* and *S. cerevisae.*

The 7 th day analysis of culture media of pH value 4.8 indicates that the intake of Mg^{++} by *P. indica* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media. The 14 th day and 21 st day analysis also indicates that the total intake of Mg^{++} increases with the increase of PO_4''' concentrations in the culture media. If the result of 14 th day analysis is examined on the basis of mg of Mg^{++} required to form one gram of yeast cells the maximum intake of Mg^{++} takes place in the culture medium which contains 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml.

The intake of Mg^{++} by *S. cerevisiae* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture medium till 13.250 mg of PO_4''' is present per 50 ml of culture medium during the first seven days of fermentation.

The assimilation of PO_4''' by *P. indica* and *S. cerevisiae* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media of pH value 4.8 and 5.8.

The assimilation of Ca^{++} by *P. indica* and *S. cerevisiae* decreases with the increase of concentration of PO_4''' in the culture media of pH value 5.8.

The assimilation of Mg^{++} by *P. indica* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media of pH value 5.8, while in the case of *S. cerevisiae* increase of the concentration of PO_4''' in the culture media causes decrease in Mg^{++} assimilation.

The above data indicate that the yield of yeast increases with the increase of period of fermentation with all the concentrations of PO_4''' in the culture media studied here. This yield increases mostly between 14 th and 21 st days of fermentation. The optimum pH of yeast growth is 4.8 for both the yeasts studied. The yeast yield *P. indica* exceeds the yield of *S. cerevisiae.*

The assimilation of Ca^{++} by *P. indica* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media at pH 3.8. At pH 4.8 the maximum intake of Ca^{++} is observed in the medium containing 6.625 mg PO_4''' per 50 ml of the medium. In the culture medium of pH value 5.8 the assimilation of Ca^{++} follows the same course as described above but this is true only upto 14 days of period of fermentation. The analysis of this culture media indicates that the maximum quantity of Ca^{++} is assimilated in the culture medium

which contains highest concentration of phosphate ions i. e. 19.875 mg of PO_4''' per 50 ml of the culture medium.

In *S. cerevisiae* cultures at pH 4.8 and 5.8 the maximum intake of Ca^{++} is observed in the culture medium containing the least quantity of PO_4''' i. e. 6.625 mg of PO_4''' per 50 ml of the medium.

Summary:

It has been observed that the assimilation of minerals by the yeasts examined here is profoundly influenced by the hydrogen ion concentration of the culture media.

The growth of yeast depends on the hydrogen ion concentration and period of fermentation together with other physico-chemical factors of the culture. The maximum growth of yeast has been observed in the culture medium containing 13.250 mg of PO_4''' per 50 ml of the medium of pH value 4.8. The yield increases mostly between 14 th and 21 st days of fermentation.

The assimilation of PO_4''' by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia indica* increases with the increase of PO_4''' concentration in the culture media at all the pH values of the culture media examined.

Considering the results in terms of mg of mineral ions assimilated for the growth of 1 gram of yeast cells, the least assimilation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' takes place in the culture medium which has optimum conditions for the yeast growth and this is true for the PO_4''' concentration in the culture media, the pH value of the culture media and also for the period of fermentation. This has been found true in all the sets investigated and described here and for both the organisms *P. indica* and *S. cerevisiae* examined.

Reference

1. Arnon, D. I., Fratzke, W. E., and Johnson, C. M., Plant Physiol. **17**, 515—524 (1942). — 2. Hoagland, D. R., and Broyer, T. C., Amer. J. Bot. **27**, 173—185 (1940). — 3. Lockwood, L. B., Amer. Biol., Ser. No. **13** (1933). — 4. Hansen, S. H., C. r. Carlsb. **22**, 405 (1939). — 5. Ranganayaki, S., D. Phil. Thesis., University of Allahabad (1955). — 6. Slechta and Skoda, J. Chem., Listy. **47**, 1394—1400 (1953). — 7. Ranganayaki, S., Antonie van Leeuwenhoek **20**, 429—431 (1954). — 8. Bahadur, K., Zbl. Bakter. II **110**, 305—308 (1957). — 9. Alten, F., Weiland, H., und Knippenberg, E., Biochem. Z. **265**, 85 (1933). — 10. Alten, F., Weiland, H., und Kurmies, B., Angew. Chem. **46**, 697 (1933). — 11. Holman, W. M., and Pollard, A. G., J. Soc. Chem. Ind. **56**, 339 T (1937).

Author's address:
Prof. Dr. Krishna Bahadur, 68. Dilkusha, New Katra, Allahabad/Indien.

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

АКАДЕМИЯ НАУК С

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ ХИМИИ

ТОМ XXXI (XCIII)

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР

МОСКВА 1961 ЛЕНИНГРАД

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Присоединение диметилфосфористойкислоты к 1,6-гексаметилендиизоцианату. В ампулу помещалось 11 г (0.1 моля) диметилфосфористой кислоты и добавлялся небольшой кусочек металлического натрия. Затем вводилось 8.4 г (0.05 моля) 1,6-гексаметилендиизоцианата. Ампула запаивалась и оставлялась стоять при комнатной температуре на 10 часов. Реакция сопровождается разогреванием и увеличением вязкости реакционной массы. После 12 часов вся реакционная масса закристаллизовалась. Ампула вскрывалась и продукт подвергался перекристаллизации. Выход 16.5 г (85%). Т. пл. 88° (из CCl_4).

Найдено %: P 15.22, 15.56. $C_{12}H_{26}O_8N_2P_2$. Вычислено %: P 15.8.

Присоединение остальных диалкилфосфористых кислот к 1,6-гексаметилендиизоцианату проводилось аналогично.

Гексаметилен-1,6-бис-диизопропиловый эфир амидофосфонмуравьиной кислоты. В маленькую круглодонную колбу, снабженную холодильником и хлоркальциевой трубкой, помещалось 8.32 г триизопропилфосфита и 4.82 г гексаметилен-1,6-бисхлорангидрида карбаминовой кислоты. Реакция сопровождалась незначительным разогреванием и выделением хлористого изопропила. Выход 5 г. Т. пл. 102—103°. Проба смешения с продуктом, полученным присоединением диизопропилфосфористой кислоты к 1,6-гексаметилендиизоцианату, депрессии температура плавления не дала.

Выводы

1. Найдено, что диалкилфосфористые кислоты присоединяются к 1,6-гексаметилендиизоцианату с образованием гексаметилен-1,6-бис-диалкиловых эфиров амидофосфонмуравьиной кислоты.

Осуществлено присоединение диметил-, диэтил-, ди-н.-пропил-, диизопропил-, диизобутилфосфористых кислот к 1,6-гексаметилендиизоцианату.

2. Строение полученных веществ доказано встречным синтезом по способу А. Е. Арбузова.

ЛИТЕРАТУРА

[1] R. B. Fox, D. L. Venezky, J. Am. Chem. Soc., *78*, 1661 (1956); А Н. Пудовик и др., ЖОХ, *25*, 1369 (1955); Reets, D. H. Chadwick a. o., J. Am. Chem. Soc., *77*, 3813 (1955).

Поступило в Редакцию
19 октября 1960 г.

Казанский химико-технологический
институт имени С. М. Кирова.

ВЛИЯНИЕ КАТАЛИЗАТОРОВ И ПЕРИОДА ОБЛУЧЕНИЯ НА ФОТОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ В СМЕСИ ПАРАФОРМАЛЬДЕГИДА И НИТРАТА КАЛИЯ

К. Бахадур и *Р. Б. Сривастава*

Образование аминокислот на поверхности земли явилось источником возникновения жизни на земле. После образования аминокислот начался синтез пептидов и белков, с помощью которых осуществлялся синтез протоплазмы.

Опарин [1] считает, что в добиологический период на этот синтез воздействовали следующие важные энергетические факторы: ультрафиолетовое излучение солнца, составляющее около 10^{20} ккал. в год, которое могло достигать поверхности земли в гораздо большем количестве, чем в настоящее время, а также энергия электрических разрядов в атмосфере. Хотя эта последняя составляет примерно 0.1—1.0% энергии ультрафиолетового излучения, все же она представляла собой важный фактор активации химических реакций.

Лёб [2] в 1913 г. установил образование глицина при тихом разряде в смеси окиси углерода, аммиака и водяных паров. Недавно Миллер [3] исследовал образование глицина, α-аланина, β-аланина, саркозина, α-аминомасляных кислот и др. при электрическом разряде в смеси метана, аммиака, водорода и водяных паров.

Бахадур [4] наблюдал образование серина, аспарагиновой кислоты, валина, лизина и других аминокислот при действии искусственного освещения на смесь параформальдегида, нитрата калия и хлорного железа в воде, а Павловская и Пасынский [5] — образование аминокислот при облучении ультрафиолетовыми лучами раствора формальдегида, хлористого аммония и нитрата аммония.

В данной работе исследовалось влияние ионов кобальта и никеля на образование аминокислот в водяной смеси параформальдегида и нитрата калия, а также возможность использования для этого синтеза органического фото-катализатора — перекиси бензоила.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В конических колбах из сигкола емкостью 50 мл приготовляли 18 смесей, содержащих параформальдегид, нитрат калия и соответствующий катализатор. Эти колбы разделяли на 3 группы по 6 колб в каждой. В первой группе в качестве катализатора применяли хлорид кобальта, во второй — хлорид никеля, а в третьей — перекись бензоила.

Во все колбы отвешивали по 0.1 г параформальдегида. В мерную колбу помещали 0.2 г нитрата калия, 0.05 г соответствующего катализатора и доводили объем до 400 мл дистиллированной водой. Отмеривали по 30 мл этого раствора во все 6 колб каждой группы.

Таким образом, все вышеуказанные смеси содержали 0.1 г параформальдегида, 0.2 г нитрата калия и 0.05 г соответствующего катализатора, и общий объем каждой смеси был равен 30 мл.

Предварительно все эти смеси исследовались хроматографически, и было установлено, что в них полностью отсутствуют аминокислоты. Колбы закрывали хирургической ватой и стерилизовали под давлением в 1 ат. 30 мин. в автоклаве. Через сутки при комнатной температуре растворы стерилизовали вторично в тех же условиях.

Три колбы из каждой группы покрывали плотной черной тканью, а три другие — оставались незачерненными. Затем все смеси помещали на расстоянии 45 см от электрической лампы мощностью 1000 W.

После соответствующего периода воздействия электрического света, как показано в таблице, из каждой группы брали одну колбу, подвергавшуюся действию света, и одну — не подвергавшуюся, и анализировали на содержание в них аминокислот методом круговой хроматографии на бумаге [6]. Идентификация аминокислот производилась с помощью круглых листов бумаги, разрезанных радиально, при одновременном нанесении аминокислот свидетелей.

В качестве проявителя применялась смесь бутанол—уксусная кислота—вода, а в качестве вещества для окрашивания использовали нингидрин в ацетоне.

Результаты, полученные при анализе вышеуказанных смесей на аминокислотный состав при облучении смеси параформальдегида и нитрата калия в присутствии различных катализаторов, приведены в таблице.

Катализатор	Период облучения (часы)	Условия	Аминокислотный состав смеси
$CoCl_2$	119.15	На свету	Валин
		В темноте	Следы
	343.15	На свету	Глицин
		В темноте	Гистидин (в достаточном количестве)
	911.0	На свету	Орнитин, аспарагин, аргинин, аспарагиновая кислота
		В темноте	Следы
$NiCl_2$	119.45	На свету	Следы
		В темноте	Следы
	511.45	На свету	Глицин, аспарагиновая кислота
		В темноте	Следы
	915.00	На свету	Аланин, глицин, орнитин.
		В темноте	Следы
Перекись бензоила	343.00	На свету	Глицин
		В темноте	Следы
	511.45	На свету	Глицин
		В темноте	Следы
	915.00	На свету	Глицин
		В темноте	Следы

Примечание. На хроматограммах смесей, выдерживавшихся в темноте, образуются очень слабые кольца нескольких аминокислот при длительном воздействии, но эти кольца настолько слабы, что ими вполне можно пренебречь.

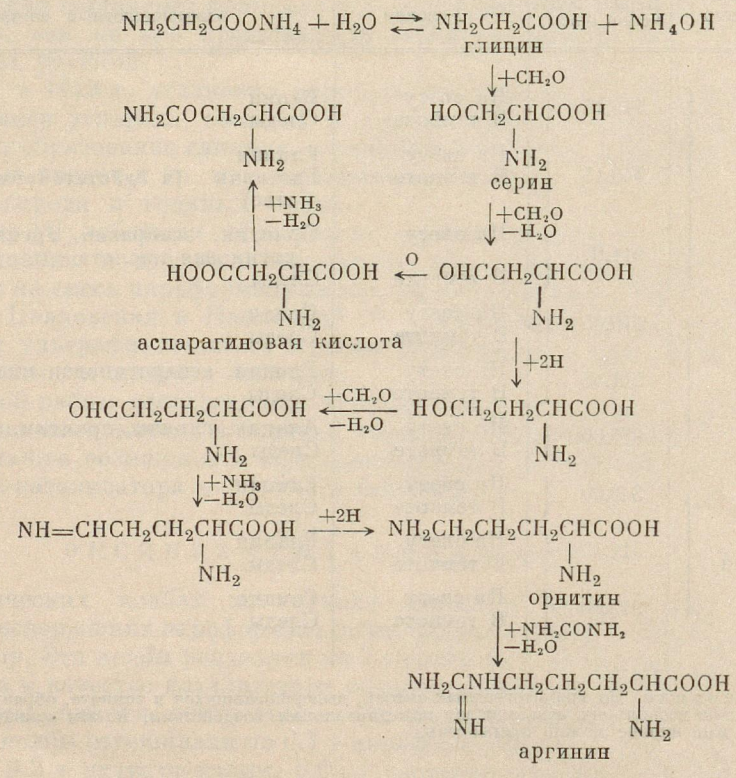
Обсуждение результатов

Полученные результаты показывают, что при облучении смеси, содержащей воду, параформальдегид и нитрат калия, образуется несколько аминокислот, причем ионы кобальта и никеля действуют при этой реакции в качестве катализатора. Ионы никеля вызывают образование бóльших количеств аминокислот, тогда как ионы кобальта приводят к получению большего числа аминокислот, чем ионы никеля, хотя общее количество образующихся кислот при этом меньше. Перекись бензоила также действует как катализатор, но при этом образуется только глицин, и дальнейшее увеличение периода облучения не приводит к образованию других аминокислот, хотя количество глицина увеличивается при увеличении продолжительности облучения.

Изучение образования аминокислот в течение более длительного периода облучения показывает, что в смеси, содержащей ионы Co^{++}, в первую очередь появляется валин, а затем глицин, аспарагин, аргинин и аспарагиновая кислота появляются лишь через 911 часов облучения. В смеси, содержащей в качестве катализатора ионы Ni^{++}, образование аминокислот вначале протекает медленно, и первое определенное указание на наличие в смеси глицина и аспарагиновой кислоты можно получить только через 511 часов облучения. При увеличении периода облучения до 915 часов в смеси установлено присутствие аланина, глицина и орнитина. Количество аминокислот в смеси, определяемое методом круговой

хроматографии на бумаге по толщине полос и интенсивности их цвета, является наибольшим при применении в качестве катализатора ионов Ni^{++}.

Образование этих аминокислот можно объяснить с помощью следующей схемы, приведенной Бахадуром [7].



Теренин [8] наблюдал образование свободных радикалов в смеси при облучении, приводящее к синтезу аминокислот.

Выводы

При облучении смеси параформальдегида нитрата калия и дистиллированной воды в присутствии солей кобальта или никеля электрической лампой в 1000 W происходит синтез аминокислот. Содержание аминокислот повышается с увеличением продолжительности облучения.

ЛИТЕРАТУРА

[1] А. И. Опарин. Происхождение жизни на земле. Изд. АН СССР (1957). — [2] W. Loeb. Ber., *46*, 690 (1913). — [3] S. Miller, J. Am. Chem. Soc., *77*, 2351 (1955). — [4] K. Bahadur, Nature, *173*, 1141 (1954); К. Бахадур, С. Ранганаике, ЖОХ, *25*, 1629 (1955). — [5] Т. Е. Павловская, А. Г. Пасынский, Доклад на международном симпозиуме о происхождении жизни на земле (Москва), 98 (1957). — [6] K. V. Giri, Current Sci., 20, 258 (1951); K. V. Giri, A. L. N. Prasad, Nature, *168*, 7861 (1951); K. V. Giri, K. Krishnamurthy, T. A. Venkitasubramanian, Current Sci., *21*, 11 (1952). — [7] K. Bahadur, Current Sei., *26*, 98 (1957). — [8] A. Terenin, Current Sci., *26*, 99 (1957).

Поступило в Редакцию
25 октября 1960 г.

Аллахабадский университет,
Отделение химии,
Аллахабад, Индия.

AN INVESTIGATION OF THE ROLE OF INTRA AND EXTRACELLULAR ENZYMES IN THE PRODUCTION OF ACETOIN AND 2, 3 BUTANEDIOL BY BACILLUS POLYMYXA

KRISHNA BAHADUR AND S. RANGANAYAKI

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad, India

REPRINTED FROM

THE JAPANESE JOURNAL OF MICROBIOLOGY

Vol. 5, No. 1, pp. 11~15, January, 1961

PUBLISHED BY

THE JAPAN BACTERIOLOGICAL SOCIETY

TOKYO, JAPAN

Japan. J. Microb., Vol 5. No. 1, 1961 UDC: 576. 851. 095. 323. 76

AN INVESTIGATION OF THE ROLE OF INTRA AND EXTRACELLULAR ENZYMES IN THE PRODUCTION OF ACETOIN AND 2, 3 BUTANEDIOL BY *BACILLUS POLYMYXA*

KRISHNA BAHADUR AND S. RANGANAYAKI

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad, India

(Received May 11, 1960)

The increasing demand for rubber and rubber-like material has created a new interest in 2,3 butanediol fermentation. It has been observed that the quantity of 2,3 butanediol decreases with an increase in the period of fermentation after the peak with most of the culture media of *Bacillus subtilis*[1]. In several cases, the quantity of acetoin increases with the period of fermentation, and Orlova[2] and Neish and Ledingham[3] have observed that the pH of the culture media greatly influences the formation of acetoin and 2,3 butanediol using *Aerobacter aerogenes*. Srecker and Ochoa[4] have suggested that acetoin is first formed from pyruvic acid through acetyl acetate which is reduced to 2,3 butanediol by DPN linked hydrogenase. The formation of acetoin at the expense of 2,3 butanediol may be due to the oxidation of the latter by either some enzymic system or by atmospheric oxygen.

It is reported that even these organisms, which are capable of producing 2,3 butanediol, do not produce the diol or even acetoin under certain conditions; one condition being that which favours cell growth[1]. Thus, it appears that the formation of 2,3 butanediol occurs when the activity of certain enzymes are activated and put to work only under unfavourable or forcing conditions. It has been observed that the cell free extracts of *Micrococcus pyogenes* and *Aerobacter aerogenes* metabolise pyruvate both by dissimilation to acetoin and by oxidation.

The detection of these enzymes in the culture media of *Bacillus polymyxa*[5] has been attempted, and an effort has been made to determine whether the enzymes responsible for the formation of 2,3 butanediol and acetoin are intracellular, i.e., whether they are present within the bacterial cell or are excreted by the cell and act as extracellular enzymes.

EXPERIMENTAL

The culture medium was prepared using the following ingredients: Potassium dihydrogen phosphate 0.15%, potassium monohydrogen phosphate 0.35%,

magnesium sulphate 0.08%, ammonium sulphate 0.17% and sucrose nearly 14%. Two one liter flat-bottom pyrex flasks were filled with 600 ml of the prepared medium. The flasks were plugged with surgical cotton and sterilized in an autoclave at 15 lb. pressure for 20 minutes. They were incubated at room temperature for 24 hours and sterilized again as before. Each of these flasks were seeded with 50 ml each of an actively growing culture of *B. polymyxa*. The cultures were kept at room temperature throughout the investigations.

After 15 days of incubation, the contents in the culture flasks were analysed. For analysis of the culture broth 50 ml was removed from each culture flask under aspetic conditions. One of the culture broths was left as such and analysed after regular intervals. The second culture was filtered, and the filtrate was collected in a litre flat bottom pyrex flask. To the filtrate, toluene was added to prevent bacterial growth. The flask was tightly corked and the mixture was analysed after regular intervals. The cells collected in the filter paper was transferred to a pyrex flask and 500 ml of distilled water and 70 gm of sucrose were added. Toluene was added to this mixture also. The contents of the flask was also analysed along with the other flasks at regular intervals.

METHODS OF ESTIMATION

The acid content was determined by direct titration against a standard sodium carbonate solution.

The amount of reducing sugar present was estimated by titrating the mixture directly against a standard Fehlings solution at the boiling point, using methylene blue as the indicator near the end point.

The determination of total sugar was carried out as follows: 5 ml of the mixture was boiled for 1 minute with dilute hydrochloric acid to hydrolyse the non-reducing sugars. Then alkali was added to neutralize the excess acid, and the mixture was boiled after Fehlings solution was added. An excess of Fehlings solution was employed to ensure a complete precipitation of copper oxide. The precipitate was filtered and washed and dissolved in Ferric sulphate solution. The resulting ferrous sulphate was titrated against a standard solution of potassium dichromate, using N. phenyl anthranilic acid as the indicator.

The butanediol present in the culture was estimated by the method of Moureu and Dode[6]. The acetoin content of the culture was determined by the method of Van Niel[7].

OBSERVATIONS

The results of the analyses are tabulated below. The flasks were kept at room temperature throughout the experiment. The values given are per

100 ml of the mixture in all of the cases.

Table 1. Acid, sugar, acetoin and 2, 3 butanediol content of a normal culture with an increase in time.

Number of days after which the analysis was carried out	Acid present in the mixture in gm. equivalents	Reducing sugar present in the mixture in gm.	Total sugar present in the mixture im gm.	Acetoin produced in gm.	2, 3 butanedoil produced in gm.
15	0.0006	1.41	8.50	0.1354	0.3131
30	0.0005	1.81	10.16	0.2147	0.2639
45	0.0007	1.70	4.14	0.2952	0.0198
60	0.0008	2.20	10.73	1.3800	0.0000
75	0.0008	4.70	13.02	1.6860	0.0000
195.	0.0012	7.76	2.27	0.0244	0.1022
220	0.0012	8.39	7.98	0.1635	0.0000

Table 2. Role of extracellular enzymes in the formation of acetoin and 2, 3 butanediol.

Number of days after which analysis was carried out	acid produced in gm. equivalents	Reducing sugar present in gm.	Total sugar present in gm.	Acetein formed in gm.	2, 3 butanediol formed in gm.
15	0.0006	2.29	12.00	0.0652	0.1829
30	0.0003	2.45	10.68	0.0903	0.2482
45	0.0009	4.70	7.70	0.1171	0.0659.
60	0.0002	6.34	8.08	0.0610	0.4680
75	0.0002	5.14	6.78	0.3099	0.0000
195	0.0035	6.50	6.71	0.0000	0.1714
220	neutral	5.71	8.12	0.0000	0.1780.

Table 3. Role of intracellular enzymes of *B. polymxa* in the formation of acetoin and 2, 3 butanediol in a medium and toluene.

Period after which analysis was carried out in days	Acid formed in gm. equivalents	Reducing sugar present in gm.	Total sugar present in gm.	Acetoin formed in gm.	2, 3 butanediol formed in gm.
15	alkaline	1.41	14.84	0.0000	0.0231
30	alkaline	2.09	8.95	0.0195	0.0000
45	0.001	2.46	6.95	0.0000	0.0000
60	alkaline	2.96	11.20	0.0000	0.0000
180	0.0001	4.81	4.21	0.0000	0.0000
205	alkaline	4.95	11.39	0.0000	0.0000

DISCUSSION

In the normal culture, the quantity of 2,3 butanediol decreased with time

and completely disappears in 60 days whereas the quantity of acetoin shows a steady increase up to 75 days. It is interesting to note that the quantity of reducing materials (reported as reducing sugar in the table) in the culture gradually increased even upto 220 days. The result obtained on total sugar in the culture broth, determined by boiling the fermented solution with dilute hydrochloric acid followed by addition of Fehlings solution, shows a great irregularity. This irregularity is due to two processes taking place simultaneously; the utilization of sugar and the production of a considerable quantity of reducing material in the mixture. Data obtained on the sugar after 195 and 220 days following inoculation indicate greater quantities of reducing sugar in the mixture than the total sugar. This may be possible if some of the reducing compounds formed in the culture lose their reducing property upon boiling with hydrochloric acid. The formation of such reducing substances in the culture has been published elsewhere.

In the mixture containing cell free culture medium and toluene, the rate of formation of acetoin is slow. It slowly increases with time up to 75 days and then disappears completely. On the other hand, the quantity of 2,3 butanediol increases in the mixture up to 60 days and then slowly decomposes. However, 0.178 gm of the diol remains in the mixture even after 220 days. The quantity of reducing sugar continues to increase with time in this mixture, but there is less total sugar in the mixture.

The mixture which contains only bacterial cells, distilled water, sucrose and toluene, shows considerable consumption of sugar up to 45 days and then increases irregularly. The quantity of reducing sugar slowly increases with time even up to 205 days. However no acetoin or 2,3 butanediol is formed in this mixture after 30 days. Only slight amount of 2,3 butanediol is detected upon analysis after 15 days, and a slight amount of acetoin after 30 days.

SUMMARY

In the absence of intracellular enzymes the extracellular enzymes continue to produce 2,3 butanediol up to a certain period but gradually the quantity of acetoin increases and that of butanediol decreases. The decreases of 2,3 butanediol and the simultaneous increase in the quantity of acetoin is rapid in the normal culture, which contains extra and intracellular enzymes. The formation of acid in the mixture is rapid in the normal culture, whereas if only the extracellular enzymes are present, the formation of acid is slow. In the presence of intracellular enzymes the mixture is alkaline.

The enzymes present in the bacterial cell are capable of utilising sugar even atfer the death of the organism, but acetoin and butanediol are not formed in the mixture.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are thankful to Prof. N. R. Dhar for his valuable advice and to the Scientific Grant Committee, U.P., India for the financial aid.

REFERENCES

(1) Hooreman, M., Aubert, J. P., Lemoigne, M., and Millet, J., Ann. inst. Pasteur, **78,** 497–511, 1950.
(2) Orlova, N. V., Midrobiologiya, **18,** 432–41, 1945.
(3) Neish, A. C., Ledingham, G. A., Can. J. Research. **273,** 694–704, 1949.
(4) Marold, J. Shecker and Severo Ochoa, J. Biol. Chem., **208,** 313–26, 1954.
(5) C-3 (2) Bacillus polymyxa strain obtained from National Research Council. Ottawa. Canada.
(6) Meuri Moureu and Maurice Dode, Bull. Assoc. Chim. Sucr. dist. **51,** 247–50, 1934.
(7) C. B. Van Niel, Biochem. Z., **187,** 472–8, 1928.

Printed by
KASAI PUBLISHING & PRINTING CO.
(Pan-Pacific Press)
Minato-ku, Tokyo, Japan

REPRINTED FROM
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, INDIA
SECTION A, VOL. XXXII, PART I, 1962, pp. 72—82

A STUDY OF THE INHIBITORY INFLUENCE OF Ag^{+}, Au^{+++}, AND Cu^{++} IONS ON THE DECOMPOSITION OF UREA BY SOYABEAN (GLYCINE SOJA) UREASE

Krishna Bahadur *and* **Vishnu Chandra**
Departments of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad and Balwant Rajput College, Agra



NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, INDIA
ALLAHABAD

A STUDY OF THE INHIBITORY INFLUENCE OF Ag^{+}, Au^{+++}, AND Cu^{++} IONS ON THE DECOMPOSITION OF UREA BY SOYABEAN (GLYCINE SOJA) UREASE

By

KRISHNA BAHADUR *and* VISHNU CHANDRA

Departments of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad and *Balwant Rajput College, Agra*

[Received on 14th June, 1961]

ABSTRACT

The present investigation deals with a study of the inhibitory influence of Ag^{+}, Au^{+++}, and Cu^{++} ions on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 6·8, 7·8 and 8·8. Silver ions have been found to be the greatest inhibitors and the gold ions the least; copper ions come in between the two. The inhibition in all the cases increases with the concentration of the respective ions and has been found to be maximum at pH 6·8.

INTRODUCTION

The inhibition of the enzymic activity of urease by a large number of substances has been reported in literature. Metallic ions have usually acted as inhibitors. The influence of a large number of metals *e. g.* As, Se, Sb, Mn, Sn, Pb, Cd, Fe, Bi, Zn, Mg, Te, Hg, Co, Cu, and Ag was studied by A. J. J. Vande Velde.[1] He found that certain elements like S, Se, As, Sb, Mn, and Sn showed scarcely any effect on the decomposition of urea by urease obtained from soyabean meal. Pb, Cd, Fe, Bi and Zn were found to be clearly toxic and Ni, Mg, Te, Hg, Co, Cu, and Ag were found to be strong inhibitors. Rukhelman[2] reported that lead acted as an activator in a quantity of 50-350 mgms. Silver ions were found to be strong inhibitors in citrate buffer at pH 5·6 by Kistiakowsky and collaborators.[3]

In the present investigation, the influence of Ag^{+}, Au^{+++}, and Cu^{++} ions on the decomposition of urea by soyabean urease, in phosphate buffer, and at pH 6·8, 7·8 and 8·8 has been studied. Silver nitrate, gold chloride and copper sulphate solutions have been taken to study the influence of Ag^{+}, Au^{+++}, and Cu^{++} ions respectively.

EXPERIMENTAL

The following solutions were used.

Urea solution. A 4·0% solution of urea (A.R. B.D.H.) in distilled water, has been used.

Soyabean powder extract. A 2·0% suspension of soyabean (Glycine soja beans) powder (obtained by grinding soyabean seeds) in distilled water was prepared. It was stirred for fifteen minutes and then allowed to settle. The supernatant liquid was filtered through glass wool and the filtrate was used.

Silver nitrate solutions. The solutions of silver nitrate were prepared by dissolving the requisite amounts of silver nitrate (Johnson, double crystallised) in distilled water.

Gold Chloride solutons. They were prepared by dissolving the requisite amounts of gold chloride (Johnson and Mathey) in distilled water.

Copper Sulphate solutions. They were prepared by dissolving the requisite amounts of copper sulphate ($CuSO_4 . 5H_2O$., A.R. B.DH.) in distilled water.

Buffer solutions. They were prepared by mixing requisite volumes of 0·1 M KH_2PO_4 solution and 0·1 M NaOH solution.

Experiment No. 1.—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of a 0·01% solution of silver nitrate, on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 6·8.

The reaction mixture in each of the flasks I to IX consisted of 60 ml. 4·0% urea solution, 20 ml. buffer solution of pH 6·8, 20 ml. 2·0% soyabean powder extract and 0·2, 0·6, 0·8, 1·0, 1·2, 1·4, 1·6, 1·8 and 2·0 ml. respectively of 0·01% silver nitrate solution. Flask X contained all the other solutions except silver nitrate and flask XI all the other solutions except silver nitrate and soyabean powder extract. Requisite volumes of distilled water were added to the different flasks to make up the volume of the solution in all the flasks to 140 ml.

The solutions in all the flasks were kept tightly corked and were covered by a few ml. of toluene to prevent bacterial contamination, and this was done in all the experiments. 5 ml. of the reaction mixture from the various flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. Methyl red has been used as the indicator for titrations in all the experiments. The results are given in Table I.

TABLE I

Influence of different volumes (varying from 0·2 ml. to 2·0 ml.) of 0·01% solution of silver nitrate on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 6·8, as indicated by the ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 22°C	24 Hrs. 19°C	48 Hrs. 19°C	72 Hrs. 19°C	96 Hrs. 19°C	120 Hrs. 19°C
I	1·60	10·90	11·30	11·50	11·55	11·60
II	1·25	10·35	11·15	11·20	11·45	11·60
III	0·95	6·90	7·55	7·90	8·10	8·25
IV	0·95	4·40	5·05	5·20	5·30	5·55
V	0·90	1·60	1·80	2·00	2·20	2·35
VI	0·90	1·00	1·05	1·10	1·10	1·15
VII	0·90	0·90	0·95	0·90	0·90	0·95
VIII	0·95	0·90	0·85	0·90	0·90	0·95
IX	0·90	0·90	0·85	0·90	0·90	0·90
X	1·35	13·80	14·95	15·40	15·60	16·00
XI	0·80	0·85	0·90	0·85	0·90	0·85

Experiment No. 2—This experiment was carried out to study the nifluence of different volumes of 0·01% silver nitrate solution on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8.

The reaction mixture in each of the flasks I to X consisted of 60 ml. 4·0% urea soln., 20 ml. 2·0% soyabean powder extract, 20 ml. buffer solution of pH 7·8 and 0·2, 0·4, 0·6, 0·8, 1·0, 1·2, 1·4, 1·6, 1·8 and 2·0 ml. respectively of 0·01% solution of silver nitrate. Flask XI contained all the solutions except silver nitrate and flask XII all the solutions except silver nitrate and soyabean powder extract. Requisite volumes of distilled water were added to different flasks to make up the volume of the solution in all the flasks to 140 ml.

5 ml. of the reaction mixture were taken out from the different flasks, and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table II.

TABLE II

Influence of the different volumes of 0·01% silver nitrate solution, on the decomposition of urea by soyabean urease (at pH 7·8) as observed by the ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 23°C	24 Hrs. 22°C	48 Hrs. 22°C	72 Hrs. 23°C	96 Hrs. 23°C	120 Hrs. 23°C
I	2·10	3·90	4·10	4·45	4·65	4·90
II	2·00	3·80	4·05	4·35	4·40	4·60
III	1·90	3·80	4·05	4·30	4·35	4·55
IV	1·75	3·25	3·40	3·60	3·75	3·90
V	1·70	2·55	2·85	3·30	3·40	3·60
VI	1·70	2·15	2·35	2·60	2·70	2·85
VII	1·70	1·70	1·80	1·90	2·00	2·00
VIII	1·70	1·70	1·80	1·80	1·80	1·80
IX	1·70	1·70	1·75	1·75	1·80	1·80
X	1·70	1·70	1·75	1·75	1·75	1·75
XI	2·35	4·35	4·40	4·70	4·90	5·10
XII	1·60	1·65	1·65	1·60	1·60	1·60

Experiment No. 3—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of a 0·01% solution of silver nitrate on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 8·8. The contents of the different flasks were the same as in the previous experiment, except that buffer solution of pH 8·8 was used in this experiment.

5 ml. of the reaction mixture from the different flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table III.

TABLE III

Influence of different volumes of 0·01% silver nitrate solution on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 8·8, as observed by the ml. of N/50 sulphuric acid, required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 26°C	24 Hrs. 27°C	48 Hrs. 26°C	72 Hrs. 27°C	96 Hrs. 25°C	120 Hrs. 25°C
I	2·55	4·85	5·20	5·25	5·35	5·40
II	2·20	4·85	4·95	5·05	5·10	5·15
III	1·95	3·50	3·80	3·80	4·00	4·00
IV	1·90	2·25	2·30	2·45	2·60	2·65
V	1·85	1·95	2·00	2·00	2·10	2·15
VI	1·85	1·90	1·90	1·90	1·95	1·95
VII	1·85	1·90	1·90	1·90	1·90	1·90
VIII	1·85	1·90	1·90	1·90	1·90	1·90
IX	1·85	1·90	1·90	1·90	1·90	1·90
X	1·85	1·90	1·90	1·90	1·90	1·90
XI	2·85	5·70	5·75	5·85	6·10	6·15
XII	1·85	1·85	1·85	1·80	1·80	1·80

Experiment No. 4—In this experiment, the influence of different volumes of a 0·01% solution of gold chloride on the decomposition of urea by soyabean urease has been studied, at pH 6·8.

The reaction mixture in each of the flasks I to X consisted of 60 ml. 4·0% urea solution, 20 ml. 2·0% soyabean powder extract, 20 ml. buffer solution of pH 6·8, and 0·2, 0·4, 0·6, 0·8, 1·0, 1·2, 1·4, 1·6, 1·8, and 2·0 ml. respectively of 0·01% gold chloride solution. Flask XI contained all other solutions except gold chloride and flask XII all the solutions except gold chloride and soyabean powder extract. Requisite volumes of distilled water were added to different flasks to make up the volume of the solutions in each of the flasks to 140 ml.

5 ml. of the reaction mixture were taken out from the different flasks and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table IV.

TABLE IV

Influence of the different volumes of a 0·01% solution of gold chloride (at pH 6·8) on the decomposition of urea by soyabean urease, as observed by ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following fntervals.

Flask	0 hr. 19°C	24 hrs. 18°C	48 hrs. 19°C	72 hrs. 19°C	96 hrs. 19°C	120 hrs. 19°C
I	1·95	9·25	9·75	10·15	10·30	10·35
II	1·80	9·60	9·65	10·00	10·25	10·25
III	1·80	9·50	9·60	9·70	9·70	9·70
IV	1·80	9·30	9·35	9·55	9·60	9·65
V	1·80	8·80	8·80	9·05	9·10	9·05
VI	1·80	8·30	8·25	8·25	8·40	8·35
VII	1·85	8·20	8·10	8·25	8·25	8·25
VIII	2·00	8·20	8·10	8·25	8·25	8·00
IX	1·95	7·50	7·50	7·70	7·90	7·70
X	2·00	7·85	7·80	8·05	8·20	8·00
XI	2·00	9·60	10·70	10·95	11·20	11·20
XII	0·85	0·85	0·90	0·85	0·85	0·85

Experiment No. 5—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of 0·01% solution of gold chloride on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8. The contents of the different flasks were the same as in the previous experiment except that buffer solution of pH 7·8 was used in this experiment.

5 ml. of the reaction mixture were taken out from the different flasks, and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table V.

TABLE V

Influence of different volumes of 0·01% gold chloride solution, on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 7·8, as observed by ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 17°C	24 hrs. 17°C	48 hrs. 17°C	72 hrs. 18°C	96 hrs. 19°C	120 hrs. 19°C
I	1·95	2·75	2·80	2·90	3·10	3·10
II	1·90	2·75	2·80	2·85	3·00	3·00
III	1·95	2·80	2·80	2·85	3·00	3·00
IV	1·95	2·75	2·75	2·85	3·00	3·00
V	1·95	2·75	2·80	2·85	3·00	3·00
VI	1·95	2·75	2·80	2·90	3·00	3·00
VII	1·90	2·80	2·80	2·85	3·00	3·00
VIII	1·95	2·75	2·80	2·85	2·95	3·00
IX	1·95	2·75	2·75	2·85	2·90	2·90
X	1·95	2·70	2·75	2·85	2·90	2·90
XI	2·00	2·75	2·90	3·00	3·10	3·15
XII	1·55	1·55	1·55	1·55	1·55	1·55

Experiment No. 6—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of a 0·01% gold chloride solution on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 8·8. The contents of the different flasks were the same as in the previous experiment except that buffer solution of pH 8·8 was used in this experiment.

5 ml. of the reaction mixture were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table VI.

TABLE VI

Influence of different volumes of 0·01% gold chloride solution on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 8·8, as observed by the ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 18°C	24 hrs. 17°C	48 hrs. 16°C	72 hrs. 16°C	96 hrs. 15°C	120 hrs. 17°C
I	2·25	3·90	4·20	4·30	4·30	4·35
II	2·20	3·80	2·95	4·20	4·20	4·20
III	2·25	3·80	4·05	4·25	4·25	4·25
IV	2·25	3·80	4·00	4·15	4·25	4·25
V	2·25	3·80	4·00	4·15	4·25	4·25
VI	2·20	3·75	3·95	4·10	4·15	4·15
VII	2·25	3·75	3·95	4·10	4·15	4·15
VIII	2·25	3·65	3·75	3·85	3·85	4·00
IX	2·25	3·65	3·75	3 85	3·85	4·00
X	2·25	3·65	3·80	3·85	3·85	4·00
XI	2·50	4·05	4·35	4 35	4·50	4·50
XII	1·80	1·85	1·85	1·80	1·80	1·80

Experiment No. 7—In this experiment, the influence of different volumes of a 0·01% solution of copper sulphate, on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 6·8 has been studied. The reaction mixture in each of the different flasks I to X consisted of 60 ml. 4·0% urea solution, 20 ml. buffer solution of pH 6·8, 20 ml. 2·0% soyabean powder extract and 0·2, 0·4, 0·6, 0 8, 1·0, 1·2 1·4, 1·6, 1 ·8and 2·0 ml respectively of 0·01% copper sulphate solution. Flask XI contained all other solutions except copper sulphate solution and flask XII all the solutions except copper sulphate and soyabean powder extract. Requisite volumes of distilled water were added to different flasks to make up the volume of the solutions in all the flasks to 140 ml.

5 ml. of the reaction mixture were taken out from the various flasks and titrated against N/50 sulphuric acid, daily for five days. The results are given in Table VII.

TABLE VII

Influence of the different volumes of 0·01% solution of copper sulphate on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 6·8, as observed by the ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 19°C	24 hrs. 18°C	48 hrs. 17°C	72 hrs. 17°C	96 hrs. 17°C	120 Hrs. 20°C
I	1·80	14·80	16·95	18·10	18·10	18·15
II	1·75	12·80	13·70	14·50	14·55	14·55
III	1·75	11·20	11·90	12·30	12·30	12·25
IV	1·75	9·70	10·40	10·75	10·75	10·80
V	1·85	8·50	9·10	9·30	9·30	9·30
VI	1·80	7·60	7·90	7·95	8·05	8·00
VII	1·80	6·30	6·60	6·65	6·85	6·85
VIII	1·80	6·10	6·20	6·35	6·40	6·40
IX	1·80	5·50	5·75	5·90	6·00	6·00
X	1·75	5·30	5·30	5·50	5·60	5·60
XI	2·15	19·00	23·00	24·70	25·70	26·00
XII	0·85	0·85	0·85	0·90	0·90	0·90

Experiment No. 8—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of a 0·01% solution of copper sulphate on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8. The contents of the different flasks were the same as in the previous experiment except that buffer solution of pH 7·8 was used in this experiment.

5 ml. of the reaction mixture from the different flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid daily for five days. The resuits are given in Table VIII.

TABLE VIII

Influence of different volumes of a 0·01% solution of copper sulphate on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 7·8, as observed by ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the different flasks at the following intervals.

Flask	0 hr. 27°C	24. hrs. 26°C	48 hrs. 27°C	72 hrs. 25°C	96 hrs. 25°C	120 hrs 25°C
I	2·10	3·60	3·90	4·00	4·15	4·30
II	2·10	3·40	3·60	3·75	3·95	4·10
III	2·10	3·30	3·60	3·65	3·90	3·95
IV	2·10	3·10	3·20	3·30	3·50	3·65
V	2·10	2·90	3·10	3·15	3·40	3·55
VI	2·05	2·90	2·90	3·00	3·30	3·30
VII	2·05	2·60	2·80	2·95	3·30	3·30
VIII	2·05	2·60	2·80	2·95	3·10	3·20
IX	2·05	2·60	2·75	2·95	3·10	3·20
X	2·05	2·50	2·75	2·90	3·10	3·20
XI	2·15	5·20	5·75	5·80	6·00	6·10
XII	1·60	1·60	1·60	1·60	1·60	1·60

Experiment No. 9—This experiment was carried out to study the influence of different volumes of 0·01% solution of copper sulphate on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 8·8. The contents of the different flasks were the same as in the previous experiment, except that buffer solution of pH 8·8 was used in this experiment.

5 ml. of the reaction mixture from the different flasks were taken out and titrated against N/50 sulphuric acid daily for five days. The results are given in Table IX.

TABLE IX

Influence of different volumes of 0·01% solution of copper sulphate on the decomposition of urea by soyabean urease, at pH 8·8, as observed by the ml. of N/50 sulphuric acid required to neutralise 5 ml. of the reaction mixture taken out from the various flasks at the following intervals.

Flask	0 Hr. 27°C	24 hrs. 25°C	48 hrs. 25°C	72 hrs. 25°C	96 hrs. 25°C	120 hrs. 25°C
I	2·40	3·70	3·85	3·90	4·05	4 05
II	2·30	3·35	3·45	3·55	3·65	3·70
III	2·30	3·20	3·30	3·35	3·45	3·50
IV	2·30	2·95	3·00	3·10	3·15	3·30
V	2·25	2·75	2·75	2·80	2·90	3·00
VI	2·25	2·65	2·65	2·75	2·80	2·90
VII	2·20	2·55	2·60	2·65	2·70	2·80
VIII	2·20	2·50	2·50	2·50	2·55	2 65
IX	2·10	2·40	2·50	2·50	2·55	2·60
X	2·10	2·40	2·50	2·50	2·50	2·60
XI	2·45	3·85	3·90	3·90	4·05	4·10
XII	1·80	1·80	1·80	1·80	1·80	1·80

DISCUSSION

These experiments were performed with a view to investigate the comparative influnce of Ag^{+}, Au^{+++}, and Cu^{++} ions on the decomposition of urea by soyabean urease. The influence of different volumes of 0·4139% and 0·1% solutions of silver nitrate, on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 6·8, was first studied but, it was found that there occurred either no decomposition or very little decomposition of urea even after five days. A more dilute solution (0·01%) was therefore, tried. Experiment No. 1 was carried out to study the influence of different volumes (varying from 0·2 ml. to 2·0 ml.) of 0·01% solution of silver nitrate on the decomposition of urea by 20 ml. of 2% soyabean powder extract at pH 6·8. The results of the experiment show that the inhibition of the enzymic activity of urease, increases with an increase in the volume of silver nitrate solution from 0·2 ml. to 2·0 ml. With 0·2 ml. of silver nitrate solution, the inhibition is very little, but with 2·0 ml. of it, the reaction almost stops totally.

Experiment No. two and three were carried out to study the influence of different volumes of 0·01% solution of silver nitrate on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8 and 8·8 respectively. These experiments were carried out to study the influence of pH on the inhibitory effect of Ag^{+} ions. The results of these experiments indicate that Ag^{+} ions act as strong inhibitors for urease at pH

6·8, 7·8 and 8·8 and there is very little difference in the inhibition at the different pH studied.

In order to study the influence of gold ions, different volumes of a 0·1% solution of gold chloride were first tried, but it was found that there was very little decomposition of urea. So in this case also a 0·01% solution of gold chloride was tried, at pH 6·8, in experiment number four. The volume of this solution was varied from 0·2 ml. to 2·0 ml. The results indicate that Au^{+++} ions act as inhibitors and the inhibition increases with an increase in the concentration of Au^{+++} ions. Experiment number five and six were carried out to study the influence of different volumes of 0·01% solution of gold chloride on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8 and 8·8 respectively. These experiments were carried out to study the influence of pH on the inhibitory effect of Au^{+++} ions on the decomposition of urea by soyabean urease. The results of these experiment indicate that the inhibition is maximum at pH 6·8. There is very little inhibitions at pH 7·8 and 8·8.

The influence of copper ions was first studied, by using different volumes of 0·3041% and 0·1% solutions of copper sulphate, but there occurred either no decomposition or very little decomposition of urea. A 0·01% solution of copper sulphate was, therefore, tried at pH 6·8, in experiment no. 7. The results of this experiment indicate that Cu^{++} ions act as strong inhibitors, and the inhibition increases with an increase in the concentration of Cu^{++} ions. Experiment numbers eight and nine were carried out to study the influence of different volumes of 0·01% copper sulphate solution on the decomposition of urea by soyabean urease at pH 7·8 and 8·8 respectively. These experiments indicate that inhibition by copper ions is much more at pH 6·8 than at pH 7·8 and 8·8.

The experiments with Ag^{+}, Au^{+++}, and Cu^{++} ions indicate that silver ions have the greatest inhibitory influence and the gold ions the least. The inhibitory influence of Cu^{++} ions is greater than that of Au^{+++} ions, but is much less than that of Ag^{+} ions.

REFERENCES

1. A. J. J. Vande Velde, Mededel, Koninkl. Vlaam, *Acad. Wetenschap, Belgium, Klasse Wetenschap.* **9**, No. 12, 13 pp. (1947).
2. A. A. Rukhelman, *Ukrain Biokhem. Zhur.* **10**, 5-20 (in Russian) 20-1, (in French 21-2) (1937).
3. F. Ambrose, G. C. Kistiakowsky and Andrew G. Kridl, *J. A. C. S.*, **73**, 1232-6 (1951).

REPRINTED FROM
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, INDIA
SECTION A, VOL. XXXII, PART I, 1962, pp. 83–87

INFLUENCE OF THE SOURCE OF CARBON ON PHOTOCHEMICAL FIXATION OF NITROGEN IN AQUEOUS MIXTURES CONTAINING MOLYBDIC ACID AS THE CATALYST

Krishna Bahadur *and* **Krishna Murari Lal Agrawal**

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, INDIA
ALLAHABAD

INFLUENCE OF THE SOURCE OF CARBON ON PHOTOCHEMICAL FIXATION OF NITROGEN IN AQUEOUS MIXTURES CONTAINING MOLYBDIC ACID AS THE CATALYST

By

KRISHNA BAHADUR *and* KRISHNA MURARI LAL AGRAWAL

Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad

[Received on 8th September, 1961]

ABSTRACT

Photochemical fixation of nitrogen is three folds increased when paraformaldehyde of the mixture of paraformaldehyde, water and molybdic acid is substituted by tartaric acid. In this mixture of 50 ml volume 0·6134 mg of molecular nitrogen is fixed on an exposure of about 450 hours as compared to only 0·2597 mg. of nitrogen fixation in similar mixture containing paraformaldehyde as the source of carbon on similar exposure.

The quantitative aspect of the photochemical fixation of nitrogen observed by Babadur, Ranganayaki, and Santamaria[1] in 1948 is being studied and the role of different catalysts on this fixation is under publication elsewhere. The influence of change of carbon source has been examined statistically and it has been observed that the fixation is greatly influenced by the nature of the carbon compound present in the mixture.

Originally Bahadur *et. al.* employed paraformaldehyde as the source of carbon and colloidal molybdenum oxide as the catalyst. In the experiment described in the present communication; molybdic acid has been used as catalyst and the fixation of nitrogen in the mixture containing paraformaldehyde has been compared with that in an mixture containing tartaric acid as the source of carbon.

EXPERIMENTAL

Nine mixtures containing 0·3000 gm of analytically pure tartaric acid, 0·0500 gm of pure molybdic acid and 50 ml of glass distilled water were prepared in 150 ml Sigcol conical flasks. All these flasks were plugged with surgical cotton and

the mixtures were sterilised at 15 lbs steam pressure for about 30 minutes. After cooling, the mouths of the flasks were sealed with polythene paper and transparent adhesive tape to prevent the loss of water by evaporation and avoid contact with outside air. This eliminated contact of the mixture with any traces of ammonia or amine which may be present in the atmospheric air. Another similar set of nine mixtures was prepared using the same amount of paraformaldehyde instead of tartaric acid.

Four of the flasks of each set were exposed to sunlight and another four were kept covered with four fold thick black cotton cloth. One flask was kept for the estimation of nitrogen and for the identification of amino acids. The period of exposure was the time for which the flasks were kept in sunlight. The variation of temperature during the exposure was noted from time to time.

Nitrogen present in the control mixture and in the mixtures exposed to sunlight for about 450 hours was estimated in a semi-micro Kjeldahl's apparatus using A. R. chemicals. The identication of amino acids was carried out using circular paper chromatography technique[2]. The two running solvents used for the seperation of amino acids were:

(1) *n*-Butanol-water-glacial acetic acid (4 : 5 : 1).

(2) Phenol-water (80 : 20) in an atmospher of ammonia.

The results obtained by the analysis of the above mixtures are tabulated.

DISCUSSION

Tartaric acid fixes much more nitrogen as compared to paraformaldehyde in the mixture under experimental conditions described in the present communication. The statistical study of this fixation shows that the fixation of nitrogen in both the mixtures *i. e.* one which contains paraformaldehyde and the one which contains tartaric acid as the source of carbon, is quite significant. For the same period of exposure the quantity of nitrogen fixed in 50 ml of the mixture was 0·2597 mg. with paraformaldehyde and 0·6134 mg. with tartaric acid as carbon source.

The statistical data of this fixation is described below:

Photochemical fixation of nitrogen in mixtures containing tartaric acid as the source of carbon and molybdic acid as the catalyst after an exposure of about 450 hours.

(Variation of temperature during the exposure : 32°C to 52°C)

Serial number	Condition	Titre reading of N/48·5 sulphuric acid in ml. for ammonia produced by the mixture	Statistical average	Nitrogen fixed in mg. in the mixture	Rf. values of amino acids in Butanol-water-acetic acid	Rf. values of amino acid in Phenol-water ammonia	Amino acids identified	Mg. of nitrogen fixed by light in the total mixture
1	L	16·1			Rf 0·47	Rf 0·74	Proline	
	I				Rf 0·40	Rf 0·51	Alanine	
2	G	16·2	15·975	4·611		Rf 0·37	Serine	
3	H	15·5	±0·1601	±0·0462		Rf 0·20	Glutamic acid	
4	T	16·1						0·297
					Rf 0·48	Rf 0·78	Proline	
					Rf 0·40	Rf 0·37	Serine	
						Rf 0·19	Glutamic acid	
5	D	14·8						
6	A	15·1	15·075	4·351				
7	R	15·4	±·1213	±0·0350				
8	K	15·0						
9	Control	15·0	—	4·329	Nil	Nil	Nil	

Statistical significance factor $3(a^2 + b^2)^{1/2} <$ the diff. of the two average titre readings, where a and b are the statistical errors of the two averages. Since 0·6024 <0·9000, therefore the result is significant.

Remark :—Four amino acids were synthesised in the mixtures exposed to light whereas similar mixture kept in dark indicated the formation of only three amino acids. The amino acid rings developed on the chromatogram with the mixtures exposed to light were much intense in colour than in similar mixtures kept in dark indicating thereby greater concentration of amino acids synthesised in the mixtures exposed to light. The intensity of the rings of individual amino acids synthesised in the mixtures was of the following order :

Light : Glutamic acid > serine > proline > alanine

Dark : Glutamic acid > serine > proline.

Photochemical fixation of nitrogen in the mixture containing paraformaldehde as the source of carbon and molybdic acid as the catalyst after an exposure of about 450 hours
(Variation of temperature during the exposure : 32°C to 52°C)

Serial number	Condition	Titre reading of N/48·5 sulphuric acid in ml. for amonia produced by the mixture	Statistical average	Nitrogen fixed in mg. in the mixture	Rf. values of amino-acids in Butanol-water acetic-acid	Rf. values of amino-acids in Pheonal-water ammonia	Amino acid indentified	Mg. of Nitrogen fixed by light in the total mixture
1	L	21·5			Rf 0·54	Rf 0·78	Proline	
	I				Rf 0·34	Rf 0·51	Alanine	
2	G	21·0	21·125	6·098		Rf 0·33	Serine	
3	H	21·0	±0·1250	±0·0312		Rf 0·21	Glutamic-acid	
4	T	21·0						0·6134
5	D	19·0		5·484	Rf 0·54	Rf 0·79	Proline	
6	A	19·0	19·000	±0·0000	Rf 0·36	Rf 0·50	Alanine	
7	R	19·0	±0·000			Rf 0·34	Serine	
8	K	190				Rf 0·19	Glutamic-acid	
9	Control	18·5	—	5·340	Nil	Nil	Nil	

Statistical significance factor $3 (a^2 + b^2)^{1/2} <$ the difference of the two average reading, where a and b are the statistical errors of the two averages. Since 0·375 <2·125. Tnerefore the result is significant.

Remarks :—Though the nature of the amino acids synthesised in the mixtures exposed to light was similar to the amino-acids formed in the mixtures kept in dark, the intensity and breadth of the amino acid rings developed on the chromatogram in the case of the mixtures exposed to light were far more prominent than in the similar mixture kept in dark. The intensity of the individual amino acid rings was of the following order.

Glutamic acid > Serine > Proline > Alanine.

Source of carbon	Condition	Average ml of N/48·5 sulpuric acid to titrate liberated ammonia	Statistical Error	Significance factor	Diff. of two averages	Remarks
Paraformaldehyde.	Light	15·975	± 0·1601	0·6012	0·9000	Result is significant
	Dark	15·075	± 0·1213			
Tartaric acid.	Light	21·125	± 0·1250	0·3750	2·1250	Result is significant
	Da k	19·000	± 0·0000			

Thus it is proved that tartaric acid is a better source of carbon than paraformaldehyde in the photochemical fixation of nitrogen in aqueous mixtures containing molybdic acid as the catalyst.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are thankful to the Council of Scientific and Industrial Research, India, for financially helping this work.

REFERENCES

1. Bahadur, K., Ranganayaki, S. and Santamaria, L., *Nature*, **182**, 1668 (1958).
2. Giri, *Curr. Sci.*, **20**, 285 (1951); Giri et. al., *Nature*, **168**, 786 (1951); *Curr. Sci.*, **21**, 11 (1952)

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका,
१९६२, ५, ५७-५९

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1962, **5**, 57-59

विभिन्न प्रकार के काँच के बर्तनों में अलानीन का प्रकाश-विघटन

कृष्ण बहादुर तथा राजेन्द्र बहादुर श्रीवास्तव
प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—दिसम्बर ५, १९६१]

सारांश

जीवाणुहनित पानी में अलानीन के विलयन को बेनज़ॉइल परॉक्साइड उत्प्रेरक की उपस्थिति में ७६२ घंटे तक सूर्य के प्रकाश में रखने से अलानीन का प्रकाश-विघटन होता है। यह विघटन सिकॉल काँच के फ्लास्क में कम और क्वार्ट्ज के फ्लास्क में अधिक होता है। सिकॉल फ्लास्क में अलानीन की कुछ मात्रा विघटित हो कर ग्लाइसीन में बदल जाती है, और क्वार्ट्ज के फ्लास्क में अलानीन की कुछ मात्रा विघटित होकर ग्लाइसीन और थ्रियोनीन में बदलती है।

Abstract

Photo-decomposition of alanine in different types of glass vesells. *By* K. Bahadur and R. B. Srivastava, Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad.

When a sterilised aqueous solution of alanine, containing benzoyl peroxide as photo-catalyst, is exposed to sunlight for 762 hours, photolysis of the amino acid takes place and a few new amino acids appear in the mixture. This photolysis to glycine and threonine is more if the exposure is done in quartz flasks than when it is carried out in sigcol flasks.

वैज्ञानिकों की सदैव यह प्रबल इच्छा रही है कि प्रकाश द्वारा रासायनिक क्रियाओं का उत्प्रेरण करें और किसी हद तक वे अपने कार्यों में सफल भी हुये हैं। जीव की उत्पत्ति के लिये जिन कार्बनिक यौगिकों की आवश्यकता पड़ी उनमें से कदाचित् कई प्रकाश-संश्लेषण द्वारा ही संश्लेषित हुये। विशेषकर एमीनो अम्लों का प्रकाश-संश्लेषण अधिक महत्त्व का है क्योंकि संसार के समस्त जीवों में प्रोटीन का होना अनिवार्य है और यह प्रोटीन ऐमीनों से ही बनता है। सन १९५४ में बहादुर[1] ने सूर्य के प्रकाश द्वारा अनेक एमीनो अम्लों का संश्लेषण किया जिनमें प्रमुख हैं: वेलीन, हिस्टीडीन, प्रोलीन, लाइसीन, सीरीन, एस्परटिक अम्ल, ग्लाइसीन, एस्परेजीन और अर्जेनीन। पवलोवस्क्या तथा पैसिस्की[2] ने भी जीवाणुमुक्त पानी, पैराफार-ल्डीहाइड और अमोनियम लवण के मिश्रण में पारबैंगनी किरणों द्वारा एमीनो अम्ल का संश्लेषण किया। र, रंगनायकी तथा सान्टामेरिया[3] ने सन् १९५८ में जीवाणुमुक्त पानी और पैराफारमल्डीहाइड के मिश्रण लिब्डेनम आक्साइड की उपस्थिति में एमीनो अम्ल का संश्लेषण किया। इस संश्लेषण में एमीनो अम्ल इट्रोजन हवा द्वारा प्राप्त हुई।

यहाँ पर हम लोगों ने क्वार्ट्ज और सिकॉल काँच के २५० घन सेमी० के फ्लास्क में बेनज़ॉइल परॉ- उत्प्रेरक की उपस्थिति में एमीनो अम्लों के संश्लेषण का अध्यन किया है। मिश्रण को सर्वप्रथम जीवाणु

हनित करके सूर्य के प्रकाश द्वारा विकिरणीभवन किया गया और जो एमीनो अम्ल इन मिश्रण से संश्लेषित हुये उनका गिरि[४/५/६] द्वारा बताई गई गोल पत्र क्रोमेटोग्राफी विधि द्वारा परीक्षण किया गया।

प्रयोगात्मक

२५० घन सेमी० के दो सिकॉल कंपनी के और एक क्वार्ट्ज के फ्लास्कों में १०० घन सेमी० पुनः आसुत पानी मिलाया गया और इसके साथ साथ हरएक फ्लास्क में अलानीन ०.१ ग्राम, बेनजॉइल ०·०५ ग्राम लिया गया। हरएक फ्लास्क से ४० बूँदों को वाट्मैन नं० १ क्रोमेटोग्राफिक कागज पर चढ़ाया गया और यह देखा गया कि अलानीन के अतिरिक्त और कोई अन्य एमीनों अम्ल अपद्रव्य के रूप में विद्यमान तो नहीं है परन्तु अलानीन के अतिरिक्त कोई भी एमीनो अम्ल नहीं प्राप्त हुआ।

मिश्रण भरे फ्लास्कों पर रुई की ढाट लगा कर १५ पौण्ड भाप के दाब पर ३० मिनट तक गरम करके जीवाणु हनन किया गया। मिश्रण को कमरे के ताप पर २८ घंटे रखा गया और फिर १५ पौण्ड भाप के दाब पर ३० मिनट तक गरम किया गया।

सिकॉल कंपनी वाले एक फ्लास्क को मोटे काले कपड़े से कई बार लपेटा गया, जिससे कि प्रकाश किसी प्रकार अन्दर न प्रवेश कर सके, दूसरे को बिना ढके प्रकाश में रक्खा गया, क्वार्ट्ज के फ्लास्क को बिना ढके ही सूर्य के प्रकाश में रख दिया गया। ७६२ घंटे सूर्य के प्रकाश में रखने के बाद विश्लेषण द्वारा यह देखा गया कि मिश्रण में कितनी मात्रा में नाइट्रोजन का स्थिरीकरण हुआ और कौन-कौन से एमीनो अम्ल संश्लेषित हुये।

एमीनो अम्ल का गोलपत्र क्रोमेटोग्राफी विधि[४/५/६] द्वारा परीक्षण किया गया जिसमें ब्युटेनाल-एसीटिक अम्ल पुनः आसुत जल ४ : १ : ५ के अनुपात में मिश्रण को चलने वाले विलायक के रूप में और ०·१% निनहाइड्रिन का एसीटोन में विलयन एमीनो अम्ल के रंग प्रगट करने के लिये प्रयोग में लाया गया। प्रत्येक परीक्षण में ४० बूँदों को वाट्मैन नं० १ क्रोमेटोग्राफिक कागज पर चढ़ाया गया, इन क्रोमेटोग्रामों को ११०° ताप पर करीब १० मिनट तक गरम किया गया जिससे कि एमीनो अम्लों का रंग पूर्णतः प्रगट हो जाये।

इन प्रगट हुये एमीनो अम्लों को ज्ञात एमीनों अम्लों के साथ साथ चला कर पुष्टि की गई।

सारणी १

विभिन्न प्रकार के काँच के बर्तनों में अलानीन का प्रकाश विघटन

क्रमांक	प्रायोगिक दशा	काँच	नाइट्रोजन की मात्रा, मि० ग्राम में	एमीनो अम्ल
१	प्रकाश	सिकॉल	०१·४४	अलानीन, ग्लाइसीन
२	अन्धकार	सिकॉल	०१·४४	अलानीन, ग्लाइसीन (बहुत ही कम मात्रा
३	प्रकाश	क्वार्ट्ज	०८·६६	अलानीन, ग्लाइसीन, थि (अधिक मात्रा में)

विवेचना

उपर्युक्त सारणी से प्रगट होता है कि बेनज़ॉइल परॉक्साइड की उपस्थिति में सिकॉल काँच फ्लास्क में नाइट्रोजन का स्थिरीकरण बहुत कम मात्रा में होता है परन्तु क्वार्ट्ज के फ्लास्क में काफी मात्रा में स्थिरीकरण होता है। प्रकाश द्वारा सिकॉल फ्लास्क में अलानीन ग्लाइसीन में परिवर्तित हो जाती है। यह परिवर्तन थोड़ी मात्रा में अँधेरे में भी होता है। क्वार्ट्ज के फ्लास्क में अलानीन, ग्लाइसीन और थ्रियोनीन में बदल जाती है और अलानीन से प्रकाश-विघटन द्वारा इस प्रकार बने ग्लाइसीन और थ्रियोनीन की मात्रा सिकॉल फ्लास्क में रक्खे मिश्रण से बहुत अधिक थी।

निर्देश

१. बहादुर, कृष्ण। **नेचर,** १९५४, जून १२, **१३,** ११४।

२. पवलोवस्क्या, टी० ई० और पेसिंस्की, ए० जी०। *Report of International Symposium on "Origin of life on Earth" held in Moscow in* 1957.

३. बहादुर, कृष्ण, रंगनायकी, एस० और सान्टामेरिया, एल०। **नेचर,** १९५४, **१८२,** १६८८।

४. गिरि, के० वी० तथा प्रसाद ए० एल० एन०। **नेचर,** १९५१, **१६८,** ७०६।

गिरि, के० वी०, कृष्णामूर्ति, के० और वेंकटासुब्रमन्यम, टी० डी०। **करेंट साइंस,** १९५२, **२१,** ११।

५. कल्याणकर, जी० डी०, वैद्यनाथन, जी० एस० और गिरि, के० वी०। **एक्सपेरीमेंशिया,** १९५५, **११,** ३५८।

६. वैद्यनाथन, जी० एस०, कल्याणकर, जी० डी० और गिरि के० वी०। **प्रोसी० नेश० एकेड० साइंस (इण्डिया),** १९५५, २४A, २८६-९५।

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!

Sonderabdruck aus dem

Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 117

VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.

Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1063

1963

Nachdruck verboten

[Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad, U. P., India]

Role of sugar concentration on the formation of acids in the culture media of a few strains of *Aspergillus niger*

Krishna Bahadur and **Anant Narain Malviya**

Introduction

Many organic substances particularly sugars containing 2, —3, —4, —5, 6—, 7—, and 12 carbon atom chains may be fermented to citric acid. Maximum yields have been secured from sucrose and fructose. Occasionally glucose under certain specific circumstances have given good yields.

A high concentration of sugar is required to produce high yields of citric acid. CURRIE (1) advocated the use of 125 to 150 gm. of sucrose per litre. DOELGER and PRESCOTT (2) obtained highest yields using 140 gms. of sucrose per litre in fermentations that were allowed to run for 9 to 12 days. SHU and JOHNSON (3) have demonstrated that low yields were obtained with low sugar concentrations. They used 140 to 264 gms. per litre sucrose for citric acid production on the basis of sugar utilized.

In this paper the influence of sugar concentrations on the growth and production of citric and oxalic acids, by four different strains of *Aspergillus niger*, viz., 363, 612, 122 and B have been studied at the pH 1 and pH 1.4. The pH of the culture media was controlled by a buffer solution of potassium chloride and hydrochloric acid.

Experimental

A mineral nutrients solution containing 0.5 gm. sodium chloride, 0.5 gm. potassium sulphate, 0.5 gm. magnesium sulphate, 0.5 gm. calcium chloride, 0.5 gm. mono-sodium dihydrogen phosphate and 2.0 gm. Ammonium sulphate per litre was prepared. 10 ml. of this mineral nutrients were taken in each culture media contained in 250 ml. conical flasks and to each flask 70 ml. of distilled water were added. The culture media were divided into four sets of two culture media each. To the media of one set 20 ml. of potassium chloride and hydrochloric acid buffer solution of pH 1 was added; to the other set the buffer solution of pH 1.4 was added.

To the one set of the above culture media 5 gms. of sucrose as the source of carbon, and to the other three sets, 10 gms., 15 gms. and 20 gms. of sucrose were added. Flasks were cotton plugged and sterilized in an autoclave at 15 lbs. steam pressure for 30 minutes. After sterilization the culture media were rearranged in four sets each containing 5 gms., 10 gms., 15 gms., and 20 gms. sucrose at pH 1 and pH 1.4. Each set was seeded by a trace of a strain of *A. niger*. Following four strains were selected for the study.

Strain No.		Source
1.	363	Indian Agricultural Research Institute, New Delhi
2.	612	National Chemical Laboratory, Poona
3.	122	
4.	B	Dr. B. S. Mehrotra, Botany Department Allahabad University

The culture media were kept at 30° C in an incubator and were analysed after 10 days. The *Aspergillus niger* fungus were separated from the culture solution by filtration through a dried and weighed filter paper. The mass of the fungus were washed 4 or 5 times with distilled water, dried at 70—80° C in an air oven, cooled in a desiccator and weighed.

The culture solution was made upto 200 ml. Hundred ml. of this solution was taken out and made neutral by the addition of Ammonia. To this hot and neutral solution 2 percent calcium chloride solution was added to completely precipitate citric and oxalic acid which is formed during fermentation as calcium citrate and calcium oxalate.

The 50 ml. of the remaining solution were taken in another flask. This was hydrolysed with a few c.c. of dilute hydrochloric acid and was made up to 100 ml. This solution was titrated against boiling standard Fehling solution using methylene blue as an indicator near the end point to find out the gms. of the reducing materials present in the terms of glucose after the fermentation.

The precipitate of citrate and oxalate were filtered, dried and weighed. The precipitate of weighed citrate and oxalate was treated with hot acetic acid. The precipitate of calcium oxalate was again washed 3 or 4 times with distilled water and dried. Thus the amount of citric and oxalic acid was calculated.

Observations

Sugar concentration	Weight of the fungus	gm. of the reducing materials left in terms of glucose	gm. of citric acid	gm. of oxalic acid
		pH 1, Strain No. 363		
5%	0.3272	4.800	0.0995	0.0169
10%	0.2900	6.9785	0.0600	0.0042
15%	0.4300	11.7777	0.0132	0.0018
20%	0.6192	10.258	0.1450	0.0140
		pH 1, Strain No. 612		
5%	0.5198	4.4257	0.0047	0.0237
10%	0.1698	9.1113	0.0746	0.0133
15%	0.3682	9.0882	0.0005	0.0164
20%	0.9194	15.90	0.0009	0.0028
		pH 1, Strain No. 122		
5%	0.4760	4.1329	0.0164	0.0028
10%	0.0830	7.1304	0.0649	0.0039
15%	0.3788	13.250	0.0121	0.0015
20%	0.3350	11.3570	0.0036	0.0015
		pH 1, Strain No. B		
5%	0.2234	4.5746	0.0426	0.0184
10%	0.2590	7.6278	0.0289	0.0007
15%	0.3498	10.3512	0.0017	0.0012
20%	0.5254	11.3570	0.0011	0.0056

Sugar concentrations	Weight of the fungus	gm. of the reducing materials left in terms of glucose	gm. of citric acid	gm. of oxalic acid
		pH 1.4, Strain No. 363		
5%	0.3542	4.2960	0.0580	0.0197
10%	0.5530	6.5600	0.0610	0.0217
15%	1.0170	9.3529	0.1156	0.0056
20%	1.4598	9.9378	0.1423	0.0066
		pH 1.4, Strain No. 612		
5%	0.3964	4.3533	0.0665	0.0056
10%	0.9010	7.6278	0.0263	0.0014
15%	0.6320	7.9500	0.0039	0.0007
20%	1.1424	12.7200	0.0047	0.0042
		pH 1.4, Strain No. 122		
5%	0.8580	3.9816	0.0210	0.0042
10%	0.5168	9.3714	0.0710	Nil
15%	0.5638	13.826	0.0030	0.0054
20%	1.4686	9.6363	0.0032	0.0067
		pH 1.4, Strain No. B		
5%	0.1880	4.800	0.0199	0.0204
10%	0.4500	8.8648	0.0379	0.0040
15%	0.3162	9.6363	0.0094	0.0113
20%	0.8872	12.2307	0.0037	0.0063

Discussion

The strain No. 363 at pH 1 gives a maximum yield of citric acid at 20% concentration and at pH 1.4; this strain of *A. niger* produces citric acid which bears a relationship with the sugar concentration of the culture media i. e., at pH 1.4. The yield of the citric acid by the strain No. 363 increases with the rise of the concentration of the sugar of the culture media, while the oxalic acid formation is maximum at low concentration and decreases with the rise in the concentration of the media.

In the case of strain No. 612 and No. 122 the formation of the citric acid is maximum at lower concentration and it goes on reducing at high concentration. In the case of strain B no relationship between the formation of acids and the sugar concentration of the media can be established and this strain is a very poorly growing organism.

In the case of the strains 363 and 612, the growth of the mycelium increases with the rise in the concentration of the culture media at pH 1.4. While at pH 1 and in the case of strains 122 and B the growth of the mycelium is very irregular.

Summary: At pH 1 the strain No. 363 gives maximum production of citric acid at 20% concentration and the production of citric acid gt pH 1.4 by the same strain increases with the rise in the sugar concentration of the culture media. In the case of strain No. 612 the citric acid formation is maximum at lower concentration and decreases with the rise in the concentration of the media.

Acknowledgements: Authors are very thankful to C. S. I. R. for financing the research and to Dr. B. S. Mehrotra for giving the strain No. B for our studies. We are also thankful to National Chemical Laboratory, Poona, and I. A. R. I., New Delhi for providing us their strains of *A. niger* for our investigations.

References

1. Currie, J. N., J. Biol. Chem. **31**, 15—37 (1917). — 2. Doelger, W. P., and S. C. Prescott, Ind. Eng. Chem. **26**, 1142 (1934). — 3. Shu, P., and M. J. Johnson, Paper presented at meeting of A.C.S. at Atlantic City. April (1947).

Anschrift der Verfasser:
Prof. Dr. Krishna Bahadur and Anant Narain Malviya, Chemical Laboratories, University of Allahabad 68 Dilkusha, New Katra, Allahabad-2 (Indien)

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

किण्वाणुक सक्रियता के लिये कार्बनिक यौगिक तथा अकार्बनिक लवणों के किरणीयित जलीय मिश्रणों की परीक्षा

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा इन्द्रा सक्सेना

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका,

१९६३, भाग ६, पृष्ठ १६१-१६८ से पुनर्मुद्रित

Examination of the irradiated aqueous mixtures of organic compounds and inorganic salts for enzymic activity

By

Krishna Bahadur and Indra Saxena

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*,

1963, Vol 6, page 161-168

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका,
१९६३, ६, १६१-१६८

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1963, 6, 161-168

किण्वाणुक सक्रियता के लिये कार्बनिक यौगिक तथा अकार्बनिक लवणों के किरणीयित जलीय मिश्रणों की परीक्षा

कृष्ण बहादुर तथा इन्द्रा सक्सेना
रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय इलाहाबाद

[प्राप्त—अक्तूबर १७, १९६३]

सारांश

विसरित प्रकाश में अनुप्रभावित किये जाने पर एमीनो अम्ल तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक युक्त मिश्रणों में फास्फेटेज सक्रियता देखी गई। यह सक्रियता उन मिश्रणों द्वारा भी प्रदर्शित की गई जिनमें सिट्रिक अम्ल, अकार्बनिक उत्प्रेरक, फास्फेट प्रतिरोधक तथा सूक्ष्म मात्रा में Ca^{++}, Mg^{++}, Zn^{++}, K^{+}, Na^{+}, Cl^{-} तथा SO_4^{--} जैसे खनिज आयन वर्तमान रहते हैं। इन मिश्रणों को सूर्य के प्रकाश में अनुप्रभावित करने पर ही यह सक्रियता देखी जाती है।

Abstract

Examination of the irradiated aqueous mixtures of organic compounds and inorganic salts for enzymic activity. *By* Krishna Bahadur and Indra Saxena, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

The phosphatase activity has been shown by the mixtures containing amino acids together with inorganic catalyst on exposure to diffused light and also by the mixtures containing citric acid, inorganic catalyst, phoshpate buffer and small quantities of minerals such as Ca^{++}, Mg^{++}, Zn^{++}, K^{+}, Na^{+}, Cl^{-} and SO_4^{--} when these mixtures are exposed to sunlight.

अजीव-जनन विधि से एमीनो अम्लों का बनना, एमीनो अम्लों के अणुओं के सम्मिलन द्वारा पेप्टाइड बन्ध का बनना और किण्वाणुक सक्रियता के लिये इस प्रकार बने हुए पेप्टाइडों की परीक्षा, ये biopoesis के अध्ययन के कुछ मुख्य पहलू हैं।

आधुनिक जीवित प्रणालियों की अधिकांश अभिक्रियायें किण्वों द्वारा उत्प्रेरित होती हैं और **पीरी** के अनुसार, अपनी किण्वाणुक सक्रियता के कारण जीवित प्रणाली के लिये प्रोटीन महत्त्वपूर्ण हैं। किण्व प्रोटीन हैं और अब तक अपने द्वितीयक तथा तृतीयक संरचना वाले प्रोटीन, तथा एमीनों अम्लों का विशिष्ट क्रम, केवल कोशा के अन्दर ही संश्लेषित हुए हैं। न्यूक्लीइक अम्ल, प्रोटीन शृंखला में एमीनो अम्लों की निश्चित स्थिति के विनिधान में महत्त्वपूर्ण कार्य करता है। इस प्रकार से किण्व, जीवित प्रणालियों की अभिक्रिया को नियन्त्रित करते हैं, किण्व प्रोटीन हैं और प्रोटीन केवल जीवित कोशाओं में ही संश्लेषित होता है और एक अजीव-शास्त्रवेत्ता के लिये यह कल्पना करना कठिन हो जाता है कि किस प्रकार किण्वाणुक सक्रियता के साथ प्रथम जीवित प्रणाली का जन्म हुआ।

इस समस्या के लिये पहला उपागम उन प्राकृतिक दशाओं की खोज करनी थी जिनके अन्तर्गत एमीनो अम्ल बनते हैं। मिलर[१,२] ने देखा कि अमोनिया, मीथेन, हाइड्रोजन, कार्बन मोनोऑक्साइड तथा जल के मिश्रण में विद्युत-विसर्जन प्रवाहित करने से एमीनो अम्ल संश्लेषित होते हैं। बहादुर तथा सहकारियों ने[३–६] सूचना दी है कि जलीय विलयनों में एमीनो अम्लों का प्रकाश-रासायनिक संश्लेषण होता है एमीनो अम्लों के निर्माण में सहायक, इन सम्भावित प्रक्रमों की खोज के अनन्तर, पेप्टाइडों के निर्माण की खोज प्रारम्भ की गई। फॉक्स[७] ने एमीनो अम्ल के मिश्रण को १७०° पर कुछ घण्टों तक गरम करके पेप्टाइडों को संश्लेषित किया। बहादुर तथा सहयोगी एमीनो अम्लों के निर्वीजित जलीय विलयनों को प्रकाश में अनुप्रभावित करके पेप्टाइड संश्लेषित करने में सफल हुए[८–१२]। इन मिश्रणों में कार्बनिक पदार्थ तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक थे।

इन किरणीयित मिश्रणों में पेप्टाइडों की उपस्थिति प्रदर्शित होने के पश्चात्, इनमें किण्वाणुक सक्रियता के प्रक्रम की परीक्षा का प्रयास किया गया। इस अध्ययन के लिये कुछ धात्विक लवणों के साथ एमीनों अम्लों के मिश्रणों को अनुप्रभावित किया गया। कई अकार्बनिक आयन उत्प्रेरकीय सक्रियता प्रदर्शित करते हैं और यह देखने का प्रयास किया गया कि मिश्रण में अनुप्रभाव के फलस्वरूप बने उत्पाद के साथ धात्विक आयनों का सम्मिलन, फास्फेटेज़ सक्रियता के रूप में किण्वाणुक कार्य प्रदर्शित करता है या नहीं।

इस अध्ययन के लिये मिश्रण की दो श्रेणियाँ चुनी गईं। मिश्रणों की एक श्रेणी में अकार्बनिक उत्प्रेरक के साथ विविध एमीनो अम्लों को विसरित प्रकाश में अनुप्रभावित किया गया। दूसरी श्रेणी के मिश्रण में केवल एक कार्बन स्रोत, खनिज, प्रतिरोधक तथा पानी थे। इसमें एमीनों अम्लों का निर्माण प्रकाश-रासायनिक विधि से हुआ और सूर्य के प्रकाश के प्रभाव के अन्तर्गत इन एमीनो अम्लों ने मिलकर पेप्टाइडों का निर्माण किया। इस प्रक्रम में वायुमण्डलीय नाइट्रोजन का स्थिरीकरण होता है और यह संश्लेषित एमीनो अम्लों में प्रगट होता है[१३]। इन मिश्रणों में, वृद्धि तथा उपापचय क्रिया में समर्थ सक्रिय इकाइयों की उपस्थिति देखी गई है। मिश्रणों का चुनाव फॉस्फेटेज़ सक्रियता की परीक्षा के लिये किया गया है। दोनों श्रेणियों में यह देखा गया है कि अनुप्रभावित मिश्रण फॉस्फ़ेटेज़ सक्रियता उत्पन्न कर लेते हैं। सभी प्रयोगों में, समरूप मिश्रण एक नियन्त्रण के रूप में अँधेरे में भी रक्खे गये।

प्रयोगात्मक

प्रयोगों की पहली श्रेणी में २५० मिली० के शंक्वाकार फ्लास्कों में बारह मिश्रण बनाये गये जिसमें प्रत्येक में एमीनो अम्ल तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक थे जिनका वर्णन नीचे किया गया है :

फ्लास्क संख्या	अन्तर्वस्तु	
	एमीनो अम्ल (०·०५ ग्राम)	अकार्बनिक उत्प्रेरक (०·०१ ग्राम)
१—१′	हिस्टीडीन हाइड्रोक्लोराइड	निकेल सल्फेट
२—२′	ग्लाइसीन	कोबाल्ट सल्फेट
३—३′	ग्लुटैमिक अम्ल	मैंगनीज सल्फेट
४—४′	ग्लुटैमिक अम्ल	जिंक सल्फेट
५—५′	ऐस्पर्टिक अम्ल	जिंक सल्फेट
६—६′	ऐस्पर्टिक अम्ल	मैगनीशियम सल्फेट

प्रत्येक फ्लास्क में काँच के बर्तन में एमीनो अम्लों से मुक्त आसवित जल का १०० मिली० मिलाया गया। फ्लास्कों में रुई की डाट लगाकर उन्हें २० पौंड दाब में एक ऑटोक्लेव में ३० मिनट तक निर्बीजित किया गया। फ्लास्क संख्या १′ से ६′ को काले कपड़े की चार तहों से लपेटा गया और फ्लास्क संख्या १ से ६ को सफेद अल्पपारदर्शक टिशू कागज से ढका गया। अनुप्रभाव के लिये सभी फ्लास्क १००० वाट वाले वैद्युत-प्रकाश के नीचे प्रकाश-स्रोत से एक मीटर की दूरी पर रक्खे गये। फ्लास्कों को सफेद टिशू कागज से ढका गया था ताकि वे प्रत्यक्ष प्रकाश के सम्पर्क में न आयें और मिश्रणों को केवल विसरित प्रकाश ही मिले। ७५ दिन के पश्चात् मिश्रणों में फॉस्फेटेज़ सक्रियता की परीक्षा की गई।

दूसरी श्रेणी के मिश्रण बनाने के लिये निम्न विलयन बनाये गये :—

१. खनिज विलयन

पोटैसियम सल्फेट ०·०२ ग्राम, कैल्सियम एसीटेट ०·०२ ग्राम, मैगनीशियम सल्फेट ०·०२ ग्राम और जिंक सल्फेट ०·००२ ग्राम, को पुनः आसवित जल १०० मिली० में घोला गया। इसमें ०·०२ ग्राम पोटैसियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट मिलाया गया और इसे घोलने के लिये मिश्रण को फिर से हिलाया गया।

२. सिट्रिक अम्ल विलयन

०·४ ग्राम सिट्रिक अम्ल को १०० मिली० पुनः आसवित जल में घोला गया।

३. प्रतिरोधक विलयन

०·०२ ग्रामाणु पोटैसियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट ५० मिली० तथा ०·०२ ग्रामाणु सोडियम हाइड्राक्साइड विलयन के ५.७ मिली० को ७ पी-एच प्राप्त करने के लिये मिलाया गया और पी-एच मापी द्वारा पी-एच की जाँच की गई।

४. फेरिक आक्साइड कलिल बनाना

उपर्युक्त कलिल बनाने के लिये, डेबेर तथा क्रेके[१५,१६] की विधि अपनाई गई जिसमें फेरिक का जलविश्लेषण किया जाता है। जलविश्लेषण के लिये, लवण के सान्द्र विलयन को उबलते हुए पानी में धीरे-धीरे तब तक डाला जाता है जब तक उसमें गंदलापन नआ जाये और फिर उसमें HCl निकालने और इस प्रकार जलविश्लेषक अभिक्रिया के उत्क्रमण को रोकने के लिये, उसका अपोहन किया गया। फेरिक क्लोराइड के सान्द्र विलयन को उबलते हुए पानी में गंदलापन आने तक डाला गया। परिणामी लाल रंग के विलयन को ७ दिन तक अपोहित किया गया। इसका परीक्षा करने पर इसे Cl^- तथा नाइट्रोजनीय अपद्रव्यों से मुक्त पाया गया। इस कलिलीय विलयन के १० मिली० में ०.०८ ग्राम फेरिक आक्साइड था।

५. मॉलिब्डनम आक्साइड का विलयन

ग्राहम[१७] की विधि के अनुसार मॉलिब्डनम ट्राइआक्साइड बनाया गया। पोटैसियम मॉलिब्डेट के ५% विलयन में HCl का सान्द्र विलयन बूँद-बूँद करके अनवरत विलोडन के साथ तब तक डाला गया जब तक इसकी मात्रा कुछ अधिक न हो गई। सम्पूर्ण अन्तर्वस्तु को १५ दिन तक अपोहित किया गया और प्राप्त हुए

विलयन को नाइट्रोजनीय अपद्रव्यों तथा एमीनो अम्लों से मुक्त पाया गया। इस कलिल के १० मिली० में ०·०१ ग्राम मॉलिब्डनम आक्साइड था।

२५० मिली० शंक्वाकार फ्लास्कों (धौलपुर ग्लास वर्क्स) में ६ मिश्रण बनाये गये। इन फ्लास्कों के अवयव निम्न थे :—

पहले ६ मिश्रण, जिनमें प्रत्येक में, ०·४ सिट्रिक अम्ल का १० मिली० ,उपर्युक्त फेरिक आक्साइड कलिल का १० मिली० और मॉलिब्डनम आक्साइड कलिल का १० मिली० था, बनाये गये। इनमें निम्न विलयन मिलाये गये :—

पहले दो मिश्रणों (१—१′) में से प्रत्येक में १० मिली० आसवित जल तथा उपर्युक्त प्रतिरोधक का १० मिली० मिलाये गये। दो मिश्रणों (२—२′) के दूसरे सेट में १० मिली० आसुत जल तथा १० मिली० खनिज पोषक मिलाये गये। दो मिश्रणों (३—३′) के तीसरे सेट में १० मिली० खनिज पोषक तथा १० मि ली० प्रतिरोधक विलयन मिलाये गये। छहों फ्लास्कों में रुई की डाट लगाई गई तथा ऑटोक्लेव में २० पौंड दाब में ३० मिनट तक निर्बीजित किया गया। सभी फ्लास्कों का मुँह पॉलीथीन पत्र से बन्द किया गया। तीनों सेटों में से तीन फ्लास्कों (१′—३′) को काले कपड़े की चार तहों से ढक कर और अन्य फ्लास्कों को उसी प्रकार सूर्य के प्रकाश में रक्खा गया। ढके हुए फ्लास्कों को, बिना ढके हुए फ्लास्कों के समीप ही रक्खा गया ताकि प्रयोग के समय सभी मिश्रणों को, अनुप्रभाव के अतिरिक्त अन्य दशायें एक सी मिलें।

प्रयोग की दोनों श्रेणियों में, अनुप्रभाव तथा अननुप्रभावित विलयनों की फॉस्फेटेज़ सक्रियता के लिये परीक्षा की गई।

फॉस्फेटेज़ सक्रियता के अध्ययन के लिये निम्न विलयन बनाये गये :—

काँच के बर्तन में कार्बन डाइआक्साइड विहीन आसुत जल निम्न विलयनों के बनाने में उपयोग किया गया :—

अमोनियम मॉलिब्डेट का विलयनः—

N/20 H_2SO_4 में अमोनियम मॉलिब्डेट का ३% विलयन बनाया गया।

ऐस्कार्बिक अम्ल का विलयनः—

ऐस्कार्बिक अम्ल का ३% विलयन बनाया गया।

सोडियम पाइरोफास्फेटः—

१०० मिली० पानी में सोडियम पाइरोफास्फेट का ०·०१ ग्रामाणु विलयन बनाया गया।

प्रतिरोधक विलयनः—

(१) एल० माइकेलिस—एसीटेट वेरोनल प्रतिरोधक बनाया गया जिसका पी-एच ६.७ था।

(२) ४ पी-एच वाले, सोडियम एसीटेट तथा एसीटिक अम्ल का एक प्रतिरोधक विलयन बनाया गया।

विधि :—

एक नली में एसीटेट वेरोनल विलयन का ५ मिली० लिया गया और इसमें प्रयोग की पहली श्रेणी के प्राप्त विलयन का १० मिली० मिलाया गया। दूसरी श्रेणी के मिश्रणों की फॉस्फाटेज़ सक्रियता देखने के लिये मिश्रण के विलयन का १ मिली० लेकर १० मिली० तक तनूकृत किया गया और फिर इस तनूकृत विलयन के १ मिली० का उपयोग किया गया। ऊपर के मिश्रण में, सोडियम पाइरोफॉस्फेट विलयन का १ मिली० मिलाया गया। मिश्रण को मिश्रित किया गया और ३० से० पर १० मिनट के लिये रख दिया गया।

ऊपर के विलयन का ५ मिली०, ३०° पर रखे सोडियम एसीटेट, एसीटिक अम्ल प्रतिरोधक के ३ मिली० के साथ मिलाकर मिश्रण को ३०° पर छोड़ दिया गया। १० मिनट के अनन्तर, ०·२ मिली० ऐस्कार्बिक अम्ल तथा ०·२ मिली० अमोनियम मॉलिब्डिनम विलयन मिलाये गये। धीरे-धीरे एक नीला रंग उत्पन्न हुआ। रंग की तीव्रता को, १० मिनट बाद ६० संख्या के लाल छन्ने का प्रयोग करते हुए, क्लेट समरसन प्रकाश-वैद्युत वर्णमापी में मापा गया।

साथ-ही-साथ किण्वभोज (sbstrate) फास्फेट के तात्कालिक जलविश्लेषण का लेखा देने के लिये, प्रमाणित विलयन का नियन्त्रण पठन कर लिया गया जिसमें न तो अनुप्रभावित और न अननुप्रभावित विलयन थे। इस मिश्रण का आयतन, नियन्त्रण में, पुनः आसवित जल का १ मिली० मिलाकर पूरा किया गया। प्रयोग की प्रथम श्रेणी में प्राप्त फलों को नीचे सारणी बद्ध किया गया है :—

सारणी १

क्लेट समरसन प्रकाश-वैद्युत वर्णमापी से प्राप्त पठनों के अन्तर के आधार पर, मिश्रण को, जिसमें एमीनो अम्ल तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक थे, किरणीयित करने पर देखी गई फॉस्फाटेज सक्रियता

क्रम संख्या	अन्तर्वस्तु	नियन्त्रण	अनुप्रभावित	अननुप्रभावित
१—१′	हिस्टीडीन + $NiSO_4$	२८०	३३०	२९५
२—२′	ग्लाइसीन + $CoSo_4$	१७३	१९७	१८७
३—३′	ग्लुटैमिक अम्ल + M_nSO_4	३६२	४२२	४०९
४—४′	ग्लुटैमिक अम्ल + Z_nSO_4	४०८	४१८	४११
५—५′	ऐस्पर्टिक अम्ल + Z_nSO_4	४०५	४७०	३७०
६—६′	ऐस्पर्टिक अम्ल + $MgSO_4$	३७६	४४२	३४१

दूसरी श्रेणी के मिश्रणों की तब परीक्षा की गई जब वे सूर्य के प्रकाश में अनुप्रभावित करने पर गँदले हो गये।

श्रेणी संख्या २ :

समान संघटन वाले किन्तु खनिज पोषक विलयन अथवा प्रतिरोधक विलयन से रहित, मिश्रण फॉस्फेटेज़ सक्रियता के अध्ययन के लिये कुछ दिनों के लिये यह खोज करने के लिये रक्खे गये कि फॉस्फेटेज़ सक्रियता प्रगट होने के लिये, इन मिश्रणों में खनिजों तथा प्रतिरोधक विलयनों की उपस्थिति आवश्यक है या नहीं। इस प्रकार प्रत्येक प्रकार के दो अन्य मिश्रण इस अध्ययन के लिये बनाये गये, जिनके संघटन का वर्णन प्रयोगात्मक अंश में किया जा चुका है।

सारणी २

दूसरी श्रेणी के मिश्रणों के अनुप्रभाव काल की वृद्धि के साथ-साथ फास्फेटेज़ सक्रियता का अध्ययन

मिश्रणों की क्रम संख्या	अनुप्रभाव काल (दिन)	क्लेट समरसन प्रकाश-वैद्युत वर्णमापी का ०–२० मिनटों के अन्तर में पठनांक		
		नियन्त्रित	अनुप्रभावित	अननुप्रभावित
१—१′	११	१८	९४	७८
	१८	४१	३४३	९०
२—२′	१०	४०	१८५	१२५
	२०	३३	१३५	११५
३—३′	८	४८	१७३	१२०
	१७	३७	१६५	१५६

सारणी ३

दूसरी श्रेणी के मिश्रण संख्या ३ के समय की वृद्धि के साथ-साथ फॉस्फेटेज़ सक्रियता का अध्ययन

अनुप्रभाव काल (घंटे)	नियन्त्रित	अनुप्रभावित	अननुप्रभावित
१७	२२	२५५	२०८
२८	९८	५७०	५३०
३६	३९	४४०	३६५

विवेचना

यह देखा गया है कि कृत्रिम विसरित प्रकाश में अनुप्रभावित किये जाने पर, विभिन्न एमीनो अम्ल तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक वाले मिश्रण बहुलीकृत हो जाते हैं और इस प्रकार जो उत्पाद बनता है उसमें फास्फेटेज़ सक्रियता होती है।

आगे यह देखा गया कि वे मिश्रण जिनमें सिट्रिक अम्ल, कलिलीय मॉलिब्डनम तथा लोह आक्साइड, खनिज पोषक तथा ६ पी-एच वाला प्रतिरोधक सम्मिलित थे और जिनमें ऐमिनी अम्ल तथा पेप्टाइड निर्मित हुये, वे सूर्य के प्रकाश में अनुप्रभावित किये जाने पर १७ घंटे के पश्चात् फॉस्फेटेज़ सक्रियता प्रदर्शित करते हैं। यदि इन मिश्रणों को खनिज अथवा प्रतिरोधकों से वंचित रक्खा जाय तो फॉस्फेटेज़ सक्रियता लाने के लिये, लम्बी अवधि के अनुप्रभाव की आवश्यकता होती है।

केवल कार्बनिक अणु तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक वाले मिश्रण में १८ दिन तक फॉस्फेटेज़ सक्रियता में वृद्धि नहीं होती और अँधेरे में रक्खे गये समान मिश्रण में भी बहुत ही कम फॉस्फेटेज़ सक्रियता देखी जाती है। यदि मिश्रण में फास्फेट प्रतिरोधक तथा जैव खनिज हों तो अँधेरे में रक्खे गये मिश्रण में भी यथेष्ट फॉस्फेटेज़ सक्रियता होती है यद्यपि यह सक्रियता अनुप्रभावित मिश्रणों की सक्रियता से सदा कम होती है। अनुप्रभाव की अवधि बढ़ाने के साथ-साथ फॉस्फेटेज़ सक्रियता कम होती जाती है। फिर भी यहाँ यह उल्लेख करना रोचक होगा कि जीवाणुओं का बनना, सिट्रिक अम्ल, फेरिक तथा मॉलिडिनम आक्साइड कलिलों वाले मिश्रणों में बहुत ही मन्द होता है और इसके लिये सूर्य के प्रकाश के अनुप्रभाव के १००० घंटे अथवा अधिक की आवश्यकता होती है परन्तु इस मिश्रण में जिसमें अकार्बनिक उत्प्रेरकों के साथ-साथ फॉस्फेट प्रतिरोधक तथा जैव-पोषक भी होते हैं। जीवाणुओं का बनना केवल ९ घंटे के अनुप्रभाव के अनन्तर ही देखा जाता है। इस प्रकार फॉस्फेटेज़ सक्रियता प्रदर्शित करने वाले कुछ यौगिक जीवाणुओं द्वारा अवरुद्ध हो जाते हैं और इस मिश्रण में फास्फेटेज़ सक्रियता कम हुई दिखाई पड़ती है।

निर्देश

१. मिलर, एस० एल०। **साइंस,** १९५३ **११७,** ५२८।

२. मिलर, एस० एल०। **जर्न० अमे० केमि० सोसा०,** (१९५५) ७७, २३५१,।

३. बहादुर, के०। **नेचर,** (१९५४) **१७३,** ११४१।

४. बहादुर, के० तथा रंगानायकी, एस०। **प्रोसी० नेश० एके० साइं० इण्डिया,** (१९५४) २३, २१-२३।

५. बहादुर, के० तथा रंगानायकी, एस०। **काम्प्ट रेण्ड** (१९५५) २४०, २४६-२४८।

६. बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी०। **जुर्नल, ओशी, कुमू यू० एस० एस० आर०** (१९६१) ३१वाँ ३१७-३२०।

७. फॉक्स, एस० डब्ल्यू, हार्डा, के० तथा वेगोटस्की, ए०। **एक्सपीरियेन्शिया,** (१९५९) **१५,** ८१।

८. बहादुर, के० तथा रंगानायकी, एस०। **प्रोसी० नेश० एके० साइं० इण्डिया,** (१९५८) २७, २९२-२९५।

९. बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी०। **इण्डि० जर्न० एप्लाइड केमि०,** (१९६१) २३, २३१,।

१०. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के० तथा पाठक एच० डी०। **प्रोसी० नेश० एके० साइं० इण्डिया** (१९६१) ३०, २०६-२२०।

११. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के० तथा पाठक, एच० डी०। **इण्डि० जर्न० एप्लाइड केमि०,** (१९६१) २५, ९०-९६।

१२. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के० तथा पाठक, एच० डी०। **बायो किमिया,** (१९६२) २७, ७०८, ७१४।

१३. बहादुर, के०, रंगानायकी, एस० तथा सान्तामेरिया, एल०। **नेचर,** (१९५८) १८२, १६६८।

१४. बहादुर, के० तथा सहकारी। **विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका** (१९६३) ६, १-५६।

१५. डेबरे। **काम्प्ट रेण्ड** (१८६९) ६८, ९१४।

१६. क्रेके। **जर्न० प्रैक्टीकल केमि०,** (१८७१) ३, २८६-२९५।

१७. ग्राहम। **एन्न०** (१८६५) १३५, ६५।

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!

Sonderabdruck aus dem

Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 117

VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.

Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1063

1964

Nachdruck verboten

Synthesis of Jeewanu

The units capable of growth, multiplication and metabolic activity

II. Photochemical preparation of growing and multiplying units with metabolic activities

Krishna Bahadur, H. C. Verma, R. B. Srivastva, K. M. L. Agrawal, R. S. Pandey, Indra Saxena, A. N. Malviya and **Vinod Kumar**

[Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad, India]

O. N. Perti and **H. D. Pathak**

[Chemistry Department, Govt. Degree College, Naïnital, India]

With 4 figures in the Text

Units capable of growth, multiplication and metabolic activity as described in the first section of this paper can be prepared photochemically. It has been observed that photosynthesis of amino acids can be achieved in sterilised mixtures of paraformaldehyde, water and colloidal molybdenum oxide, by irradiating the mixture with visible radiations. In aqueous solutions of amino acids, peptides are formed when exposed to light in presence of inorganic catalysts. If longer exposure is provided in these series of experiments "Active Units" described under first section of this paper are formed. These units when first formed are of about 0.5 μ or less in diameter. These increase in size with time and start multiplying by budding. Several series of experiments have been carried out to this effect and a few of these are described below:

1. Preparation of units capable of growth, multiplication and metabolic activity by irradiating a mixture of paraformaldehyde, water and molybdic acid and ferric chloride.

Procedure: The following mixtures are prepared in eight 250 ml pyrex conical flasks.

Paraformaldehyde	0.2 gm.
Molybdic acid	0.01 gm.
Ferric chloride	0.01 gm.
Water	100.00 ml.

Flasks containing these mixtures were cotton plugged and sterilised at 15 lbs pressure for 30 minutes. The mouths of these flasks were covered with polythene sheet and four of these

flasks were covered with four folds of thick black cloth and four of the flasks were kept as such for exposure. All these flasks were kept in sunlight for eight hours of exposure each day. The room temperature during this period of exposure was between 15° to 25° C.

After an exposure of 500 hours the mixture started becoming turbid. It was examined under microscope and globules of size 0.25 to 0.5 μ appeared in the mixture. These had some mobility and appeared to have a dark central portion and an outer membrane. Similar mixtures kept in dark did not show the formation of such globules.



Fig. 1. Micro-photograph of the active units prepared photochemically showing a small bud still attached to the parent unit (Photographed at 1000 magnification)

These globules were kept under observation during the exposure which was continued for 1000 hours. These become bigger in size during this period (1 to 1.5 μ) and show various stages of budding. After the said period of exposure the active units were separated by centrifuge, and dried in a vacuum desiccator over anhydrous calcium chloride. The weight of the dry material obtained in the four flasks were 0.0326 gm., 0.0325 gm., 0.0330 gm., and 0.0328 gm. The environmental medium was also dried. The dried materials of the globules and the environmental media were analysed for their free amino acids contents. The globular matter did not show the presence of any free amino acids but the environmental material showed the presence of glycine and alanine. These dried materials were hydrolysed with 1 ml. of 6 N hydrochloric acid and 5 ml. of distilled water in a sealed tube by heating in water bath for 20 hours. The hydrolysed product thus obtained was filtered and dried in vacuum desiccator containing fused sodium hydroxide and anhydrous calcium chloride. The dried material thus obtained was treated with 2 ml. of water and again dried in the desiccator. These on chromatographic analysis showed that the dried material of the globular matter contained glycine, alanine, arginine, histidine, lysine, aspartic acid and glutamic acid with a few more

faint spots of other amino acids which could not be identified with certainty. The hydrolysed product of the environmental medium did not show any spot other than glycine and alanine.

2. Preparation of units capable of growth, division and metabolic activity in mixtures containing citric acid, water and colloidal molybdenum oxide and ferric oxide as catalysts by using sun-light as the source of irradiation.

Mixtures containing 1.60 gm. citric acid, 40 ml. ferric oxide sol, 40 ml. molybdenum oxide sol and 140 ml. glass distilled water were exposed to sunlight after sterilisation at 15 lbs pressure for 30 minutes. Similar mixtures were covered with thick black cloth and kept near the exposed mixtures.

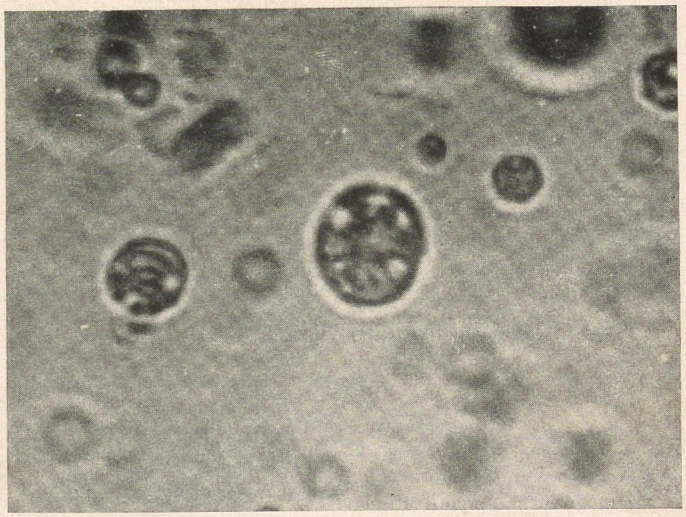


Fig. 2. Micro-photograph of the active units prepared photochemically showing the internal structures of the units (Photographed at 1000 magnification)

A turbidity was observed in the mixture exposed to light after an exposure of 20 hours which however disappeared giving a colourless solution. No such change was observed in the mixture kept in dark. It remained clear and yellow in colour as was kept in the beginning. The mixture exposed to light was observed to develop a pink colour after an exposure of 300 hours which started becoming turbid on further exposure. After an exposure of 450 hours suspended particles were observed which settled at the bottom of the flask as yellow mass leaving a clear yellow coloured solution. The number of these particles increased for a few days. The mixture was examined at this stage under oil immersion microscope at 1000 magnification.

0.02 ml. of the well shaken sample of this mixture exposed to light, was taken out from the flask with a sterilised micropipette under aseptic conditions and a

slide of it was mounted and studied under the microscope. Many needle type crystals varying in size were observed in all of the microscopic views. Few clusters of these crystals were also observed. However, a few round objects were observed which had a glowing centre with a dark circular outline when viewed from 20 X

Table 1

The first counting after 450 hours

No. of microscopic views at 2000 magnification	No. of circular objects
1	2
2	3
3	0
4	0
5	2
6	6
7	1
8	0
9	0
10	2
11	2
12	2
13	6
14	3
15	0

Average count 1.80

Table 2

Second counting of the globules

No. of microscopic views at 2000 magnification	No. of circular objects
1	10
2	6
3	13
4	3
5	12
6	10
7	11
8	1
9	12
10	6
11	7
12	7
13	13
14	6
15	13

Average count 8.66

eye-piece (2000 magnification). These circular objects differed in size. To the periphery of a few such objects few smaller circular objects were also observed to be attached and these appeared like budding of yeast cells.

Table 3
The third count of the globules after 10 times dilution

No. of microscopic views at 2000 magnification	No. of round objects
1	13
2	6
3	12
4	3
5	11
6	6
7	10
8	12
9	2
10	6
11	13
12	6
13	10
14	0
15	11

Average count 8.06
Average count in terms of previous reading 80.6

Table 4
Fourth counting of the globules

No. of microscopic views at 2000 magnification	No. of round objects
1	6
2	16
3	19
4	13
5	10
6	3
7	23
8	12
9	20
10	12
11	2
12	3
13	8
14	6
15	18

Average count 11.7
Average count in terms of previous readings 117

These circular objects were counted and the number recorded.

After five days another 0.02 ml. of the well shaken mixture was mounted and viewed under the microscope. It was observed that the number of the round objects as well as the needle type crystals both have increased. Many such circular objects could be seen attached along the needle type crystals. The number of circular objects were again counted in different microscopic views and were recorded.

After five days the same mixture was examined under the microscope and it was observed that the number of the circular objects had increased much and could not be counted as such. 1 ml. of the thoroughly shaken mixture was taken out aseptically and was diluted to 10 ml. in sterilised distilled water. 0.02 ml. of this mixture was mounted and viewed under the microscope. It was observed that two to three round objects were attached to each other in clusters.

After a lapse of a month again these round objects were observed in the microscopic views and their number was counted after diluting to ten times.

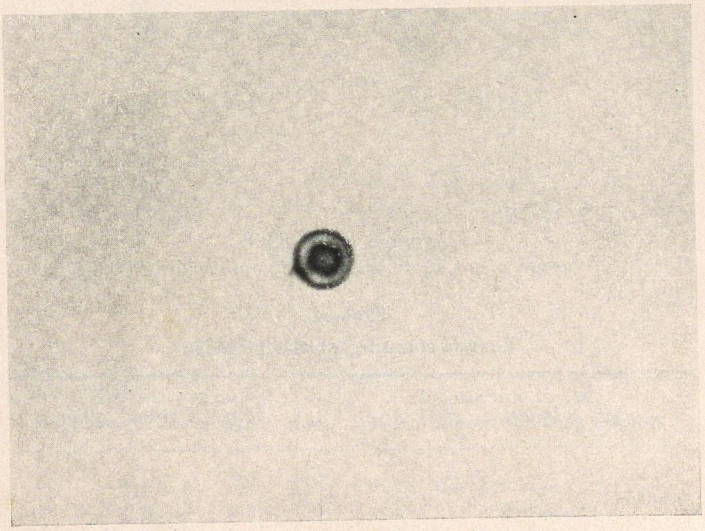


Fig. 3. Micro-photograph of one active unit prepared with thermally prepared peptide after 15 days of exposure of 8 hours a day showing a small to a bud (Photographed at 1000 magnification)

3. Formation of active units in aqueous solutions of amino acids on long exposures.

Sterilised aqueous solutions of amino acids when exposed to light in presence of an organic source of energy and certain metallic ions as catalysts form peptides. These peptides increase in length with increasing period of exposure ultimately resulting in gel forming products. These products separate out in the form of small globules which form a semipermeable membrane around them. The membrane allows selective passage to the molecules present in the environmental medium. The molecules which go into the globules, if appropriate source of energy is available,

undergo a series of reactions by a computer like activity of the globular material and the net result is that more globular matter is synthesised and the globule increases in size. Finally it gives out a bud which grows bigger and may either separate out as an independant unit or may remain attached to the parent unit and bud again.

Such objects have been observed in old glycine and tyrosine solutions containing colloidal molybdenum oxide. These solutions had been kept for exposure for 1000 hours and then stored under aseptic conditions for two years.

Two types of particles were observed in these mixtures besides "dead" type matter. One of them was a globular type of particle which was coloured. The inside of the particle was coloured and it had a boundary. The colour was not the same in the case of glycine and tyrosine. In the former it had a bluish colour and in the latter the shade was greenish. These particles were observed both singly and in bunches. A bunch of 30 globular particles was also observed. It was also noticed that these particles moved towards each other slowly.

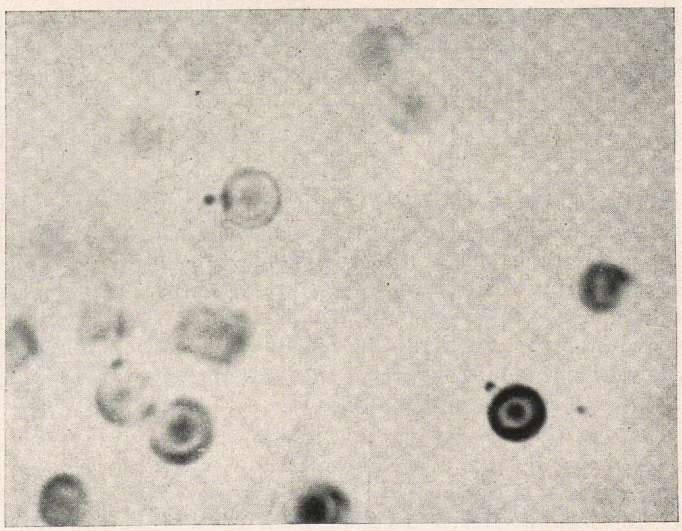


Fig. 4. Micro-photograph of the active unit prepared with thermally prepared peptides showing two units with small buds (Photographed at 1000 magnification)

The shape of the particles was circular and the boundary wall had a different colour. Sometimes the boundary wall of the particle appeared to be composed of several smaller particles joined together to form a closed chain. Inside this boundary a few small black specks could be seen.

The second type of particles contained a couple of small black particles inside them and these inner particles were constantly moving. Their movement appeared to be synchronising with the change of structural shape. The movement of black specks inside and the distortion of the structure appeared to be an attemption the

part of the globule for budding. However no actual budding was observed in this case.

In one case a distortion was observed in which the inner smaller particles reached practically the two ends of the structure changing the globular structure to more or less a dumb bell shape. The movement of the black specks inside this structure do not appear as Brownian motion. It appears to be much more deliberate rather than perfectly random. In the tyrosine solution a few particles similar to the diagram given in the text-books for cell division were observed.

Tyrosine solutions containing colloidal ferric oxide

The mixture contained particles of different sizes. The smaller particles were spherical but the bigger ones had a tendency to elongate and assume elliptical shape. All these particles had movement and the smaller ones had faster motion though the nature of the movement was similar. It appeared to be partly rotatory movement and partly distortion in shape. In these particles some black specks inside were distinctly visible. These particles had a boundary line which appeared blackish. The observations were made using a cavity slide.

When the mixture was examined on a flat slide structures resembling sugar crystals were observed. All the objects had a light bluish colour.

Tyrosine solution containing vanadium oxide colloid as catalyst

This mixture on exposure for 1000 hours in light and then standing for 2 years showed objects of round, oval, rectangular and spherical shapes with black specks and tendency of budding. These had a bluish shade inside their boundary wall. The particles showed movement and distortion in shape. The black specks inside the units showed a rapid movement.

Together with these a few irregular rod like objects were observed with bluish brown inside and black boundary line. These showed movement which was sometimes rotatory and sometimes wagging.

4. Preparation of active units in mixtures containing citric acid, biological nutrient minerals, buffer of pH 6.0, colloidal oxides of molybdenum, iron and water.

Several mixtures of the following compositions were prepared:

Citric acid	0.04 gm. in	10 ml. water
Molybdenic acid	0.01 gm. in	10 ml. water
Colloidal ferric chloride		10 ml.
Mineral nutrient		10 ml.
Potassium dihydrogen phosphate and sodium hydroxide buffer pH 6.0		10 ml.
Total volume		50 ml.

0.40 gm. of citric acid was weighed and dissolved in 100 ml. of glass distilled water. Colloidal molybdenum oxide was prepared by dialysing a freshly precipitated sample of molybdenum oxide. Ferric oxide colloid was prepared by adding a concentrated solution of ferric chloride drop by drop in boiling water till a deep red brown colour was obtained.

Mineral nutrient solution was prepared by dissolving 0.02 gm. potassium sulphate, 0.02 gm. sodium chloride, 0.02 gm. calcium acetate, 0.02 gm. magnesium sulphate and 0.002 gm. zinc sulphate in 100 ml. glass distilled water and finally adding 0.02 gm. potassium dihydrogen phosphate.

A buffer solution of pH 6.0 was prepared by mixing 50 ml. of 0.2 M potassium dihydrogen phosphate to 5.7 ml. of N/5 sodium hydroxide and raising the volume to 100 ml. · 10 ml. of this buffer solution was used in each mixture.

These flasks were cotton plugged and the mixtures were sterilised in autoclave at 15 lbs pressure for 30 minutes. The flasks were sealed with polythene sheet and transparent cello-adhesive tape. Four of these mixtures were exposed to sunlight as such and another four were covered with black cotton cloth and kept near the exposed mixtures.

No turbidity was observed in the mixtures exposed to sunlight before 8 hours of exposure. When this mixture exposed to light for eight hours was kept in dark a whitish turbidity appeared in it. Similar mixture kept in dark from the beginning did not indicate such change.

Table 5

Direct counting of the active units produced after 8 hours exposure to sunlight and then keeping the mixture overnight (without dilution)

61	77	47	66	63	43	80	89	89	85
42	45	69	49	53	38	50	49	71	84
39	38	57	34	48	38	22	33	80	78
74	65	60	71	35	50	28	40	85	42
55	36	44	76	63	80	47	48	92	39
23	36	90	54	93	82	74	57	98	48
72	62	46	44	82	85	80	79	95	29
48	16	52	49	38	38	89	80	97	33
66	64	49	56	49	43	97	34	89	49
88	38	35	40	33	47	99	50	87	35

Total = 5874.
Mathematical average = 58.74.
(Mixture exposed to sunlight 8 hours daily.)

Table 6

Direct counting of the active units produced after 3 days exposure to sunlight (8 hours daily) and then keeping the mixture overnight (the mixture diluted ten times for counting)

12	11	19	15	08	48	19	56	22	15
17	12	14	22	11	40	55	35	53	43
18	18	17	15	05	57	39	30	24	18
19	13	17	24	08	18	61	33	10	15
24	20	15	16	09	39	26	25	18	11
13	11	29	12	13	46	23	23	24	40
44	16	11	21	11	53	35	21	19	18
15	15	20	15	13	33	33	18	22	11
11	10	18	19	10	17	70	19	30	17
22	03	21	13	07	27	24	17	15	24

Total = 2258.
Mathematical average = 22.58.
Average number of units present per view in terms of previous reading = 225.8.

Table 7

Direct counting of the active units produced after 5 days exposure to sunlight (8 hours daily) and then keeping the mixture overnight (the mixture diluted ten times for counting)

41	38	56	82	35	23	48	27	22	45
38	28	36	56	48	08	36	22	17	29
32	25	56	71	23	21	61	36	30	28
35	21	70	37	30	32	38	35	33	21
24	27	52	39	38	31	21	41	23	28
39	16	35	41	61	72	22	33	21	30
78	13	70	35	39	47	42	47	27	35
41	43	47	28	52	39	24	32	58	20
35	28	35	30	32	35	26	26	68	29
46	21	40	32	49	24	37	25	32	33

Total = 3664.
Mathematical average = 36.64.
Average number of units present per view in terms of previous reading = 366.4.
The mixtures kept in dark did not show the formation of these units.

The turbidity was examined under oil immersion microscope. Small globules single and in groups of two and four were observed. The turbidity became denser and denser on exposure to sunlight and the clusters grew big in size. Huge colonies of 50 or more units were observed in few days.

Resemblance with objects of organised elements observed in carbonaceous chondrites

Objects resembling the morphological forms observed in the carbonaceous chondrites have been observed in all these mixtures in which the active units are prepared when the mixture is kept under exposure for a few months. The photographs of such structures found in mixtures when the active units were prepared with thermal peptides were shown to Dr. M. H. Briggs who published a catalog of these objects. In a private communication he wrote "The structures were most interesting and many of them certainly show a close morphological resemblance to some of our meteorite microstructures".[1] The chemical composition of these objects certainly differ greatly.

Address:
Prof. Dr. Krishna Bahadur, Dr. H. C. Verma, Dr. R. B. Srivastra, Dr. K. M. L. Agrawal, Dr. R. S. Pandey, Dr. Indra Saxena, Dr. A. N. Malviya, Dr. Vinod Kuma, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad/India. Dr. O. N. Perti and Dr. H. D. Pathak, Chemistry Department, Govt. Degree College, Nainital/India

[1]) Private Communication.

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय मोलिब्डिनम तथा आयरन आँक्साइडों से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर कार्बनिक अम्लों का प्रभाव

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा कृष्ण मुरारी लाल अग्रवाल,

रसायन विभाग, मोती लाल नेहरू रीजनल इञ्जीनियरिंग कालेज, इलाहाबाद

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका, विज्ञान परिषद् प्रयाग

१९६४, भाग ७, संख्या २-३, पृ० ५१-५६ से पुनर्मुद्रित

Influence of organic acids on photochemical fixation of nitrog in mixtures containing colloidal molybdenum and iron oxides as catalyst.

By

K. Bahadur and K. M. L. Agrawal,

Moti Lal Nehru Regional Engineering College, Allahabad.

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1964, Vol. 7, No. 2-3, Pages 51-56

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका
१९६४, ७, ५१-५६

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1964, 7, 51-56

उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय मोलिब्डिनम तथा आयरन ऑक्साइडों से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर कार्बनिक अम्लों का प्रभाव

कृष्ण बहादुर तथा कृष्ण मुरारी लाल अग्रवाल,
रसायन विभाग, मोती लाल नेहरू रीजनल इञ्जीनियरिंग कालेज, इलाहाबाद

(प्राप्त—जुलाई २३, १९६४)

सारांश

उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय मोलिब्डिनम और फेरिक आक्साइड तथा कार्बन स्रोत के रूप में टार्टरिक, साइट्रिक, मेलिक, मेलोनिक, सक्सिनिक, आक्सैलिक और सेलीसिलिक अम्लों से युक्त, विसंक्रमित जलीय मिश्रण, सूर्य के प्रकाश में ४०० घंटे तक रक्खे गये। समान प्रकार के मिश्रणों को, चार बार तह किये हुए सूती काले कपड़े से लपेट कर, प्रकाश में रक्खे हुए मिश्रणों के पास रक्खा गया। कार्बन स्रोत के रूप में प्रयुक्त कार्बनिक अम्लों ने इन मिश्रणों में नाइट्रोजन के स्थिरीकरण तथा एमीनोअम्लों के प्रकाश-संश्लेषण पर निश्चित प्रभाव डाला। इन मिश्रणों में वायुमण्डलीय नाइट्रोजन के स्थिरीकरण का घटता हुआ क्रम निम्न प्रकार देखा गया:—

टार्टरिक अम्ल > मेलिक अम्ल > साइट्रिक अम्ल > मेलोनिक अम्ल > सक्सिनिक अम्ल।

कार्बन स्रोत के रूप में आक्सैलिक अम्ल युक्त मिश्रणों ने नाइट्रोजन की हानि प्रदर्शित की तथा सेलीसिलिक अम्ल युक्त मिश्रणों से सांख्यिकीय रूप से उपेक्ष्य फल प्राप्त हुए।

Abstract

Influence of organic acids on photochemical fixation of nitrogen in mixtures containing colloidal molybdenum and iron oxides as catalyst. *By* K. Bahadur and K. M. L. Agrawal, Moti Lal Regional Engineering College, Allahabad.

Sterilised aqueous mixtures containing a mixture of colloidal molybdenum and ferric oxides as catalyst and tartaric, citric, malic, malonic, succinic, oxalic and salicylic acids as the source of carbon were exposed to sun-light for a period of 400 hours. Similar mixtures were covered with four-fold thick black cloth and were kept near the exposed mixtures. Organic acids employed as the source of carbon in these mixtures exerted positive influence in the fixation of atmospheric nitrogen as well as in the photosynthesis of amino acids in these mixtures. Fixation of atmospheric nitrogen in these mixtures was observed in the following decreasing order:

Tartaric acid > malic acid > citric acid > malonic acid > succinic acid.

However, mixtures containing oxalic acid as the source of carbon indicated a loss of nitrogen, and the mixtures containing salicylic acid showed statistically insignificant results.

गत तीस वर्षों से, धर तथा उनके सहयोगी मिट्टी में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण की समस्या पर कार्य कर रहे हैं। उन्होंने प्रदर्शित किया है कि अनेक कार्बनिक पदार्थ, जैसे, हरी खाद, गोबर की खाद, भूसा तथा लकड़ी का बुरादा आदि, सूर्य के प्रकाश के प्रभाव में मिट्टी में धीरे-धीरे ऑक्सीकृत होते हैं। उन्होंने यह भी प्रदर्शित किया है कि जब विसंक्रमित दशा में शर्करा, स्टार्च, गेहूँ का भूसा तथा गोबर आदि से युक्त, नम मिट्टी को सूर्य के प्रकाश में रखा जाता है, तो नाइट्रोजन का स्थिरीकरण होता है[१,२,३]। यह भी देखा गया है कि नाइट्रोजन का स्थिरीकरण, आक्सीकृत होने वाले कार्बनिक यौगिक की प्रकृति के साथ-साथ, बहुत तेजी से परिवर्तित होता रहता है तथा नाइट्रोजन का स्थिरीकरण, मिट्टी के कार्बन/नाइट्रोजन (C/N) अनुपात को समंजित करके नियन्त्रित किया जा सकता है[४,५,६]।

कार्बनिक कार्बन, अकार्बनिक उत्प्रेरक तथा पानी से युक्त विसंक्रमित मिश्रणों में, एमीनो अम्लों का प्रकाश-संश्लेषण किया जा चुका है।[७] एमीनो अम्लों के इस प्रकार बनने में आवश्यक नाइट्रोजन, वाय की आणुक नाइट्रोजन से प्राप्त होती है। कार्बन स्रोत के रूप में शर्करायें तथा कार्बनिक अम्ल, अकार्बनिक उत्प्रेरक तथा नाइट्रोजन के एक स्थिर स्रोत से युक्त जलीय मिश्रणों में एमीनो अम्लों के संश्लेषण का, बहादुर तथा श्रीवास्तव ने विशद अध्ययन किया है[८]। उन्होंने प्रेक्षण किया है कि प्रयुक्त कार्बन स्रोत के साथ-साथ, ऐसे मिश्रणों में प्रकाश संश्लेषित एमीनो अम्लों की प्रकृति, सान्द्रता तथा संख्या में परिवर्तन होता रहता है[९]। इस प्रकार नाइट्रोजन के प्रकाश रासायनिक संश्लेषण पर कार्बनिक अम्लों के प्रभाव का अध्ययन रोचक है। स्थिरीकरण के इस प्रक्रम में, कलिलीय मोलिब्डिनम तथा फेरिक ऑक्साइड का मिश्रण, एक अच्छे उत्प्रेरक के रूप में कार्य करने वाला पाया गया है[१०]।

प्रयोगात्मक

सिगकॉल के १५० मि० लि० शंक्वाकार फ्लास्कों में नौ मिश्रण, जिनमें प्रत्येक का निम्न संघटन था, बनाये गये :—

(क) ०·८० ग्राम टार्टरिक अम्ल १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम आक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक आक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

(ख) ०·८० ग्राम साइट्रिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक ऑक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

(ग) ०·८० ग्राम मेलिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक ऑक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

(घ) ०·८० ग्राम मेलोनिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक ऑक्साइड तथा ८० मिलि० आसुत जल।

(ङ) ०·८० ग्राम सक्सिनिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक ऑक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

(च) ०·८० ग्राम आक्सैलिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि० लि० कलिलीय फेरिक ऑक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

(छ) ०·८० ग्राम सेलीसिलिक अम्ल, १० मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड, १० मि०लि० कलिलीय फेरिक अक्साइड तथा ८० मि० लि० आसुत जल।

इन मिश्रणों से युक्त फ्लास्कों में शल्य-रुई की डाट लगाई गई। एक ऑटोक्लेव में मिश्रणों को १५ पौंड दाब पर ३० मिनट तक विसंक्रमित किया गया। ठंडे होने पर फ्लास्कों के मुहँ को पॉलीथीन-कागज तथा चेपदार फीता से बन्द कर दिया गया।

क, ख, ग, घ, ङ, च तथा छ सेटों के प्रत्येक में से चार मिश्रणों को प्रकाश में ऐसे ही रख दिया गया। चार और मिश्रणों को, चार बार तह किये हुए काले सूती कपड़े से लपेट कर, प्रकाश में रक्खे हुए पहले मिश्रणों के पास रख दिया गया। प्रत्येक सेट का बचा हुआ नौवाँ मिश्रण, नियंत्रण निर्धारण के लिये प्रयोग में लाया गया।

समय-समय पर, मिश्रणों के पास रक्खे गये पानी के ताप के परिवर्तन को भी नोट किया गया। सूर्य के प्रकाश में ४०० घंटे तक रखने के उपरान्त मिश्रणों का विश्लेषण किया गया। मिश्रणों में, नाइट्रोजन का परिमापन, उप-सूक्ष्म केल्डाल-विधि द्वारा किया गया ([११], [१२], [१३], [१४], [१५], [१६], [१७])। क्रोमेटोग्राफी विधि का प्रयोग करते हुए, मिश्रणों में प्रकाश-संश्लेषित एमीनो अम्लों की पहचान की गई ([१८], [१९], [२०]) और फलों की गणना सांख्यिकीय विधि से की गई।

इन मिश्रणों के विश्लेषण से प्राप्त फलों को नीचे संक्षेप में दिया गया है।

कार्बन स्रोत के रूप में विभिन्न कार्बनिक अम्लों से युक्त, प्रकाश में रक्खे गये तथा अँधेरे में रक्खे गये समान मिश्रणों में, नाइट्रोजन का स्थिरीकरण तथा एमीनो अम्लों का प्रकाश-संश्लेषण

क्रम संख्या	प्रयुक्त अम्ल	मिश्रण के १०० मि० ग्राम में स्थिरीकृत नाइट्रोजन की मात्रा, (मि० ग्राम)	प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों में संश्लेषित एमीनो अम्ल	अँधेरे में रक्खे गये मिश्रणों में संश्लेषित एमीनो अम्ल	फलों की सांख्यिकीय सार्थकता
१.	टार्टरिक अम्ल	(+)०·४८२४	ऐस्पार्टिक अम्ल एलानीन	एस्पार्टिक अम्ल एलानीन (लेशमात्र)	सार्थक
२.	साइट्रिक अम्ल	(+)०·३७६४	सेरीन	एलानीन (लेशमात्र) सिरीन (लेशमात्र)	सार्थक
३.	मेलिक अम्ल	(+)०·३९३७	ग्लूटैमिक अम्ल (लेशमात्र) ऐस्पार्टिक अम्ल	एस्पार्टिक अम्ल (लेशमात्र)	सार्थक
४.	मेलोनिक अम्ल	(+)०·१२९०	एलानीन	एलानीन (लेशमात्र)	सार्थक
५.	सक्सिनिक अम्ल	(+)०·०८९१	ऐस्पार्टिक अम्ल एलानीन	एस्पार्टिक अम्ल	सार्थक
६.	आक्सैलिक अम्ल	(−)०·१२५०	अनुपस्थित	अनुपस्थित	सार्थक
७.	सेलीसिलिक अम्ल	निरर्थक	अनुपस्थित	अनुपस्थित	निरर्थक (उपेक्ष्य)

टिप्पणी—(+) चिह्न नाइट्रोजन के स्थिरीकरण को सूचित करता है :
(−) चिह्न नाइट्रोजन की हानि को सूचित करता है :

विवेचना

कार्बन स्रोत के रूप में टार्टरिक अम्ल तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय मोलिब्डिनम, फेरिक ऑक्साइड से युक्त मिश्रण के १०० मि० लि० में ०·४८२८ मि० ग्राम नाइट्रोजन प्रकाश-रासायनिक रूप से स्थिरीकृत हुई। इस मिश्रण में ऐस्पार्टिक अम्ल तथा एलानीन एमीन अम्लों का प्रकाश-संश्लेषण भी देखा गया। अँधेरे में रक्खे गये समान मिश्रणों में भी लेशमात्र ऐस्पार्टिक अम्ल तथा एलानीन का संश्लेषण हुआ। साइट्रिक अम्ल युक्त समान मिश्रणों में, समान दशाओं में ०·३७६४ मि० ग्राम नाइट्रोजन का स्थिरीकरण हुआ। प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों में सिरीन के अनुरूपी मान वाली एक स्पष्ट वलय देखी गई जबकि अँधेरे में रक्खे गये मिश्रणों में एलानीन तथा सिरीन की रंचमात्रायें ही पाई गईं।

जब ऊपर के मिश्रणों में साइट्रिक अम्ल के स्थान पर मेलिक अम्ल प्रयोग किया गया तो नाइट्रोजन का स्थिरीकरण ०·३६३७ मि० ग्राम तक कम हो गया। ग्लूटैमिक तथा ऐस्पार्टिक अम्ल, प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों में संश्लेषित हुए जबकि अंधकार में रक्खे गये मिश्रणों में ऐस्पार्टिक अम्ल की रंचमात्रा ही बनी। मेलोनिक अम्ल युक्त मिश्रणों में ०·१२६० मि० ग्राम नाइट्रोजन स्थिरीकृत हुई और एलानीन का प्रकाश-संश्लेषण हुआ। जब ऊपर के मिश्रण में सक्सिनिक अम्ल का प्रयोग हुआ तो ऐस्पार्टिक अम्ल तथा एलानीन बनने के साथ-साथ, ०·०८६१ मि० ग्राम नाइट्रोजन स्थिरीकृत हुई। कार्बन स्रोत के रूप में आक्सैलिक अम्ल ने ०·१२५० मि० ग्राम नाइट्रोजन की हानि सूचित की। कार्बन स्रोत के रूप में सेलीसिलिक अम्ल युक्त मिश्रण में, नाइट्रोजन का स्थिरीकरण, सांख्यिकीय रूप से निरर्थक पाया गया। आक्सैलिक तथा सेलीसिलिक अम्लों से युक्त मिश्रणों को प्रकाश में रखने पर एमीनो अम्ल संश्लेषित नहीं हुए।

कार्बन स्रोत के रूप में संयुक्त अन्य अम्लों की अपेक्षा, नाइट्रोजन स्थीकरण के लिए टार्टरिक, साइट्रिक तथा मेलिक अम्लों से युक्त मिश्रणों से अच्छे फल प्राप्त हुए। नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण में, हाइड्राक्सी समूह की उपस्थिति ने निश्चित प्रभाव प्रदर्शित किया। यह अवलोकन भी बहुत ही रोचक था कि इन अम्लों (हाइड्राक्सी) द्वारा नाइट्रोजन के स्थिरीकरण का घटता हुआ क्रम इन अम्लों की दहन-ऊष्मा के बढ़ते हुए क्रम के समानुपाती था। इससे प्रदर्शित होता है कि कठिनता से ऑक्सीकृत होने वाले अम्लों की अपेक्षा, सरलता से ऑक्सीकृत होने वाले अम्ल, अधिक वायुमण्डलीय नाइट्रोजन स्थिर कर सकते हैं। इस प्रकार अध्ययन किये गये तीन अम्लों में, सबसे कम दहन-ऊष्मा (२७५·१ कि० कैलोरी) वाले अम्ल, टार्टरिक अम्ल ने सबसे अधिक, ०·४८२८ मि० ग्राम, नाइट्रोजन स्थिर की।

क्रम संख्या	अम्ल का नाम	दहन-ऊष्मा, कि० कैलोरी में
१	टार्टरिक अम्ल	२७५·१
२	मेलिक अम्ल	३२०·१
३	साइट्रिक अम्ल	४७४·५
४	मेलोनिक अम्ल	२०७·२
५	सक्सिनिक अम्ल	३७५·१
६	आक्सैलिक अम्ल	६०·२
७	सेलीसिलिक अम्ल	७२३·१

मेलिक अम्ल जिसकी दहन-ऊष्मा ३२०·१ कि० कैलोरी है और जिसने १०० मि० लि० मिश्रण में ०·३९३७ ग्राम नाइट्रोजन का स्थिरीकरण किया, दूसरी संख्या पर था। अध्ययन किये गये हाइड्रॉक्सी अम्लों में साइट्रिक अम्ल जिसकी दहन-ऊष्मा ४७५·५ कि० कैलोरी है, से युक्त मिश्रण ने सबसे कम, ०·३७६४ मि० ग्राम, नाइट्रोजन का स्थिरीकरण प्रदर्शित किया।

यदि द्वि-भास्मिक अम्लों—सक्सिनिक, मेलोनिक तथा आक्सैलिक अम्लों के द्वारा स्थिरीकरण पर विचार किया जाय तो यह देखा जावेगा कि स्थिरीकरण के लिये इन अम्लों में सबसे अधिक प्रभावशाली अम्ल मेलोनिक अम्ल है। सक्सिनिक अम्ल जिसकी दहन-ऊष्मा मेलोनिक अम्ल से अधिक है, उसने ०·०८९१ मि०ग्राम नाइट्रोजन स्थिरीकृत की जबकि मेलोनिक अम्ल ने समान मिश्रण में ०·१२९० मि० ग्राम नाइट्रोजन स्थिर की। कथमपि, आक्सैलिक अम्ल जिसकी दहन-ऊष्मा अध्ययन किये गये तीनों अम्लों में, सबसे कम, ६०·२ कि० कैलोरी है, उसने ०·१२५० मि०ग्राम नाइट्रोजन की हानि प्रदर्शित की। आक्सैलिक अम्ल के इस नियम-विरुद्ध आचरण का कारण यह था कि उसके ऑक्सीकरण से प्राप्त उत्पादों (कार्बन मोनॉक्साइड, डाइआक्साइड तथा पानी) में कार्बनिक कार्बन श्रृंखला नहीं थी जो स्थिरीकृत नाइट्रोजन से संयोग करके स्थायी नाट्रोजनीय यौगिक बना सकती। इस विचार की पुष्टि इस प्रेक्षण से भी होती है कि कार्बन स्रोत के रूप में आक्सैलिक अम्ल युक्त मिश्रण में कोई एमीनो अम्ल संश्लेषित नहीं हुआ जबकि अन्य अम्लों से युक्त मिश्रणों ने एमीनो अम्लों का निश्चित संश्लेषण प्रदर्शित किया।

सेलीसिलिक अम्ल युक्त मिश्रण ने नाइट्रोजन का उपेक्ष्य स्थिरीकरण प्रदर्शित किया। इसकी दहन-ऊष्मा तुलनात्मक दृष्टि से ७२३·१ कि० कैलोरी अधिक है और सम्भवतः ऑक्सीकृत होने के लिये तथा नाइट्रोजन स्थिरीकरण करने के लिये इसे अधिक समय तक प्रकाश में रखने की आवश्यकता है। इस मिश्रण में एमीनो अम्ल भी अनुपस्थित पाये गये।

निर्देश

१. धर, एन० आर०। अध्यक्षपदीय भाषण, **नेश० एके० साइं० इण्डिया**, १९ दिसम्बर, १९३५ तथा १५ जनवरी, १९३७।

२. राममूर्ती, बी०। **प्रोसी०, नेश० इंस्टीट्यट साइं०**, (इण्डिया) १९३८ ४, ८३–८६।

३. केर, एच० डब्ल्यू०। **प्रोसी० सेक० एन० कोन्फेन्स, क्वीसंलैण्ड सोसाइटी ऑफ सुगरकेन टेनोलोजिस्ट्स**, १९३२।

४. धर, एन० आर०। **प्रोसी० एके० साइं०** (इण्डिया), १९३४, ४, १७५।

५. हालम, एम० तथा बर्थेलोम्यू, डब्ल्यू० बी०। **सॉइल साइं० सोसा० अमे० प्रोसी०**, १९३५, १७, ३६५–३६८।

६. ब्राडबेण्ट, एफ० ई० तथा बर्थेलोम्यू, डब्ल्यू० बी०। **वही**, १९४९ १३, २७१–२७४।

७. बहादुर, के०, रंगनायकी, एस० तथा सान्ता-मेरिया, एल०। **नेचर**, १९५८ १८२, १६६८।

८. बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर०बी० । **जुर्न० आब्साईकुमू, यू० एस० एस० आर०** १९६१, XXXI (xci 11) ३१७–३२० ।

९. बहादुर, के० तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **नेश० एके० साइन्स, इण्डिया,** १९६२, ३२, ८३–८७ ।

१०. बहादुर, के० तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **जर्न० साइंटि० इण्ड० रिसर्च इण्डिया,** १९६२ २१B, ७, ३३६–३३७ ।

११. केल्डाल, जे० । **जर्न० एना० केमि०,** १९८८, २८, १८८ ।

१२. गर्निंग, जे० डब्ल्यू० । **जर्न० एना० केमि०** १८८९, २८, १८८ ।

१३. आर्नाल्ड, सी० तथा बेडेमेयर, के० । **जर्न० एना० केमि०** १८९२ ३१, ५२५ ।

१४. आर्नाल्ड, सी० । **केम० जेण्टर,** १८९२ १८८६, ३३७ ।

१५. कोल्थाफ, आई० एम० तथा स्टैंगर, वी०ए० । **प्रोसीजर** ऑफ **वोल्यूमेट्रिक एनालिसिस,** १९४७ १७३ पृष्ठ ।

१६. मुअर, एच० सी० । **इण्ड० इंजी० केमि०,** १९२० १२, ६६९ ।

१७. प्रिंस, ए० एल० । **जर्न० एसो० ऑफीशल एग्री० केमि०,** १९२५ ४१० ।

१८. गिरी, के० वी० तथा राव, एन० ए० एन० । **जर्न० इण्डि० इन्स्टी० साइ०,** १९५२, ३४, ९५ ।

१९. गिरि, के०वी० तथा प्रसाद, ए०एल०एन० । **नेचर,** १९५१, १५८, ७८६ ।

२०. कान्सडन, आर०, गार्डन, ए० एच० तथा मार्टिन, ए० जे० सी० । **बायोकेमि० जर्न०,** १९४४ ३८, २२४ ।

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!

Sonderabdruck aus dem
Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 117
VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.
Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1063
1964

Nachdruck verboten.

[From the Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad, India]

Optimum growth is synonym of maximum hydration of the protoplasmic material

Krishna Bahadur and **Harish Chandra Verma**

Mineral nutrients control the growth and physiological properties of microorganisms as well as other living matter. We have been investigating the role of mineral nutrients on the comparative assimilation of other nutrients by the yeast cells and have observed that a specific concentration of Ca^{++}, Mg^{++}, K^{+}, Zn^{++} or $PO_4^{'''}$ in the culture media is essential for the optimum growth of yeast cells. The concentration of one of these mineral nutrients will not only influence its own assimilation but also the assimilation of other minerals by the organism. Another interesting observation is that at the optimum concentration of the mineral concerned for the growth of the yeast cells, least quantity of all the minerals including nitrogen and carbon are assimilated per gram of cells produced. Isolated observations on this topic considering individual minerals have been published (1—7) and here an attempt has been made to show as how the statement described above is of a general type and is true for the ions mentioned above.

Experimental

The culture media containing carbon and nitrogen sources and mineral nutrients essential for the normal growth and physiological activities of yeast cells were prepared.

A normal culture medium usually contained the following nutrients: calcium carbonate 0.2 gm., magnesium carbonate 0.2 gm., sodium chloride 0.2 gm., disodium hydrogen phosphate 0.2 gm., potassium sulphate 0.2 gm., ammonium sulphate 2.5 gms., zinc sulphate 0.05 gm. and sucrose 20.0 gms. Whenever the concentration of one particular nutrient was to be changed the quantities of the remaining nutrients were as described here and the varying amounts of the nutrient in consideration as mentioned in the tables were added. All the chemicals were of A. R. quality and the purity of these salts was examined in the laboratory before use.

These minerals in quantities as mentioned above were taken in each flask: 100 ml of distilled water from all glass distilling apparatus were added and the mixture was digested with dilute hydrochloric acid. After digestion the total volume of each culture medium was made 400 ml. and the pH was adjusted to 4.5.

These culture media were sterilised at 15 lbs. pressure in an autoclave for 30 minutes. On cooling, the culture media were seeded with a trace of fresh sample of *Pichia indica* (8) with the help of a platinum wire.

Determination of yeast weight

The yeast cells were separated from the culture solution by filtration through previously dried and weighed filter paper. These were washed three or four times with distilled water and then dried in an air oven at 70—80° C, cooled in a desiccator and weighed.

Culture solutions

After separating the yeast cells, the culture medium together with the washing of the yeast cells were taken in 500 ml. volumetric flask and the total volume was made up to 500 ml. From this solution the various estimations were done.

The quantitative estimations of nitrogen (9, 10, 11), sucrose (12), PO_4''' (13), Ca^{++} (14) and Mg^{++} (15) were carried out by the usual standard methods.

The results obtained by the various estimations of culture media are tabulated below:

Table 1

Study of the influence of calcium concentration (1)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by the yeast cells at different concentations of Ca^{++} in the culture media.

Period of fermentation = 85 days.

Temperature = 10—30° C.

Amount of calcium carbonate present in the culture medium (gm)	Yeast grown (gm)	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed (gm)	Amount of nitrogen utilised (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed (mgm)
1.0	2.3524	11.76	8.5019	88.0	in traces	1.80	16.10
2.0	3.1248	15.62	6.4004	80.0	0.19	1.50	14.60
3.0	3.0235	15.11	6.6148	159.0	1.38	3.30	14.10

Table 2

Study of the influence of Magnesium concentration (2)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by the yeast cells at different concentrations of Mg^{++} in the culture media.

Period of fermentation = 55 days.

Temperature = 20—33° C.

Amount of magnesium carbonate present in the culture medium (gm)	Yeast grown (gm)	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed (gm)	Amount of nitrogen utilised (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed (mgm)
1.0	1.8336	12.75	7.845	233.9	6.1	2.5	14.17
2.0	2.0976	16.78	5.959	236.3	3.0	3.67	12.70
3.0	2.3290	18.36	5.446	221.7	1.76	5.49	10.26

Table 3

Study of the influence of potassium concentration (3)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by yeast cells at different concentration of K^+ in the culture media.

Period of fermentation = 52 days.

Temperature = 18—32° C.

Amount of potassium sulphate present in the culture medium (gm)	Yeast grown (gm)	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed (gm)	Amount of nitrogen utilized (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed (mgm)
1.0	1.4470	11.95	8.36	356.4	2.55	4.90	44.92
2.0	1.5480	13.86	7.68	335.5	6.07	4.13	44.64
3.0	1.8120	14.56	7.11	286.6	0.38	4.19	25.38
5.0	1.8084	13.62	7.33	289.1	1.88	4.31	30.51

Table 4

Study of the influence of Zinc concentration (4)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' and consumption of carbon and nitrogen nutrients by yeast cells at different concentration of Zn^{++} in the culture media.

Period of fermentation = 85 days.

Temperature = 18—35° C.

Amount of zinc sulphate present in the culture medium (gm)	Yeast grown (gm)	% yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed (gm)	Amount of nitrogen utilized (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed (mgm)
Nil	1.7138	9.21	10.21	300.9	5.42	4.43	7.40
0.025	1.7420	10.55	9.47	288.3	0.51	2.06	3.21
0.10	1.4560	9.31	10.73	261.6	0.61	8.37	4.46
0.15	1.3400	9.40	10.63	369.7	3.65	8.35	1.19

Discussion

It has been found that the concentration of PO_4''', Ca^{++}, Mg^{++}, Zn^{++} and K^+ in the culture medium of *Pichia indica* have a significant effect on the growth and metabolic activities of the yeast cells. The concentration of any of these ions, not only controls the assimilation of only that particular ion by the yeast cells but they also influence the assimilation of other mineral nutrients by the cells. The results of the above experiments show that under the conditions which favour

the optimum growth of yeast, minimum assimilation of phosphate, calcium and magnesium, utilisation of sucrose and nitrogen food takes place.

Table 5

Study of the influence of ammonium sulphate concentration (5)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by yeast cells at different concentration of ammonium sulphate in the culture media.

Period of fermentation = 55 days.

Temperature = 18—34° C.

Amount of ammonium sulphate present in the culture medium	Yeast grown	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed	Amount of nitrogen utilised denoted by (—) and fixed by (+)	Amount of Ca^{++} absorbed	Amount of Mg^{++} absorbed	Amount of PO_4''' absorbed
(gm)	(gm)		(gm)	(mgm)	(mgm)	(mgm)	(mgm)
0.0	0.1138	5.55	18.01	+ 30.05	16.60	25.92	96.6
1.5	1.0808	12.03	8.385	— 123.88	4.70	7.24	23.80
2.5	1.2938	17.45	5.874	— 92.40	5.40	7.30	18.70
3.5	1.3350	13.74	7.273	+ 33.40	9.13	10.37	18.52
4.5	1.3400	13.94	7.220	+ 13.28	8.50	7.91	25.67

Table 6

Study of the influence of sucrose concentration (6)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by yeast cells at different concentrations of sucrose in culture media.

Period of fermentation = 75 days.

Temperature = 28—33° C.

Amount of sucrose present in the culture medium	Yeast grown	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed	Amount of nitrogen utilised denoted by (—) and fixed by (+)	Amount of Ca^{++} absorbed	Amount of Mg^{++} absorbed	Amount of PO_4''' absorbed
(gm)	(gm)		(gm)	(mgm)	(mgm)	(mgm)	(mgm)
10	1.00	14.48	7.118	— 147.00	7.44	7.61	22.50
20	1.156	14.36	6.950	+ 74.00	8.73	9.63	17.99
30	1.242	17.67	5.700	— 79.70	7.10	8.90	16.26
40	1.312	15.30	6.300	+ 27.70	3.81	9.67	14.20

Table 7

Study of the influence of phosphate concentration (7)

Utilisation of Ca^{++}, Mg^{++} and PO_4''' ions and consumption of carbon and nitrogen nutrients by yeast cells at different concentration of PO_4''' in the culture media.

Period of fermentation = 65 days.

Temperature = 15—35° C.

Amount of disodium hydrogen phosphate present in the culture medium (gm)	Yeast grown (gm)	% Yield of yeast cells on the basis of sucrose consumed	The results in terms of per gram of yeast produced				
			Amount of sucrose consumed (gm)	Amount of nitrogen utilised (mgm)	Amount of Ca^{++} absorbed (mgm)	Amount of Mg^{++} absorbed (mgm)	Amount of PO_4''' absorbed (mgm)
1.0	1.7030	14.31	6.98	308.9	6.5	14.0	1.0
2.0	2.1226	17.11	5.84	343.4	3.6	9.7	10.0
3.0	1.830	14.75	6.77	285.9	4.5	13.5	5.0
5.0	1.996	15.41	6.48	256.0	3.0	7.1	66.0

Thus if the concentration of one of the mineral nutrients is changed, keeping the concentration of other minerals constant it has been observed that a particular concentration of this series which gives maximum growth of the yeast cells will also show least absorption of Ca^{++}, Mg^{++}, PO_4''' and also sucrose and ammonium sulphate as calculated on the basis of individual nutrients required for the formation of 1 gm of yeast cells.

Similar results have been observed while studying the influence of aeration on the growth and assimilation of minerals as Mg^{++}, Ca^{++} and PO_4''' by the yeast cells (16).

Under the conditions of maximum growth of the yeast least quantity of minerals, carbon and nitrogen is required to form one gram of the yeast cells. This becomes interesting because if it is not the minerals, carbon or nitrogen which constitutes the weight of the yeast produced under these optimum conditions, what can it be? The obvious answer is that most of the weight of the cells formed under these conditions is due to water, which does not remain in free form, which can not be removed by heating at 80° C or by keeping the samples of yeast in a desiccator. This water thus goes in combination with the protoplasmic materials of the cell.

It is further observed that an optimum concentration of individual mineral is essential for the optimum growth. If a larger quantity of the particular mineral is present in the culture medium it inhibits the growth. A low concentration of mineral which certainly is much higher than the mineral need of the cells for the particular mineral, is also not found to be sufficient for the optimum growth. Thus a certain concentration of the individual nutrient is necessary in the culture medium for the organism to take its requisite need of the particular mineral from the culture and these minerals act as essential negative catalysts for the growth of the organism.

Summary

It has been observed in case of essential mineral nutrients that under the optimum concentration of the individual mineral concerned for cell growth of *Pichia indica* the assimilation of all mineral nutrients including carbon and nitrogen is minimum and optimum growth is synonym of maximum hydration of the protoplasmic materials. These results further suggest that the mineral nutrients act as essential negative catalysts during the formation of cells.

References

1. Bahadur, K., and H. C. Verma, J. Cytology **23**, No. 1, 9—13 (1958). — 2. Dies., Zbl. Bakter. II **112**, 604—608 (1959). — 3. Dies., Ibid. **112**, 34—37 (1959). — 4. Dies. Proct. Nat. Acad. Sci. India **27** A, 177—181 (1958). — 5. Dies., Vignana Parishad Anusandhan Patrika **2**, 163—168 (1959). — 6. Dies., Zbl. Bakter. II **113**, 511—514 (1960). — 7. Dies., Ibid. **111**, 405–409 (1958). — 8. Ders., Zbl. Bakter. II **110**, 305–308 (1957). — 9. Kjeldahl, J., Z. anal. Chem. **22**, 366 (1883). — 10. Gunning, J. W., Z. anal. Chem. **28**, 188 (1889). — 11 a. Arnold, C., and Z. Wedemeyer, Anal. Chem. **31**, 525 (1892). — 11 b. Moore, H. C., Ind. Eng. Chem. **12**, 669 (1920). — 12. Lane, J. H., and L. J. Eynon, Soc. Chem. Ind. **42**, 32 (1923). — 13. Finkener, Ber. II, 1640 (1883). — 14. Tore Halth., Z. anal. Chem. **21**, 1221—1226 (1949). — 15. Schmitz, B., Zschr. anorg. Chem. **26**, 104 (1901). — 16. Bahadur, K., and H. C. Verma, Jap. J. Microbiology **4**, 243—248 (1960).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. Krishna Bahadur, Dr. Harish Chandra Verma, Chemical Laboratories University of Allahabad, Allahabad, India.

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (Thür.). (V/14/7)

[Jour. Indian Chem. Soc., Vol. 42, No. 2, 1965]

Photochemical Formation of Peptides in Aqueous Solution of Glutamic Acid in Presence of Different Catalysts

Krishna Bahadur and R. S. Pandey

Sterilised aqueous solutions of glutamic acid after irradiation to sunlight for 400 hours, separately and also along with some of the catalysts of inorganic and organic origin, reveal by a two-way paper chromatographic technique the presence of several peptide spots along with a few amino-acids. Constituent amino-acids of the peptides have been observed by the same chromatographic technique after hydrolysing the irradiated mixtures. The dark solutions, covered with thick black cloth and equally irradiated, also furnish some of the peptides and amino-acids due to the influence of other radiations including the cosmic one.

Photochemical formation of amino-acids was reported by Bahadur and co-workers[1-3] when an aqueous mixture of paraformaldehyde, an inorganic source of nitrogen, and metallic ions as catalysts was exposed to sunlight or artificial light of an electric lamp. This work was further extended and the influences of *p*H and different sources of carbon and metallic catalysts[4] were studied on photochemical formation of amino-acids[5]. The synthesis of amino-acids involving the fixation of molecular nitrogen was also reported[6-9] when the aqueous mixtures of organic compounds and metallic ions were exposed to sunlight or artificial light.

Perti *et al.*[10-15] have synthesised peptides photochemically by exposing the sterilised aqueous solutions of amino-acids containing sugar and metallic catalysts to sunlight and artificial light. Fox's thermal synthesis of peptides[16] by heating aqueous mixtures of amino-acids to 170° is also noteworthy.

Bahadur[17] has already stressed, on these lines, the formation of proteins or at least peptide-like material in prebiological era, which on further molecular evolution formed

1. Bahadur, *Nature*, 1954, **173**, 1141.
2. Bahadur and Ranganayaki, *Compt. rend.*, 1955, **240**, 246.
3. Bahadur and Srivastava, *Vigyan Parishad Anusandhan Patrika, India*, 1962, **5**, 57.
4. Bahadur and Ranganayaki, *Nat. Acad. Sci., India*, 1954, **23A**, 21.
5. Bahadur and Srivastava, *Zhur. Obsch. Khim.*, 1961, **31**, 317.
6. Bahadur and Ranganayaki, *Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1958, **27A**, 292.
7. *Idem, J. Acad. Sci., U.S.S.R.*, 1957, **6**, 754.
8. Bahadur, and Agrawal, *Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1962, **32A**, 83.
9. *Idem, J. Sci. Ind. Res.*, 1962, **21B**, 336.
10. Bahadur *et al.*, *Nature*, 1959, **182**, 1168.
11. Bahadur and Ranganayaki, *Izvest. Akad. Nauk*, 1958, **11**, 1361.
12. Bahadur and Srivastava, *Indian J. Appl. Chem.*, 1960, **23**, 3, 131.
13. Perti *et al.*, *Biokhimia, U. S. S. R.*, 1962, 4T, **27**, 708.
14. *Idem, Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1964, **30A**, 206.
15. Pathak, H. D., Ph. D. thesis, Photochemical formation of peptides in aqueous solutions", Agra University, 1962.
16. Fox, *Science*, 1960, **132**, 200.
17. Bahadur, Report International Symposium on "Origin of life on the Earth", Moscow, pp. 86-96, 1957.

proteins; the theory regarding the origin of life on the Earth has been developed recently[18-19].

In the present communication, the influence of some of the inorganic and organic catalysts on the photolysis of glutamic acid in aqueous solution and photochemical formation of peptides has been reported.

EXPERIMENTAL

The following nine sets, each of two Sigcol conical flasks of 150 ml capacity, were prepared. Each flask contained 100 ml solution in redistilled water. Glutamic acid used in the following sets was chromatographically pure.

(*a*) 0.05% Glutamic acid.

(*b*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% ferrous sulphate (A.R.).

(*c*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% nickel sulphate (A.R.).

(*d*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% cobalt sulphate (A.R.).

(*e*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% molybdic acid (prepared from the interaction of A. R. potassium molybdate with A.R. HCl).

(*f*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure anthracene.

(*g*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure phenanthrene.

(*h*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure naphthalene.

(*i*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure fluorene.

The flasks were plugged with surgical cotton and sterilised at 15 lbs. pressure for 30 minutes. The mouths of the flasks were wrapped with polythene paper and sealed with cello-adhesive tape. One flask of each set was covered with thick black cloth and the other remained as such. All the covered and uncovered flasks were exposed to sunlight. After an exposure for 400 hr., the solutions of the covered and uncovered flasks were examined under the oil imersion microscope (D. R. P. Leitz Wetzlar microscope) using aseptic conditions and no bacterial growth was observed. The sterility of the exposed solutions was also checked by the culture-count method. A few drops of the exposed solution to be tested were introduced over the agar nutrient in the petri dishes under aseptic conditions and kept at 35° in the incubator for 3 to 4 days. The solutions did not show any bacterial growth during the exposure. These were analysed for hydrolysed and non-hydrolysed nitrogenous constituents by the two-way paper chromatographic technique, employing phenol-water (80: 20) and butanol-acetic acid-water (120:30:50) as two running solvents. Hydrolysis was done with 10*N*-HCl in sealed, hard neutral glass ampules, kept in boiling water for 24 hr. The hydrolysed samples were dried and neutralised simultaneously in a vacuum desiccator in presence of

18. Bahadur *et al.*, *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika, India*, 1963, **6**, 63-117.

19. Perti, *Agra Univ. J. Res* (*Sci.*), Vol. XII, Part II, pp. 1-48, May, 1963.

20. Agrawal, K. M. L., D. Phil. thesis, "Photochemical and Biochemical Fixation of Nitrogen", University of Allahabad, 1963.

fused NaOH. Whatman No. 1 chromatographic papers were used. Spots of am acids and peptides were developed by spraying 0.2% ninhydrin solution in acetone over the dried chromatograms. The R_f values changed due to many factors, such as change of room temperature[21], the change of the time of running of the chromatograms in a particular solvent, and also due to the degree of hydration of the same solvent. Therefore the R_f values of known amino-acids were occasionally determined and the R_f values of unknown amino-acids were compared with these known ones. Two running solvents were used in all the experiments for identification. This was accompanied with two-dimensional chromatography.

The final identification was done by simultaneous running of known amino-acids with the running solvents used in these expriments. The results of the chromatographic analysis of each set are recorded in Tables I-IX, when time of exposure=400 hr.

TABLE I

Glutamic acid solution in water.

Conc. of glutamic acid=0.05%.

S. No.	R_f values in Phenol: water (80:20).	Butanol-acetic-acid-water (120:30:50).	*Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask (light).		
Unhydrolysed:				
1.	0.33	0.20	Peptide	Purple
2.	0.68	0.60	Peptide	Purple, faint
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.37	Aspartic acid	Purple
2.	0.23	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.32	0.36	Serine	,,
4.	0.84	0.71	Norleucine	,,
5.	0.94	0.77	?	Purple, faint
		B. Solution of covered flask (dark).		
Unhydrolysed:				
1.	0.07	0.21	Peptide	Purple
2.	0.21	0.21	Peptide	,,
3.	0.38	0.21	Glutamic acid?	,,
4.	0.81	0.62	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.27	?	Pink
2.	0.00	0.36	?	,,
3.	0.23	0.37	Glutamic acid	Purple
4.	0.84	0.71	Norleucine	Purple, faint

*With 0.2% ninhydrin solution in acetone.

21. Bate Smith, Biochem. Society Symposia, No. 3, p. 62, 1950.

protei

TABLE II

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*ferrous sulphate* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Indentification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.17	0.23	Peptide	Purple, faint
2.	0.32	0.29	Glutamic acid	Purple
3.	0.45	0.23	Glycine	,,
4.	0.75	0.50	?	,,
5.	0.91	0.63	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.29	?	,,
2.	0.32	0.23	Glycine	,,
3.	0.30	0.29	Glutamic acid	,,
4.	0.72	0.46	Alanine?	,,
5.	0.62	0.78	?	,,
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.05	0.31	Peptide	Purple
2.	0.13	0.31	Aspartic acid	,,
3.	0.32	0.30	Glutamic acid	,,
4.	0.71	0.71	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.11	?	Purple, faint
2.	0.06	0.22	?	Red
3.	0.05	0.31	?	Purple
4.	0.12	0.30	Aspartic acid	,,
5.	0.25	0.38	Glutamic acid	,,
6.	0.40	0.28	Glycine	,,
7.	0.90	0.70	Norleucine	,,
8.	0.95	0.73	?	,,

TABLE III

Aqueous solution of glutamic acid (0.05%)+*nickel sulphate* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.05	0.20	Peptide	Red
2.	0.15	0.20	Peptide	Purple
3.	0.37	0.20	Peptide	Purple
4.	0.78	0.60	Peptide	Brown
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.40	Aspartic acid	Purple
2.	0.20	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.35	0.36	Serine	,,
4.	0.87	0.75	?	,,
5.	0.97	0.68	Methionine	,,

TABLE III (contd.)

S. No.	R_f values in Phenol water (80:20).	Butanol-acetic acid water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.14	0.20	?	Red
2.	0.38	0.20	Peptide	Purple
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.43	?	Red
2.	0.10	0.43	Aspartic acid	Purple
3.	0.37	0.40	Glutamic acid	,,
4.	0.70	0.38	?	Purple, faint
5.	0.77	0.77	Tryptophane ?	Purple
6.	0.85	0.77	?	,,
7.	0.90	0.80	Leucine	,,

TABLE IV

Aqueous solution of glutamic acid (0.05%) + *cobalt sulphate* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remark.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.05	0.21	?	Red
2.	0.14	0.21	Aspartic acid	Purple
3.	0.37	0.21	Peptide	,,
4.	0.86	0.29	Peptide	,,
5.	0.81	0.60	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.36	Aspartic acid	,,
2.	0.21	0.42	Serine	,,
3.	0.37	0.34	Glutamic acid	,,
4.	0.87	0.72	Norleucine	,,
		B. Solution of covered flask		
Unhydrolysed:				
1.	0.06	0.20	?	Red
2.	0.14	0.20	Aspartic acid	Purple
3.	0.34	0.20	Peptide	,,
4.	0.71	0.60	Peptide	Purple, faint
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.36	Aspartic acid	Purple
2.	0.21	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.37	0.37	Serine	,,
4.	0.90	0.72	Norleucine	,,

TABLE V

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*molybdic acid* (0.02%) *as catalyst.*

S. No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	R_f values in Butanol-acetic-acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.15	0.23	?	Purple, faint
2.	0.15	0.30	Peptide	Purple
3.	0.37	0.30	Glutamic acid	,,
4.	0.56	0.25	Peptide	,,
5.	0.81	0.69	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.20	0.44	?	,,
2.	0.27	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.46	0.43	Threonine	,,
4.	0.56	0.50	?	Very faint
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.10	0.30	Peptide	Faint
2.	0.32	0.30	Glutamic acid	Deep purple
3.	0.75	0.68	Peptide	Brown
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.44	?	Purple
2.	0.20	0.46	?	,,
3.	0.27	0.43	Serine?	,,
4.	0.32	0.45	Glutamic acid	,,
5.	0.82	0.80	Norleucine	,,

TABLE VI

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*anthracene* (0.05%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	R_f values in Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.17	0.15	Aspartic acid	Purple
2.	0.37	0.20	Peptide	,,
3.	0.62	0.20	Histidine	,,
4.	0.86	0.37	Peptide	,,
5.	0.55	0.77	?	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.22	?	Pink
2.	0.00	0.26	?	,,
3.	0.12	0.21	Ornithine	Purple
4.	0.16	0.31	Aspartic acid	,,
5.	0.25	0.36	Serine?	,,
6.	0.37	0.30	Glutamic acid	,,
7.	0.60	0.27	Histidine?	,,
8.	0.77	0.47	?	,,
9.	0.87	0.75	Norleucine	,,
10.	0.60	0.78	?	,,

TABLE VI (contd.)

S. No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		B. Solution of covered flask		
Unhydrolysed:				
1.	0.08	0.20	Peptide	Purple
2.	0.21	0.20	Peptide	,,
3.	0.36	0.20	Glutamic acid	,,
4.	0.41	0.20	Peptide	,,
5.	0.77	0.62	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.27	?	Faint
2.	0.12	0.29	Aspartic acid	Faint purple
3.	0.25	0.36	Serine	Purple
4.	0.38	0.28	Glutamic acid	,,
5.	0.85	0.57	?	Faint Purple
6.	0.92	0.60	?	,,

TABLE VII

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*phenanthrene* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remark.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.17	0.21	Peptide	Purple
2.	0.40	0.21	Glutamic acid	,,
3.	0.65	0.16	Peptide	,,
4.	0.82	0.27	Peptide	Brown
5.	0.38	0.32	Peptide	,,
6.	0.77	0.60	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.07	0.45	?	Faint
2.	0.22	0.53	?	Purple
3.	0.35	0.41	Glutamic acid	,,
4.	0.81	0.53	?	,,
5.	0.92	0.72	Phenylalanine	,,
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.08	0.20	Peptide	Faint
2.	0.23	0.20	Peptide	Purple
3.	0.40	0.20	Glutamic acid	,,
4.	0.37	0.30	Peptide	Brown
5.	0.80	0.30	Peptide	,,
6.	0.80	0.61	Peptide	Purple
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.40	Aspartic acid	,,
2.	0.25	0.47	Serine ?	,,
3.	0.35	0.40	Glutamic acid	,,
4	0.92	0.74	Norleucine ?	,,

TABLE VIII

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*naphthalene* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.23	0.30	Peptide	Purple
2.	0.41	0.30	Glutamic acid	,,
3.	0.42	0.35	Peptide	Brown
4.	0 61	0.26	Peptide	Purple
5.	0.82	0.36	Peptide	,,
6.	0.82	0.67	Norleucine	,,
7.	0.52	0.84	?	Faint
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.41	?	Faint
2.	0.12	0.38	Aspartic acid	Purple
3.	0.20	0.44	Serine	,,
4.	0.35	0.38	Glutamic acid	,,
5.	0.92	0.70	Norleucine	,,
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.08	0.32	Peptide?	Pink
2.	0.20	0.32	Aspartic acid	Purple
3.	0.37	0.31	Glutamic acid	,,
4.	0.78	0.36	Peptide	Yellow
5.	0.77	0.70	Norleucine	Purple
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.38	?	Faint purple
2.	0.21	0.38	Aspartic acid	,, ,,
3.	0.22	0.44	Serine	Purple
4.	0.35	0.37	Glutamic acid	,,
5.	0.60	0.35	Alanine	Faint
6.	0.90	0.70	Norleucine	,,
7.	0.95	0.75	Phenylalanine	Faint purple

TABLE IX

Aqueous glutamic acid solution (0.05%) + *fluorene* (0.02%) *as catalyst.*

S.No	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remark.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.11	0.29	Aspartic acid	Purple
2.	0.23	0.31	Peptide	,,
3.	0.41	0.31	Glutamic acid	,,
4.	0.41	0.40	Peptide	Brown
5.	0.55	0.28	Peptide	Purple
6.	0.80	0,41	Peptide	Brown
7.	0.77	0.75	Peptide	Purple

TABLE IX (contd.)

S. No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Hydrolysed:				
1.	0.10	0,43	Aspartic acid?	Faint
2.	0.22	0.44	Serine	Purple
3.	0.32	0,41	Glutamic acid	Purple
4.	0.87	0.66	Phenylalanine	,,
5.	0.92	0.72	Norleucine	,,
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.09	0.31	?	Pink
2.	0.22	0.31	Peptide	Purple
3.	0.40	0.31	Glutamic acid	,,
4.	0.77	0.71	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.41	?	Pink
2.	0.12	0.41	Aspartic acid	Faint
3.	0.25	0.44	Serine	Purple
4.	0.37	0.37	Glutamic acid	,,
5.	0.80	0.55	?	Faint purple
6.	0.85	0.66	Phenylalanine	Purple
7.	0.92	0.72	Norleucine	,,

DISCUSSION

When the unhydrolysed and hydrolysed samples of the exposed glutamic acid solutions with different catalysts were studied by the two-way paper chromatographic technique, the spots of the various photolytic products were observed. A few of the spots from the unhydrolysed samples were of the amino-acids and the rest of the spots were considered to be of the peptides as these disappeared from the hydrolysed samples of the same mixture. A few faint spots of the unhydrolysed as well as hydrolysed samples, however, remained unidentified. Generally it had been observed that there were a few spots in unhydrolysed samples, but the same samples on hydrolysis provided several spots, which revealed the constituent amino-acid of those peptides which did not appear over the papers of the unhydrolysed samples.

The solutions, covered with thick black cloth, also furnished peptide spots, but lesser in number than those of the uncovered solutions. It has been observed by Bahadur and co-workers[20] that the covered solutions, which were simultaneously exposed along with uncovered solutions to sunlight, revealed the synthesis of amino-acids involving the fixation of molecular nitrogen, but similar solutions kept in lead chamber remained unchanged. The fact that other radiations including the cosmic one, which penetrated through the thick black cloth in dark solutions, synthesised some of the amino-acids. In lead chamber, where all the radiations including the cosmic one were cut off, nothing could take place.

Glutamic acid solution without any catalyst afforded two peptide spots which on hydrolysis provided aspartic acid, glutamic acid, serine, and norleucine with an unidentifi-

faint spot. A similar solution, kept in dark, furnished glutamic acid and two peptide spots. On hydrolysis, glutamic acid and norleucine with two unidentified spots were observed.

Glutamic acid solution with ferrous sulphate provided glutamic acid with two peptide spots and an unidentified spot. The solution on hydrolysis afforded glycine, alanine, and glutamic acid with two unidentified spots. A similar solution, kept in uncovered flask, furnished aspartic acid, glutamic acid, and two peptide spots. The solution on hydrolysis provided aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, and four unidentified faint spots including a red one.

Glutamic acid solution with nickel sulphate provided four peptide spots including one brown and one red. The solution on hydrolysis afforded glutamic acid, aspartic acid, serine, and methionine with an unidentified spot. A similar solution, kept in covered flask, provided the peptide spot with an unidentified spot. The solution on hydrolysis furnished glutamic acid, aspartic acid, and leucine along with four unidentified spots including a red one.

Glutamic acid solution with cobalt sulphate provided aspartic acid, three peptide spots, and an unidentified red spot. The solution on hydrolysis afforded aspartic acid, serine, glutamic acid, and norleucine. A similar solution, kept in covered flask, furnished aspartic acid, two peptide spots, and an unidentified spot. The solution on hydrolysis provided aspartic acid, glutamic acid, serine, and norleucine.

Glutamic acid solution with molybdic acid furnished three peptide spots with glutamic acid and an unidentified spot. The solution on hydrolysis furnished glutamic acid, threonine, and two unidentified spots. A similar solution, kept in covered flask, provided glutamic acid with two peptide spots. On hydroloysis serine, glutamic acid, and norleucine with two unidentified spots were observed.

Glutamic acid solution with anthracene furnished aspartic acid, histidine, and two peptide spots with an unidentified spot. The solution on hydrolysis provided ornithine, aspartic acid, serine, glutamic acid, histidine, and norleucine with four unidentified spots including two pink ones. A similar solution, kept in covered flask, provided glutamic acid with four peptide spots and this solution on hydrolysis afforded aspartic acid, serine, and glutamic acid with three unidentified spots.

Glutamic acid solution with phenanthrene provided five spots for peptides along with glutamic acid. On hydrolysis, glutamic acid and phenylalanine with three unidentified spots were observed. A similar solution, kept in covered flask, provided glutamic acid with five peptide spots. The solution on hydrolysis afforded aspartic acid, serine, glutamic acid, and norleucine.

Glutamic acid solution with naphthalene afforded four peptide spots with glutamic acid and norleucine along with two unidentified faint spots. On hydrolysis, aspartic acid, serine, glutamic acid, and norleucine with two unidentified faint spots were observed. A similar solution, kept in covered flask, provided two peptide spots with aspartic acid, glutamic acid, and norleucine. This solution on hydrolysis furnished aspartic acid, serine, glutamic acid, alanine, norleucine, and phenylalanine with an unidentified faint spot.

Glutamic acid solution with fluorene furnished aspartic acid, glutamic acid, and four peptide spots. On hydrolysis, aspartic acid, serine, glutamic acid, phenylalanine, and nor-

leucine were observed. A similar solution, kept in covered flask, furnished two pe spots with glutamic acid along with an unidentified pink spot. The solution on hydrolysis provided aspartic acid, serine, glutamic acid, phenylalanine, and norleucine with two unidentified spots including a pink one. It was also observed on the basis of the number of photolytic products that organic catalysts, e.g. anthracene, phenanthrene, naphthalene, and fluorene, had somewhat better influence over the photolysis of glutamic acid in comparison to those of inorganic catalysis, such as nickel sulphate, ferrous sulphate, cobalt sulphate, and molybdic acid.

The authors are grateful to the Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, for financing this work.

Chemistry Department,
University of Allahabad,
Allahabad.

Received June 25, 1964.

Author's copy

THE ORIGIN OF LIVING SYSTEMS

By
O. N. PERTI, K. BAHADUR AND H. D. PATHAK

Reprinted from the
Agra University Journal of Research (Science)
Vol. XIII, Part II, pp. 197—224, May, 1964.

Agra.

Date of Issue : 15th July, 1965.

A. U. P.

THE ORIGIN OF LIVING SYSTEMS*

O. N. Perti., K. Bahadur and H. D. Pathak
Department of Chemistry,
Th. D. S. B. Government College, Naini Tal, and
Allahabad University, Allahabad, India.

Abstract

In previous communications [Perti, O. N., *Agra Univ. J. Res. (Sci.)*, **XII**, Part II, 1-48 (1963); Bahadur, K. *et al.*, and Perti, O. N. *et al.*, *Vigyan Parishad Anusandhan Patrika*, **6**, 94-117 (1963); Bahadur, K. *et al.*, and Perti, O. N. *et al.*, *Zentralbl. f. Bakteriology*, **117**, 567-602 (1964)] we had described the preparation of units showing properties of a biological order such as growth, replication or multiplication, and, in a general sense, metabolic activity. These units were termed by us JEEWANU, a Sanskrit word meaning particles of life. In the present communication preparation of JEEWANU by many more processes has been described. Evidence of time-lapse photomicrographs has been presented in certain cases to show properties of a biological order. Confirmation of this work by M. H. Briggs in U.K. in papers recently presented to British Interplanetary Society and at the International Congress on Photobiology has been pointed out. It has been stressed that the available evidence indicates that units such as these were in all probability the immediate precursors of cellular life. These units could easily have been formed in abundance in the oceans of the primitive Earth.

What is life ? It is not only an interesting question but as Pauling[1] suggests a great question. The very fact that we formulate such a question implies that we are prepared to distinguish between life and non-life, between living and non-living matter. What is that which distinguishes living from the non-living ? At first the distinction seems obvious. Animate beings like animal or plants *live* and differ in important ways from the non-living or inanimate objects such as a rock, wood, clay or metal. One distinguishing property of the living is growth up to a limiting size. If growth alone is the distinguishing property then chemical crystals must be called living as they also grow in a suitable environment to a limiting size retaining their basic shape and general characteristics. If movement is the distinguishing quality of a living system then metal rods must be called living because they expand and contract with temperature. These simple and rather crude examples have been given to show that a rigorous definition of life or living system is not an easy task. Moreover, the *obvious* distinctions are patent and visible only on the higher side of the life-

* This article was received on October 12, 1964 for publication.

scale. At the lowest side of the life-scale qualities are not so obvious and a clear cut division between the living and the non-living poses a problem of very great magnitude.

It is common experience that living organisms maintain themselves by making use of the material present in the environment in which they live. There is an undoubted fundamental identity of substance between the living and the non-living. The structural material of both living and the non-living are known to undergo fundamentally similar physico-chemical behaviour. The difference is only in the organisational pattern. This difference has been pointed out in various ways by several scientists who have attempted to define a living system as opposed to a non-living system at the lowest level of life-scale. Haldane[2] calls a living system as a "self-perpetuating pattern of chemical reactions". Bernal[3] points that it is "an embodiment within a boundary of self-maintaining chemical processes". According to Konikova[4] : "A living thing is a chemical substance or complex which, by a process of chemical reactions with the substances of its surroundings, accomplishes its reproduction and development, *i.e.*, it remains itself while yet changing (not only in the direction of decay). Life is the attainment, by a chemical substance, of the ability to rebuild itself by interacting with other chemical substances, remaining like itself and beginning to be different from itself." Some like Vernadski[5] have emphasised only the chemical composition of the system particularly with respect to oxygen and carbon while others like Horowitz[6] point out that a living system is not only a self-reproducing system but it has also the ability to mutate randomly. To Pirie[7] a demand for capacity to mutate "is a purely linguistic restriction and it leads to absurdities". In fact at the International symposium on 'The Origin of Life on the Earth' held at Moscow in 1957 it became quite clear that life is no longer a definable quality. As Dr. N. W. Pirie pointed out that all that we can do is to define our attitude towards a system which we would be willing to call as living.

No one has yet succeeded in formulating a definition of life or a living system which satisfies every aspect. Only one point seems to be certain that so far as organisation of life is concerned ".... It is still chemistry and physics as it must be if an organism is to be chemically and physically viable".[8] The more we think of the problem on the microscopic scale the more we get convinced that there is a continuity of the non-living and the living and the distinctions begin to have meanings and definitions only at a higher level in the life-scale. Moreover, it is only the idea of a continuity which would make sense when we consider the phenomenon of life on a cosmic scale.

Our earth is but a minute miniscule of matter in the vast and complex framework of celestial bodies which is the universe. It is merely one of the middling member of the planets going round our sun, the sun in turn is only 1 out of about 150,000 million stars in our galaxy and our galaxy is only one of the millions of galaxies in the universe. Shapley[9] estimates that even our galaxy may contain about 100,000,000 planets similar to the earth and capable of sup-

porting life. Sir Harold Spencer Jones[10], Fessenkov and Oparin[11], and others[12] do not think that our solar system is a unique event in the whole of the universe. The general consensus of opinion of astronomers today is that our planetary system is not exceptional. It follows that our earth is not in any way particularly favoured for the existence of the only life in the universe. After all the most fundamental characteristics of the planet earth are a watery environment, moderate temperatures, plenty of minerals and a supply of reasonably stable carbon based molecules. In this biochemical system the present day terrestrial life thrives. Is this the only kind of biochemical system possible for any type of life ? Dr. Robert S. Richardson[13] in his book *Man and the Planets* has seriously suggested a possible biochemistry for Mars in which nitrogen may replace oxygen in the energy relations of the organisms. The key reaction suggested is oxidation of nitrogen through ammonia to nitrate. Sir Harold Spencer Jones in his book *Life on other Worlds*[10] has even visualised a special kind of life suitable for high temperature in which the basic life-building element is not carbon but sodium. Firsoff in his *Life Beyond the Earth*[14] has pointed out various types of possible biochemical systems to sustain various kinds of life under diverse circumstances of temperature range, of atmosphere composition and of different environmental conditions. It is no longer considered unreasonable or absurd to imagine a life different from that found on the present day Earth. Indeed the idea of another kind of life is itself warranted by the study of living forms as known on the Earth.

Up to date known biological facts belie the statement of Strughold[15] that life on the Earth is possible only generally between the temperature range of 0° to 60° C., (32° to 140° F). Hot spring bacteria thrive in water having a temperature of 90° C., and some dry spores and seeds can withstand a temperature up to 120° C., without damage. Certain animalculae (rotatoria and tardigrades) living in the Arctic lichens are able to withstand very low temperatures.[16] Penguins are known to live happily at Antarctica at temperatures close to −60° C.[17] Dry spores do not lose their vitality under conditions of vacuum even when dipped in liquid helium (−271·15° C).[18] Thus it is known that life on the Earth can exist from −60° to about +90° C. Even at wider ranges of temperature it can continue in latent form without much damage.

It may also be mentioned here that the general contention of the biologist that no life is possible without oxygen and sunlight is not valid. We know of sulphur bacteria[19] which are capable of existing without oxygen or sunlight and which build up their cell material from inorganic compounds. *Thiobacillus denitrificans* oxidises sulphur at the expense of nitrate and *D. sulphurians* are known to oxidise hydrogen at the expense of sulphate. The *Boracicola* bacillus is known to thrive in saturated boric acid solution, certain fungi can live in a solution of copper sulphate and potassium nitrate and organisms are also known which can extract sustenance from mercuric chloride.[16],[20] Various bacteria are known to live by oxidising mineral coal and petroleum, methane, ammonia, ferrous iron, sulphur, hydrogen sulphide etc. Even

silicate of aluminium is known to be an important constituent in certain type of bacterial metabolism.[20,21] N. W. Pirie[22] has pointed out : "..activities that we now look upon as odd, *e.g.*, the manipulation of vanadium oxides and strong sulphuric acid by tunicates, of silica by many species, and of oxides of nitrogen by some beetles, may once have been widespread. They often occur in orders of respectable antiquity." At the same time we have very cogent reasons to believe that oxygen was a later addition to the primitive atmosphere of the Earth which initially had a reducing character and consisted mostly of hydrogen, ammonia and methane.[23] No well known terrestrial life of today could have possibly survived in such an atmosphere except the sulphur bacteria type which could thrive and multiply happily. The present oxygen rich atmosphere of the Earth is generally believed to be the result of vegetation.

Study of blue green algae led G. E. Fogg[24] to conclude that had they been colourless they would be indistinguishable from certain bacteria. This points to a common origin of plants and animals. Similarities in the body fluid of different animals also points in the same direction.[25] Indeed it stands to reason that life adapted itself to the chemical environment that happened to be present from time to time and the modern forms are the forms that gradually evolved, modified, complexified and adapted as the environment changed. There was a sort of interaction of primitive life and primitive environment which ultimately resulted in the gradual modification of both. Studies of chemautotrophs provides evidence of the interaction of environment and life.[26]

All this leads us to the inevitable conclusion that different kinds of life are possible under diverse conditions. Given this and keeping in mind the power of adaptability inherent in life, the interaction of life and environment, the biological evolution who knows to what extent any form of life would evolve in appropriate circumstances which need not necessarily be of the Earth-type alone. Though it is a fact that the only kind of life known to us today is terrestrial life yet it is no longer possible to believe that life is a rare accidental event which happened to take place a couple of billion years ago on this isolated speck in the universe—the Earth. That ".... of all the vast stellar systems Earth is the sole abode of life seems entirely ludicrous".[27] We can no longer adopt the medieval attitude that the Earth is the only measure of life in the universe. Today the climate of human thought in this respect is symbolised by subjects such as astrobiology or exobiology which aim at dealing with experimental approaches to life beyond the Earth and not by the parochial narrowmindedness of the traditional biologist who believes in the creation of life by a series of highly fortuitous events or chances which took place on terrafirma alone. Today Prof. James A. Coleman, Chairman of the Department of Physics at American International College, Springfield, Massachusetts, U.S.A. boldly dedicates his latest book *Modern Theories of the Universe*[28] as follows : "This book is dedicated to all youth on all planets in all solar systems throughout the universe."

It is not essential to rigorously define life in order to talk about it. We can discuss the pros and cons of the properties which we must look for in a system to admit it to the category of living systems.

Today it is true that all we know about life is only the modern terrestrial forms of it. It is equally true that we can no longer ignore other possibilities. How can we extend our vision of life ? The process of extension of ideas is a process in which we extrapolate from the known to the unknown. Let us try to follow this process.

To begin with we may say that any kind of life is bound to require a system for its energy supply. In all probability this system would be dependent on chemical action which would involve the development of rather complex molecules. A chemical reaction of the type of reversible photochemical reaction can well provide a source of energy within the system. In fact many ordinary reversible chemical reactions can work as a sort of storage battery—absorbing energy at one time and liberating it at another. If the environment can provide the necessary cyclic change then a useful source of energy within the system can be obtained.

Let us have a look at the present day terrestrial cell. The living cell as it is found on the Earth today is a very complicated affair. It has within its boundary numerous diverse types of chemicals. It is also known that if we merely bring together all the constituents of the cell we do not get a cell—the living unit. Whereas the known individual constituents of the cell with the exception of nucleic acids have properties of a physico-chemical order, the living cell also exhibits properties of a biological order—growth, replication or multiplication and metabolic activity.

The modern terrestrial cell has numerous constituents delicately balanced to function in a very synchronised and harmonised manner. As a result of this the cell exhibits certain properties of a biological order. Is the present day terrestrial cell a unit of life on account of its constituents or on account of its properties of a biological order ? We know that the individual constituents of the cell as a rule do not exhibit properties of a biological order and if the cell did not possess these properties it would cease to be a unit of life. So far as life phenomenon in general is concerned what is of greater importance—properties of a biological order or the constituents of the cell ? If both the constituents of the present day terrestrial cell and its properties of a biological order are taken to be essential for any kind of life then it follows that we are more or less assuming that no life other than the terrestrial life is ever possible or there cannot be life on any other celestial body which does not very much resemble in all respects the planet Earth. It also implies that we are more or less prepared to accept some one particular cell which sparked off the beginning of life. So we have to make a distinction between constituents of the terrestrial cell and its properties of a biological order. If we are inclined to accept and many of us would now be inclined to do so that the phenomenon of life need not be con

fined to life at present known to us on the planet Earth then it follows that we are more or less prepared to accept that the properties of a biological order are of greater importance than the constituents of the cell. It further implies that we are prepared to accept some carefully generalised meanings of the fundamental properties of a biological order—growth, multiplication and metabolic activity.

The more we learn about the constituents of the present day terrestrial cell and its marvellous behaviour the more we wonder about its origin. It appears to be a final finished and polished product which terrestrial Nature arrived at after long and tedious trials rather than a unique chance event in the history of the Earth. It is quite feasible that terrestrial Nature first made a much more complicated product and by gradual refinement and adaptation arrived at the present day cell.[29] It is equally possible that the terrestrial Nature first practiced on primitive type of cells and by gradual complexity arrived at the modern form. One cannot at the same time entirely dismiss the idea of a unique chance event which created the only life in the universe for today we really do not know of any other kind of life except that which is found on this planet.

It would be quite interesting to speculate upon the problem whether the properties of a biological order—growth, multiplication and metabolic activity in the widest sense of these terms—were first created on the Earth in cell-like systems or all the constituents of the present day cell. Many scientists have speculated and experimented on the formation of constituents of the present day terrestrial cell out of the ingredients generally believed to be present in the early age of the planet Earth.[30] Only a few of them have speculated about or experimented upon the properties of a biological order without much reference to the constituents of the present day cell. These were the experiments dealing with the preparation of cell models.

In 1864 Traube[31] prepared a cell model by putting copper sulphate crystals in a solution of potassium ferrocyanide. A semipermeable membrane is formed round the crystal. This membrane is permeable to water and ferrocyanide which enters the globule thus formed because of osmotic pressure considerations and forms another layer beneath the first. The globule swells up because of the excess of water entering the globule and the old membrane bursts and a new one is formed below the cracks. After sometime the globule appears considerably grown in size. However, this increase in the size of the globules is quite different from the idea of growth as understood in biology. (See also later) Here the increase in size is only because more water enters the globule and there is nothing within the globule other than copper sulphate which is slowly consumed up in the formation of the boundary wall of the globule.

Butschli[32] prepared a model of the cell which reproduced the movements of living amebae by rubbing a drop of olive oil with potash solution. The

drop commenced to send out psuedopodia to move about and even to engulf hard particles very much as amebae takes up algae. Rhumbler[33] and many others constructed analogous models reproducing the movements, also the fading and division of cells.

Leduc[34,35] placed a piece of fused calcium chloride in a saturated solution of potash and potassium phosphate. Semipermeable calcium phosphate membrane was formed. By changing the concentration of the solution, by adding different substances and by various other means Leduc succeeded in producing very complex formations like algae and mushrooms. This subject was named by him "Synthetic Biology".

Kuckuck[36] showed that when radium acts on a mixture of gelatin, glycerol and common salt, a peculiar culture appears on the gelatin after 24 hours, consisting of the globules showing the signs of growth and multiplication.

This work is important only so far as it shows the display of a few physical properties of matter—properties which appear to superficially simulate some properties of biological order. At best such studies merely point out that properties of matter like viscosity, surface tension, osmosis, permeability, colloid formation, coagulation etc., all helped in the formation of the first morphological structure with the properties of the living.

Mention may next be made of the efforts to prepare particles of some shape with organic substances with a view to make an effort to introduce in them the properties of a living system. For the past several years work on coacervates[37,38] and microspheres[39,40] is being persued with this aim.

Coacervates are formed by various methods and one of these methods is by mixing gum arabic and gelatin solutions and pouring the mixture in excess of water. Coacervate particles of irregular shape are formed. On centrifuging the particles combine and lose their independent existence. Shaking breaks these particles into smaller ones and this has been suggested as multiplication. Enzymes and other materials if introduced in the coacervate particles are greatly modified. It has been suggested by Oparin that life originated in the form of a coacervate particle which developed the properties of living system by slow process of molecular evolution and incorporation of enzymes and necessary substrates.

In the absence of a definite structure without a boundary wall it is difficult to assess the living properties of these particles. This is particularly so in the case of the phenomenon of growth which is not like the biological type of growth.

Microspheres studied by S. W. Fox and coworkers in United States bear a relationship to precell models as previously reported[41] and to Oparin's coacervates. When hot saturated solutions of thermal copolymers containing the 18 common amino acids are allowed to cool, huge numbers of uniform, micro-

scopic, relatively firm, and elastic spherules separate which have been termed microspheres. These particles differ in important ways from coacervates. Microspheres retain their integrity on centrifugation[42] whereas coacervate droplets coalesce easily.[43] Microspheres accept the Gram stain[44] and also exhibit some dynamic phenomena.[45] It has been found that under appropriate conditions the interior of the microspheres disappears progressively and entirely, leaving behind the outer boundary. At this stage the Brownian motion of the residual centre can also be observed. It has also been observed that in certain microspheres there appears to be a tendency to cleave, or for centres to separate. As cell model the study of microspheres indicates the tendency of macromolecules to form micro spherules by the agency of water, formation of membranes in these units by selective diffusion of the interior matter under suitable conditions and a tendency for cleavage of the microspheres. They do not show the biological properties of growth and multiplication.

Studies of such cell models makes us think more about the typical properties of a biological order. Consider the property of adaptability. In biology it means that when there is a mild change in the physico-chemical environment of an organism, changes take place within the organism of such a kind that the unfavourability of the environmental change for the organism is decreased. If this changed condition continues for a sufficiently long time the changed physiology and morphology of the organism becomes a permanent feature. Is this essential property of adaptability a feature of living organism only ? In 1888 Le Chatelier gave his famous principle in which he says : "If a system in equilibrium is subjected to constraint a change occurs, if possible of such a kind that the constraint is partially annulled." Le Chatelier had in mind the chemical equilibrium. It is thus obvious that the tendency to achieve the result of partially annulling the constraint is present in both living and non-living matter. This tendency is called adaptability in living systems because in the living system we can easily conceive the idea of response to stimuli. However, it is well known that the response to stimuli is not an essential property of a living system because it is not present in the living system devoid of nerve cells. Further, the idea of an *effort* being made by the living system to face the unfavourable environmental conditions is more or less a figment of our imagination. This is particularly so in the case of the lowest forms of living systems known to exist on the Earth today. The fact is that both in the living and the non-living systems the property of adaptability is inherent and one can say in a general way that this is a property of matter whether living or non-living.

The property of duplication is another important biological characteristic. Nucleic acids are known to duplicate under appropriate environment. It is worthwhile to note that *it is not the molecule of nucleic acid which forms another molecule of nucleic acid but it is the environment which forms the duplicate out of its own material, the original molecule merely providing the template.* This process of duplication of huge protein molecules which we find in the present terrestrial con-

ditions need not be the process of duplication for simpler molecules which might have formed the earliest forms of living systems. Duplication in essence is really a sort of autocatalysis. There are many simpler compounds which show autocatalytic action and thus form their own kind in appropriate conditions. We have suggested earlier[46] that matter itself has the inherent property of duplication and under suitable conditions this property can be observed. For example, suppose there is a mixture at dynamic equilibrium. In this mixture there is the possibility of formation of many molecules at the same thermodynamic level and requiring the same amount of energy of activation. Suppose one molecule of one type of the many types of synthesisable molecules is introduced then more molecules of this type shall be synthesised as compared to the other possible syntheses. It is worthwhile pointing that Jordan[47],[48],[49],[50] has shown that if molecule A has a replica of its own a system AA is formed and a special force of stability is created known as quantum mechanical interaction force and the system AA becomes more stable than AB where A and B may be similar but not identical. Pauling[51] pointed out that this special quantum mechanical interaction energy of larger molecules as of proteins is negligible as compared to the interaction energy of identical or non-identical large molecules and suggested that the process of duplication is a two stage process in the case of proteins. A forms a template for the synthesis of complementary molecule A^{-1} which is then used as the template for the synthesis of A in the second step. It is quite possible that in the beginning simpler molecules used the one step process of duplication in the living systems and when bigger molecules got incorporated in it then the two step process became necessary.

Another characteristic property of the present day terrestrial living systems is metabolic activity. Today we find in the terrestrial living system a particular type of metabolic activity which is related to its body material and energy requirements. Consider this metabolic activity at the lowest level of life scale. The essential feature of the metabolic activity is selective assimilation from a suitable environment which ultimately results in the formation of building material or 'body' material of the living unit. It is obvious that in the terrestrial living forms of today there would be one kind of metabolic activity but for another kind of living form an entirely different kind of metabolic activity would be required since the 'body' material would be different. Thus in considering metabolic activity in general one has to keep in mind only two essential features, namely (i) selectively taking up of certain chemicals by the living unit from an appropriate environment and (ii) ultimate formation of the 'body material' within the living unit from this 'nutrition'. This concept of metabolic activity is perfectly general as it does not specify the chemicals taken up nor does it specify how the chemicals are transformed into 'body material' whatever that may be. This kind of definition would be suitable for any kind of living system formed out of any material in any appropriate environment.

Growth is a property which should be very carefully generalised. This growth in the living system should be from inside and not from the outside.

This rules out the type of growth seen in crystals. Consider yeast cells. The growth of yeast cells in different culture media has been studied by Krishna Bahadur and coworkers.[52] They have found that the conditions of the optimum growth is a synonym for a maximum hydration of the protoplasmic material of the cells.[53] This points to the role of hydration in the living systems in general. The living unit must show the living-type of growth. Such a system must have a semipermeable membrane for the boundary through which selective assimilation of suitable chemicals can take place and through which hydration of the system be also possible. In perfectly general terms we may say that the living unit must have a semipermeable boundary through which selective assimilation of suitable chemicals can take place from an appropriate environment resulting ultimately in a growth from *inside*.

We would be justified in calling a system living if it has the properties of growth, multiplication and metabolic activity. Growth means the increase in size of the unit from within by actual accumulation of the 'body material' of the unit within a semipermeable boundary. Multiplication means an increase in the number of these units in such a manner that the newer units come into existence through the parent unit. Metabolic activity stands for any series of chemical reactions which take place within the unit as a result of which at least a part of the environmental molecules entering the unit are converted into the body material of the unit. It is *essential* that all these three fundamental biological properties should be present together in the same unit. If only one or two of them are observed then the unit should not be called living. A system or unit can be called living only if it consumes appropriate 'nutrition', becomes bigger by the synthesis of 'body material' from the 'nutrition' consumed and produces its own kind. This definition would hold no matter what ingredients are involved in the making of the units, in the 'nutrition' or in the 'body material'.

We believe that it is possible to prepare such living units in the laboratory both from organic and inorganic constituents or their mixtures.[46,54] We have been able to prepare such units and have named them JEEWANU which in Sanskrit means 'particles of life'. We also believe that such units were the protocells which ultimately gave rise to present day terrestrial cells. Further given a suitable environment such units are fully capable of forming many types of cells which can ultimately give rise to diverse kind of life.[46,54,55]

When freshly prepared these units or globules have a diameter of about 0·2 to 0·5μ. These grow bigger in size during first 6 to 8 days and reach the size of 1 to 1·5μ. Then these give out buds like the buds of the yeast cells. These buds grow in size and become almost equal to the parent unit in a few days. The newly formed bud or the daughter unit may separate from the parent unit or may remain attached to it and bud again and thus start an independent function. As a result after some time clusters of these units having two, three or more units attached binary or at angles can be observed. On further aging of the mixture huge clusters of these units are observed in the

mixture in which initially a few units were added. Thus they show the property of growth and multiplication.

The metabolic activity of the above mentioned JEEWANU is proved by the fact that the material constituting these JEEWANU is not present in the environmental medium in the form they are present in the body of the JEEWANU. These Jeewanu have a distinct boundary wall and have a dense centre. The internal structure of these units appears heterogeneous as observed under the microscope due to differences of the refractive index of the material present in them.

The great resemblance of these units to unicellular organisms specially yeast cells is striking. All the experiments dealing with the preparation of these units were performed under sterilised conditions and great care was taken to work as aseptically as was possible. It was repeatedly found that these units do not represent terrestrial organisms because these do not grow on nutrient agar. Further it was noticed that by changing the chemicals and procedure of their preparation, JEEWANU of quite different morphological structure yet having the properties of growth, multiplication and metabolic activity can be obtained. In one case the units do not separate out but remain attached to the parent units and grow branches giving a coral-like appearance. In fact it appears to us that it is possible to prepare the JEEWANU of the desired structure by using different chemicals and controlling physical conditions.

Recently, Dr. M. H. Briggs[56] has repeated some of our experiments and have even extended them. His conclusion was: "Some of these objects possess a morphology similar to that of simple cells. The objects are composed of organic matter very similar to protoplasm. Some also possess weak enzymic activity. There is some evidence that the objects reproduce by budding and are not merely formed continuously from dissolved organic matter.

While the definition of "life" and "living" is a difficult problem, it can be said that these microscopic objects satisfy many of the criteria of living cells. It seems entirely probable that objects similar to those observed in the present experiments were formed in abundance in the oceans of the primitive Earth and were the immediate precursors of cellular life."

Dr. Briggs observed the fixation of atmospheric nitrogen by these mixtures and its conversion into different amino acids. Among the compounds which he could tentatively identify in the microstructures were adenine, guanine, glucose, fructose, vanillic acid, 3-hydroxy benzoic acid, 4-hydroxy phenyl acetic acid and urea. None of these compounds were added in the mixtures used and so they must have been synthesised later on exposure to light. In the precipitates obtained in the mixtures detectable levels of estrase activity was found in some, while phosphatase activity was found in others.

The modern cell is not merely a mixture of organic polymers. The organelles of modern cells were not created by a unique chance event. In fact

there is considerable evidence for the evolution of these organelles.[57] Some of this evidence has been indicated by Briggs.[56] All this points to the validity of the suggestion that the first cells or proto-cells were very simple structures devoid of most of the organelles found in the cells of modern organisms. In fact the properties of JEEWANU very emphatically point to the nature of these proto-cells.

The important features of these units termed JEEWANU are:—

(i) They are obtained from simple chemicals all of which can be presumed to be available on the primitive Earth.

(ii) The energy source required to initiate the reaction is mild heating, exposure to sunlight or light from a 500 watt—1,000 watt bulb or exposure to ultraviolet radiations of a therapy lamp. No extraordinary physical conditions are required in their production.

(iii) Though they very much resemble yeast cells they actually do not correspond to modern terrestrial organisms as they do not grow on conventional nutrients.

(iv) Once produced by the application of energy mentioned in (ii) they can be seeded in a fresh portion of the original and can then be seen to grow and multiply.

(v) They are fairly stable units with a semipermeable boundary wall.

(vi) The composition of these units is not quantitatively the same as of the mixture from which they are produced.

(vii) If suitable organic material is used the units get composed of organic matter very similar to protoplasm.

(viii) Some of these units are found to possess a morphology similar to that of simple cells.

(ix) There is some evidence for enzyme activity of the type of esterase or phosphatase in units prepared out of simple chemicals.

(x) They show biological type of growth, multiplication and metabolic activity.

It has been suggested[54] that such units can also be made even with materials containing no amino acids, peptides or proteinoids. This has been demonstrated by preparing JEEWANU having about 64.14% copper present as cuprous oxide, 4·2% carbon and 0·28% nitrogen. The rest being hydrogen, oxygen, biological minerals and molybdenum. The ash content of these JEEWANU is about 88% and these contain no proteins, peptides or amino acids. Yet they show the biological properties of growth, multiplication and metabolic activity. In fact their behaviour is practically identical with JEEWANU based on amino acids, peptides etc.

We are of the opinion that on the primitive earth JEEWANU like structures were first synthesised from what is known as prebiotic soup[58] from which

life is supposed to originate. To begin with JEEWANU of many types were formed. Perhaps JEEWANU with organic materials originated after the JEEWANU with inorganic material had their day. Perhaps both existed simultaneously. All these systems had morphological structures and were capable of growth, multiplication and metabolic activity. However, the JEEWANU which needed inorganic nutrients soon exhausted their supply of nutrition when all the available inorganic nutrients were booked as the body material whereas the JEEWANU formed from organic material continued their 'life activity' because their nutrition supply was renewed by photochemical formation. These JEEWANU got a long span of time and evolution produced various forms of the living systems of our Earth.

Bernal has mentioned the possibility of such living systems : "..... There may have been other radically incompatible forms on this Earth at earlier time and these or others we may succeed in making artificially."[59] We believe that JEEWANU are the key to the possibilities of such systems.

We have made the suggestion about the formation of unicellular JEEWANU of inorganic composition. What was their fate ? As suggested earlier perhaps they did not take a long time to book the whole of inorganic 'nutrition' of a particular locality and ceased to 'live'. If this was so they would have hardly crossed the unicellular stage and their fossils would be only like the fossils of unicellular organisms. It is quite possible that these unicellular JEEWANU might have formed huge clusters if they grew attached to each other. If this was so then it would be worthwhile to search for such type of fossils in various mines from this point of view.

Study of JEEWANU formed basically out of organic material strongly suggests a certain sequence in the formation of living systems on the Earth or elsewhere. This sequence may briefly be described as follows.

Life originated in the form of a particle or globule. This particle or globule was bigger than a colloid particle and very much like a coacervate particle. It, however, differed from coacervate particle in an important respect. This particle was made of such materials that a semipermeable boundary wall was soon formed around it by the coagulation of its material with the chemicals of the environment. If appropriate molecules were present in the environment which could form the 'body material' of the particle and if a suitable source of energy necessary for the formation of the 'body material' of the particle from the environmental molecules entering the particle was available, the environmental molecules will enter the globule and the 'body material' of the globule will be synthesised because of the inherent properties of duplication and adaptability of matter. As a result the particle would become bigger in size from *inside*. This would continue till the limit of flexibility of the boundary wall of the particle would be reached. At this stage at the weakest point in the membrane a protuberance would be formed very much like the bud type of structure observed in the yeast cells. This phenomenon

would be a manifestation of the adaptability of matter. The constraint caused by the increased pressure inside would be partially annulled when the bud is formed for the pressure inside the particle would decrease. In fact the property of adaptability of matter is not only in operation here but is also present at various stages of the reactions taking place within the particle, in the course of the formation of the material of the particle from the environmental molecules entering it. The mechanism of the formation of these substances is always being adjusted depending upon the physico-chemical conditions within the particle. Pattee[60] has suggested the possibility of formation of protein molecules with specific sequence of amino acids by a computer sort of mechanism and may be the protein molecules or at least the proproteins and enzymically active molecules were formed in the particles described above.

The bud grows in size and may separate from the parent particle or may remain attached to the parent unit and start its independent existence. Thus particles with the properties of growth, multiplication and metabolic activity might have been formed. Such particles have been termed by us JEEWANU and it has been shown that they can be produced and studied in the laboratory by very easy methods. These particles represent the true protocells as it has been noticed that they have the tendency to become more complicated with the passage of time in appropriate environment.

In a subject as vast as the phenomenon of life there is no scope for narrow-mindedness. Even on our planet life is generally believed to have made its appearance some 2-3 billion years ago. What might have happened at that remote time under an environmental condition which certainly was not what we have today, is anybody's guess. If these guesses are not to be mere idle speculations we have to use them for the purpose of making certain forecasts or we should be able to use them as the basis of certain experiments. If some observations any how can be obtained which conform in a more or less general way to our speculations then we would be justified in calling our guess a workable provisional hypothesis.

Study of JEEWANU suggests to us a logical sequence in the origin of living systems. Study of different types of JEEWANU strengthens our belief in a universal theory of life—a belief so very dear to workers in the field of what Russians call astrobiology[16] and Americans call exobiology. It appears that the phenomenon of life is as much a characteristic of the universe as matter and energy and this phenomenon can take place in different parts of the universe under diverse environmental conditions. Further the distinction between the living and the non-living appears to be a matter for mere convenience for it is possible to so organise non-living matter that it begins to exhibit properties of the living systems as best exemplified by the study of particles called by us JEEWANU. Further we can say that the so called non-living matter can exhibit properties of duplication and adaptability under suitable circumstances which suggests that duplication and adaptability are also inherent properties of any kind of matter living or non-living. Such an idea is philosophically also

very satisfying. Energy can give rise to matter and matter can be so organised as to give rise to properties of living systems.

Some experimental work on the preparation and properties of certain types of JEEWANU has been described by us earlier.[46,54,55] In this paper further work on the preparation and properties of different types of JEEWANU has been described.

EXPERIMENTAL

In our earlier experiments the general criticism advanced was that there might have been some sort of infection inspite of the precautions taken. We, however, pointed out that if these units were the result of some type of infection then they could be grown on the conventional media. Such was not the case. However, the production of similar type of units of entirely different composition as described here would completely rule out any possible doubt about infection.

The glass apparatus such as test-tubes, pipettes, conical flasks, measuring glass ware etc., used in the experiments were thoroughly sterilised by heating them in an electric oven for 2 hours at 200° and then sterilising them in an autoclave at 20 lbs. steam pressure for 30 minutes.

The chemicals employed in solutions were A. R. grade. The following solutions were used.

(i) *Mineral solution :* The following composition was dissolved in 100 ml of glass distilled water :

Potassium sulphate	0·02 g
Sodium chloride	0·02 g
Calcium acetate	0·02 g
Magnesium sulphate	0·02 g
Zinc sulphate	0·002g

When a clear solution was obtained then 0·02 g of potassium dihydrogen phosphate was added and the solution shaken to dissolve it. A characteristic of this solution is that it becomes turbid on boiling and is clear on cooling. Every time this mineral solution was used it was prepared afresh.

(ii) *Fehling solution :* It was prepared in the usual manner.

(A) A. R. Copper sulphate (69 g) was dissolved in distilled water (1 litre) containing a little of 2N sulphuric acid.

(B) 100 g sodium hydroxide and 350 g Rochelle salt was dissolved in 1 litre distilled water.

Fehling solution used in these experiments was always prepared by mixing equal volumes of (A) and (B).

(iii) *Artificial sea-water :* In 500 ml distilled water the following were dissolved one by one :—

Sodium chloride	14·71 g
Potassium chloride	0·25 g
Magnesium chloride	1·61 g
Sodium bromide	0·28 g
Calcium sulphate	0·68 g
Magnesium sulphate	1·20 g
Calcium carbonate	0·55 g
Ferric oxide	0·003 g

The container was cotton plugged and the solution boiled for 1 minute. It was then cooled to room temperature and used.

(iv) *Gum arabic solution :* 15 g of gum arabic was dissolved in 100 ml distilled water. The solution was tested for reducing properties with Fehling solution. It was used only if the result was negative. The solution was always sterilised before use.

(v) *Gum arabic-sucrose solution :* 15 g gum arabic and 100 ml water were taken in a 250 ml flask, cotton plugged, and boiled for 1 minute. It was then allowed to stand at room temperature over night. Next day 20 g sucrose was added to it and the mixture was boiled till the sugar dissolved.

(vi) *Other solutions :* The following were the concentrations of other solutions used. In each case except solution of formaldehyde, they were sterilised before use.

Ammonium molybdate	1·0 g/ 100 ml distilled water
Glucose	0·2 g/ -do-
Galactose	0·2 g/ -do-
Arabinose	0·2 g/ -do-
Sucrose	20·0 g/ -do-
Sodium molybdate	0·1 g/ -do-
L-Ascorbic acid	0·2 g/ -do-
Phenyl hydrazine	0·1 ml/ 25 ml water+2 ml alcohol
Formaldehyde	formalin (40%) 5ml/ 100 ml water

In what follows the concentrations of solutions employed were those mentioned in (i) to (vi) unless otherwise stated.

The following mixtures of solutions were prepared in sterilised test-tubes. Only the proportions of solutions used are given.

A (i)	Fehling solution	2·5 ml
	Formaldehyde solution	0·5 ml
	Water	2·0 ml
A (ii)	Fehling solution	2·5 ml
	Ammonium molybdate solution	0·7 ml

	Formaldehyde solution	0·5 ml
	Water	1·3 ml
A (iii)	Fehling solution	2·5 ml
	Ammonium molybdate solution	0·7 ml
	Gum arabic-sucrose solution	0·7 ml
	Formaldehyde solution	0·5 ml
	Water	0·6 ml
A (iv)	Fehling solution	2·5 ml
	Ammonium molybdate solution	0·7 ml
	Gum arabic-sucrose solution	0·7 ml
	Mineral solution	0·6 ml
	Formaldehyde solution	0·5 ml

Solution mixture A (iv) was divided into two sterilised test-tubes. One of them was boiled for 1 minute and then cooled at room temperature (20°) for 30 minutes to give what we call the 'seeding solution'. 0·01 ml of this seeding solution was added to each of the remaining solutions, that is, to A(i), A(ii), A(iii) and unboiled A(iv). The vessels were cotton plugged and the whole exposed to sunlight for 2 hours a day for 8 hours. Identical mixtures were also exposed to a 1000 watt bulb kept at a distance of 1 meter for 20 hours.

When these mixtures were exposed to light (sunlight or artificial) in pyrex glass vessels a visible change in the solution was observed due obviously to reduction of Fehling solution. The solution gradually turned green and finally gave a brown deposit. A drop of each of the solutions was examined on a microscope slide at 1000 magnification. In each case cell-like objects (*Jeewanu*) were visible. They were photographed on 35 mm. film and later the prints were enlarged to 2B size. Some selected photomicrographs have been given in this paper. Every one of the photomicrographs given in this paper was taken like this and is given at uniform magnification. Some characteristics of the units observed are given below using solution mixture numbers to indicate from which solution mixtures they were obtained.

A (i) : Single units as well as aggregates could be seen. Some of them arranged in a chain like manner. They were thick and dark and the light did not pass through them. A representative example is photomicrograph No. 1. Besides these floating objects were also visible through which light could pass (No. 2).

A (ii) : In this mixture single nucleated cell-like objects could also be seen (No. 3). As the period of exposure to light was further increased formation of bigger and longer objects with internal structure could be observed (No. 4).

A (iii) : The globular units produced were single or in clusters. Through some of them light was able to pass but through others light did not pass because of thickness (No. 5). In the transparent units a whirling motion inside the boundary wall of the unit could be seen. Long filamentous type of structures could also be observed.

A (iv) : A much larger number of units appeared as compared to A(i), A(ii) or A(iii) but thick elongated conglomerates were rare. Single or double units frequently showed whirling motion of a black spec within the boundary of the unit. Photomicrographs Nos. 6 and 7 show bigger conglomerates with boundary wall.

In set B the following mixtures were used.

B(i) same as A(i)
B(ii) -do- A(ii)
B(iii) -do- A(iii)

B (iv) had the following composition :—

Fehling solution	2·5 ml
Ammonium molybdate solution	0·7 ml
Gum arabic-sucrose solution	0·7 ml
Artificial sea water	0·6 ml
Formaldehyde solution	0·5 ml

The 'seeding solution' was prepared from B(iv) in the manner described for A(iv). 0·01 ml of this 'seed' was added to B(i), B(ii), B(iii) and unboiled B(iv). These mixtures were exposed to light as in case of set A. Some general characteristics of units obtained were as follows :—

B (i) : Two types of structures were seen. One were transparent globular objects with a black spec inside the boundary. These units were motile. The other type were non-motile dark big structures—single, clusters or conglomerates of units (Photomicrograph No. 8).

B (ii) : Structures similar to B(i). Jelly like bigger structures were rare (Nos. 9, 10).

Photomicrograph No. 10 shows an interesting composite structure with boundary wall and internal details.

B (iii) : Transparent units were rare otherwise it was all very much like B(i).

Photomicrograph No. 11 shows smaller units in chains, and, No. 12 shows a very big conglomerate.

B (iv) : In this thicker clusters were more numerous and transparent structures were rare. Photomicrograph No. 13 shows small conglomerates of different shapes and sizes.

Set C(i), C(ii), C(iii) and C(iv) was similar to set A except that formaldehyde solution used in A(i), A(ii), A(iii) and A(iv) was replaced by an equal volume of arabinose solution. The whole experiment was repeated.

C (i) : Both transparent and dark type of units were observable. Conglomerates were frequently found. They were brown in their outline but greenish inside. Photomicrograph No. 14 shows both transparent and darker type of units in small conglomerates.

C (ii) : In this floating jelly-like complex structures in which small globules were embedded could also be seen (No. 15).

C (iii) : Single and double units were frequent but bigger aggregates were rare (No. 16).

C (iv) : All types of units and aggregates seen in C(i), C(ii) and C(iii) could be seen. Photomicrograph No. 17 shows a composite structure.

Set D(i), D(ii), D(iii) and D(iv) was similar to C(i), C(ii), C(iii) and C(iv) except that D(iv) was obtained by replacing mineral solution in C(iv) by an equal volume of artificial sea water. The rest of the experiment was repeated.

D (i) : Many varieties of structures were found. In some cases conglomerates with circular boundary were seen. These exhibited interesting internal structure (No. 18). Photomicrograph No. 19 shows another type.

D (ii) : Both single units having a nucleus and numerous types of aggregates were visible (Nos. 20, 21). Some long striated structures were also seen. Jelly-like transparent globules were also found floating.

D (iii) : In this solution big conglomerates of units were rare and only single units or smaller aggregates were observable. One bigger unit is shown in photomicrograph No. 22.

D (iv) : Numerous types of structures could be seen. Filamentous conglomerates were, however, rare. By altering depth of focus inner structure of the units or aggregates could be easily seen (No. 23, 24).

Set E and F were obtained by modification of sets C and D. The sugar arabinose used in solutions of set C and D was replaced by an equal volume of galactose. The rest of the procedure was just a repetition of the process given earlier.

E (i) : Single and smaller aggregates of units predominated. Some aggregates were purely green in colour. Continuous examination through the microscope in one case showed the phenomenon of budding. Photomicrograph No. 25 shows an aggregate.

E (ii) : Brown units or their conglomerates could be seen. Most of them had motility. The solution also showed a slightly different type of structure which showed whirling motion. Budding similar to the budding of yeast cells could also be observed (No. 26).

E (iii) : Single units as well as smaller clusters containing 2, 3, 4 or 5 units could be seen. Transparent jelly-like bigger size structures were also found. If the time of exposure to sunlight was increased from 8 hours to 50 hours numerous another type of motile structures were also produced, as for example see photomicrograph No. 27.

E (iv) : Bigger conglomerates were rare. An insect like spiral shaped globule could be seen (No. 28).

F (i) : Some units were thin and transparent and others were thicker and darker. They were found single, double or in bunches. Photomicrograph No. 29 shows a peculiar bird-like aggregate.

F (ii) : Structures like F(i) were seen. Walls of units appeared to be thicker as compared to F(i). Some types of units observed are shown in photomicrograph No. 30.

F (iii) : Single, double and bigger conglomerates of units could be seen. Some practically colourless units were also observed (No. 31).

F (iv) : Practically all types of units given in F(i), F(ii), F(iii) found to be present. Some of them exhibited different stages of growth and budding. One of the conglomerates is shown in photomicrograph No. 32.

Set G and H were obtained by replacing galactose solution in sets E and F, respectively, by an equal amount of L-ascorbic acid solution. The experiment was then repeated.

G (i) : Various types of units and their aggregates could be seen. Colourless transparent motile units such as those frequently observed in set E could not be seen. Photomicrograph No. 33 shows different types of simple units and aggregates. No. 34 shows an interesting cell-like structure.

G (ii) : Coloured and colourless units were observed. The boundary wall was brown and the colour inside was green (No. 35).

G (iii) : All units and their aggregates found were coloured (No. 36).

G (iv) : Practically all types of units as given in G(i), G(ii) and G (iii) could be seen. Photomicrograph No. 37 shows some types.

H (i) : Active units of various sizes could be seen. Conglomerates had as a rule smaller number of units (No. 38).

H (ii) : In this solution units formed were as a rule bigger than in any solution of set G. Long chains of units were also seen (No. 39).

H (iii) : Big conglomerates were not found. In certain cases units single, double or in clusters had a jelly-like transparent envelop (No. 40).

H (iv) : Similar to H(iii) but units appeared to have thicker boundary wall (No. 41).

For sets I and J the L-ascorbic acid used in sets G and H was replaced by an equal volume of glucose solution. The experiment was repeated.

I (i) : The colour of the units was light green. Single units and clusters were found. Shapes of conglomerates were interesting, for example see photomicrograph No. 42.

I (ii) : Same as I(i). Bigger aggregates were less frequently found. Long filamentous structures were also visible (No. 43).

I (iii) : Conglomerates were small and less frequent. By altering focus internal structure in some bigger units could be distinctly seen (No. 44).

I (iv) : Numerous small size units could be seen. All of them had a black spec inside the boundary which could be seen by altering focus. Jelly-like transparent globules having numerous embedded units were also visible (No. 45).

J (i) : In these units a distinct internal structure was easily visible (Nos. 46, 47, 48).

J (ii) : Besides coloured units floating jelly-like bigger globules were also numerous (Nos. 49, 50).

J (iii) : Objects similar to those in J(i) and J(ii) were observed. Some interesting cases are shown in photomicrograph Nos. 51, 52, 53, 54, 55.

J (iv) : In this mixture the units were very motile. Aggregates of various shapes and sizes were also visible (Nos. 56, 57, 58, 59).

We had previously described a case of quick preparation of active units with the help of citric acid.[46,54,55] A slightly modified composition given below was employed here.

0·4% citric acid solution	10 ml
Molybdic oxide	0·1 g
Colloidal ferric oxide	10 ml
pH 6·5 phosphate buffer	10 ml
Mineral solution	10 ml
Water	10 ml

Molybdic acid used was prepared by the action of hydrochloric acid on potassium molybdate solution till a permanent precipitate appeared. The mixture was filtered, the precipitate was washed free from chloride ions and dried. Colloidal ferric oxide was prepared by adding drops of N-ferric chloride solution to 500 ml boiling water till tea-coloured solution was obtained.

The above mixture was exposed to sunlight for 8 hours a day.

Photomicrograph No. 60 shows these units as they appear in the solution on exposure to sunlight. No. 61 shows the effect after 3 months' exposure to sunlight. Further exposure gives rise to numerous long or complicated objects such as shown in photomicrographs Nos. 62, 63, 64.

Experiments were also carried out with tyrosine using a 0·04% aqueous solution. This was exposed to artificial light from a 1000 watt bulb kept at a distance of 1 meter. After 3 months' exposure an internal structure in the units was developed as illustrated in photomicrograph No. 65. This internal

structure becomes more complicated as the exposure time was further increased. After another 6 months much bigger structures could be seen (No. 66). Photomicrograph Nos. 67, 68, 69 were taken after 1½ years' exposure, and photomicrograph No. 70 after 2 years' exposure and No. 71 after 3 years. If sucrose (0·1 g per 100 ml; tyrosine solution) was added in the initial solution then after 2 years of exposure to light structures of the type shown in photomicrograph No. 72 could be seen.

The following composition containing glycine was also exposed to artificial light (1000 watt bulb kept at a distance of 1 meter).

Glycine	0·05 g
Sucrose	0·10 g
Water	100 ml

After 1½ years' exposure structures of the type shown in photomicrograph No. 73 could be found.

If glycine in the above solution was replaced by arginine we can get structures of the type shown in No. 74. Replacement of glycine by histidine also gave complicated structures a representative example of which is shown in photomicrograph No. 75.

Units based on copper oxide such as those described in sets I and J show many interesting features which are recorded in photomicrographs Nos. 76 to 93.

No. 76 : shows units immediately after formation.
Nos. 77, 78 : were taken after five days.
No. 79 : was taken after 20 days when germ like structures seem to arise.
No. 80 : shows many units having protruding germ like structures.
No. 81 : shows that one unit may give out more than one germ like structure.
No. 82 : the germ of one unit may pass through the other.
No. 83 : the germs may run in parallel lines.
No. 84 & 85 : the germ of one unit may join with the germ of another.
No. 86, 87 : germs may have different arrangements.
No. 88 : several germs may arise from the same unit. Notice the characteristic tips of these germs.
No. 89, 90 : after about one month several units can be observed entangled in transparent germ like structures.
No. 91, 92 : show coral like growth.
No. 93 : shows a huge spherical structure which can be sometimes observed.

Sets K and L were obtained by substituting glucose solution in sets I and J by an equal volume of phenyl hydrazine solution. The experiments as in sets I and J were repeated.

In sets K and L the units formed initially increase in size and gradually become more complex with increasing time of exposure to sunlight or artificial light. This gradual increase in size and complexity is shown in photomicrographs Nos. 94, 95, 96 and 97.

Here it may be mentioned that recently Kalinenko has announced production of bio-like structures in the laboratory. The first announcement about these structures was given in August 1963 issue of the popular Russian magazine *Science & Life* (Naouka Khizn) and later fuller details were published in Russian journal of Microbiology.[61] The abstract of this is :" Electrical energy causes accumulation in distilled water and in an agar jelly of biolike structures having the shape of discs, cigars, caudate, rockets, etc.

The bio-like structures formed in the electric field are not of a static pattern. They undergo complete metamorphosis under constant conditions in distilled water or some other medium. The major pattern of this development consists in a delicate morphological differentiation of the body substance and its division into two or more parts.

Electron micrographs point to the conclusion that already at the very moment of its initiation the body of the bio-like structures consists of a solid "nucleus" and a "plasmic" area. Staining with polychrome aniline dyes confirms the heterogeneity of the "nuclear" and "plasmic" matter of these structures. These moieties are stained in different hues : phase contrast as well as ultraviolet microscopic observations after staining with fluorochromes (acridine orange) indicate the fine and complex heterogeneity of bio-like structures.

Crystallo-optic observations support our opinion that biolike structures are no crystalline bodies. They do not dissolve in hot or cold water nor are they changed in weak solutions of acetic and hydrochloric acid.

Preliminary microchemical analysis carried out so far did not reveal in the composition of the bio-like structures any molecular grouping typical of proteininc organisms."

Experiments of Kalinenko recall the work of Wilhelm Reich which was published in 1948 under the title *Discovery of Orgone.*[62] Objects superficially resembling the 'bio-like' structures can also be obtained from a solution of the type mentioned below.

First	Fehling solution	2·5 ml
	Gum-arabic sucrose solution	0·7 ml
	Ammonium molybdate solution	0·7 ml
	Mineral solution	0·6 ml
	Glucose solution	0·5 ml
Second	Fehling solution	1·6 ml
	Ammonium molybdate solution	0·4 ml

Mineral solution	0·7 ml
Sucrose solution	0·8 ml
Glucose solution	0·5 ml
Water	0·8 ml

By exposing such solutions for about 50 hours to sunlight and then allowing them to stand (at 20°) for about a month numerous "bio-like" structures can be seen in them under the microscope. Some representative examples which apparently superficially compare favourably with "bio-like" structures described by Kalinenko are given in photomicrographs Nos. 98, 99, 100, 101, 102 and 103.

Time-lapse photomicrographs of some JEEWANU : For taking time-lapse photomicrographs, the following procedure was employed.

In the combinations given below the mixture was divided into two parts say A and B. Solution A was boiled for 1 minute to give what may be termed the "seed" solution. It was cooled to room temperature for 30 minutes before use. One or two drops from solution B were placed on a clean microscope slide. A sterilised platinum wire loop was dipped in the "seed" solution (A) and was brought in contact with solution B placed on the microscope slide. It was then covered with a clean big size cover glass. To avoid evaporation sometimes the cover glass was sealed with liquid paraffin. A portion of the slide was kept under view. It was also kept exposed to light from a 100 watt microscope lamp. At different times photomicrographs were taken. In each case the mixtures were tested for infection before and after the experiment. They were found to be free from infection.

Combination I :	Fehling solution	2·5 ml
	Ammonium molybdate solution	0·7 ml
	Mineral solution	0·6 ml
	Glucose solution	0·5 ml
	Gum arabic sucrose solution	0·7 ml

Two series of photomicrographs obtained from this combination are given :

104 a, b, c and d : These were taken at a difference of 12 hours. They show the formation of a protuberance in a bigger unit.

105 a,b,c,d,e,f,g : Taken at subsequent differences of 12 hours. These show how complexity in the units is created.

Combination II :	Fehling solution	2·5 ml
	Gum arabic solution	0·4 ml
	Mineral solution	0·7 ml
	Sucrose solution	0·8 ml
	Glucose solution	0·5 ml
	Water	0·8 ml

Four series of photomicrographs are given.

106 a, b, c : They were taken at 0 day, 2 days and 6 days. These clearly show how the units grow in size.

107 a, b, c, d : They were taken at 0 day, 1 day, 2 days and 3 days. They show the growth in single and double units.

108 a,b,c,d,e,f,g: Taken at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days. They show the phenomenon of growth and increasing complexity.

109 a,b,c,d,e,f,g: Taken at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days.

Combination III :

Fehling solution	2·5 ml
Mineral solution	0·7 ml
Gum arabic solution	0·8 ml
Glucose solution	0·2 ml
Water	0·8 ml

110 a, b, c and d : They were taken at 0, 4, 24 and 48 hours. They show budding and growth of these units.

Combination IV :

Fehling solution	2·5 ml
Ammonium molybdate solution	1·6 ml
Mineral solution	0·7 ml
Gum arabic solution	0·8 ml
Sucrose solution	0·8 ml
Glucose solution	1·0 ml
Water	0·6 ml

111 a, b, c and d : Taken at 0, 12, 23 and 48 minutes.

Note the double units marked with a circle bearing the legend I or II. Photomicrographs 111 a and c and 111 b and d are placed in the same order. For this the double units have been marked in each of them.

They also show the different views.

Combination V :

Fehling solution	2·5 ml
Potassium molybdate solution	1·6 ml
Gum arabic solution	0·9 ml
Mineral solution	0·7 ml
Sucrose solution	0·8 ml
Glucose solution	0·5 ml
Water	0·8 ml

Here in the case of the environmental medium (B) the concentration of gum arabic solution was increased from 0·9 ml to 1·4 ml in the above combination. "Seed" solution (A) was allowed to stand for 3 days before use.

112 a,b,c,d,e,f,g,h,i : These were taken at 0, 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 22 days. Follow the smaller size unit attached to a bigger one. These photomicrographs show the dynamic nature of these units.

ACKNOWLEDGEMENTS

Several friends and students have helped us in preparing this paper. The following photomicrographs were obtained by courtesy of workers mentioned against each.

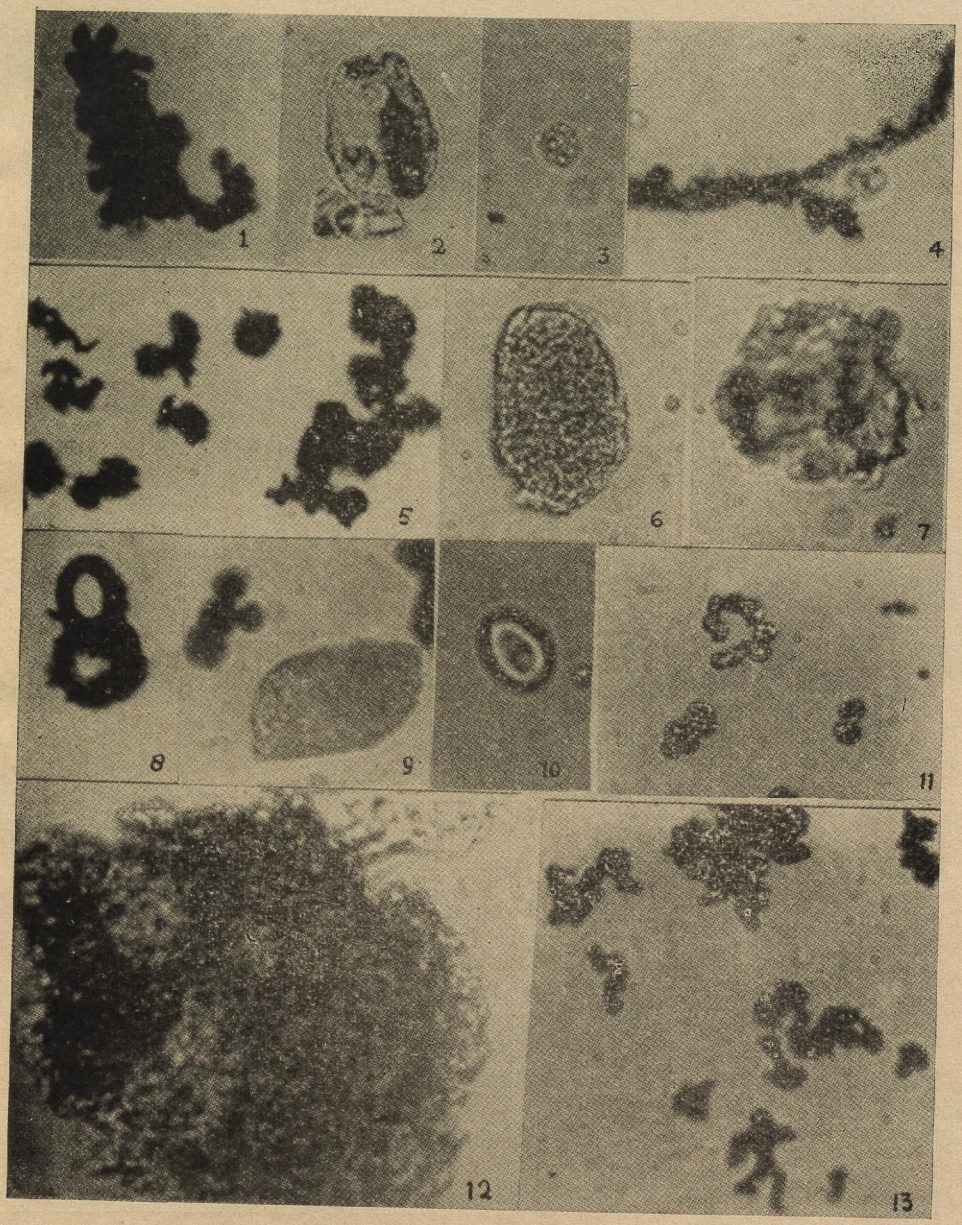
No. 60	Mr. V. Kumar
No. 66, 67, 68, 69, 73, 74	Mr. R. S. Pande
No. 77, 78, 79, 112 a, b, c, d, e, f, g, h, i	Mr. A. Kumar
No. 111 a, b, c, d	Mr. A. Kumar and Mr. V. Kumar
No. 80, 84, 85 and 110 a, b, c, d	Dr. S. Ranganayiki *et al.*,
No. 72	Miss I. Saxena

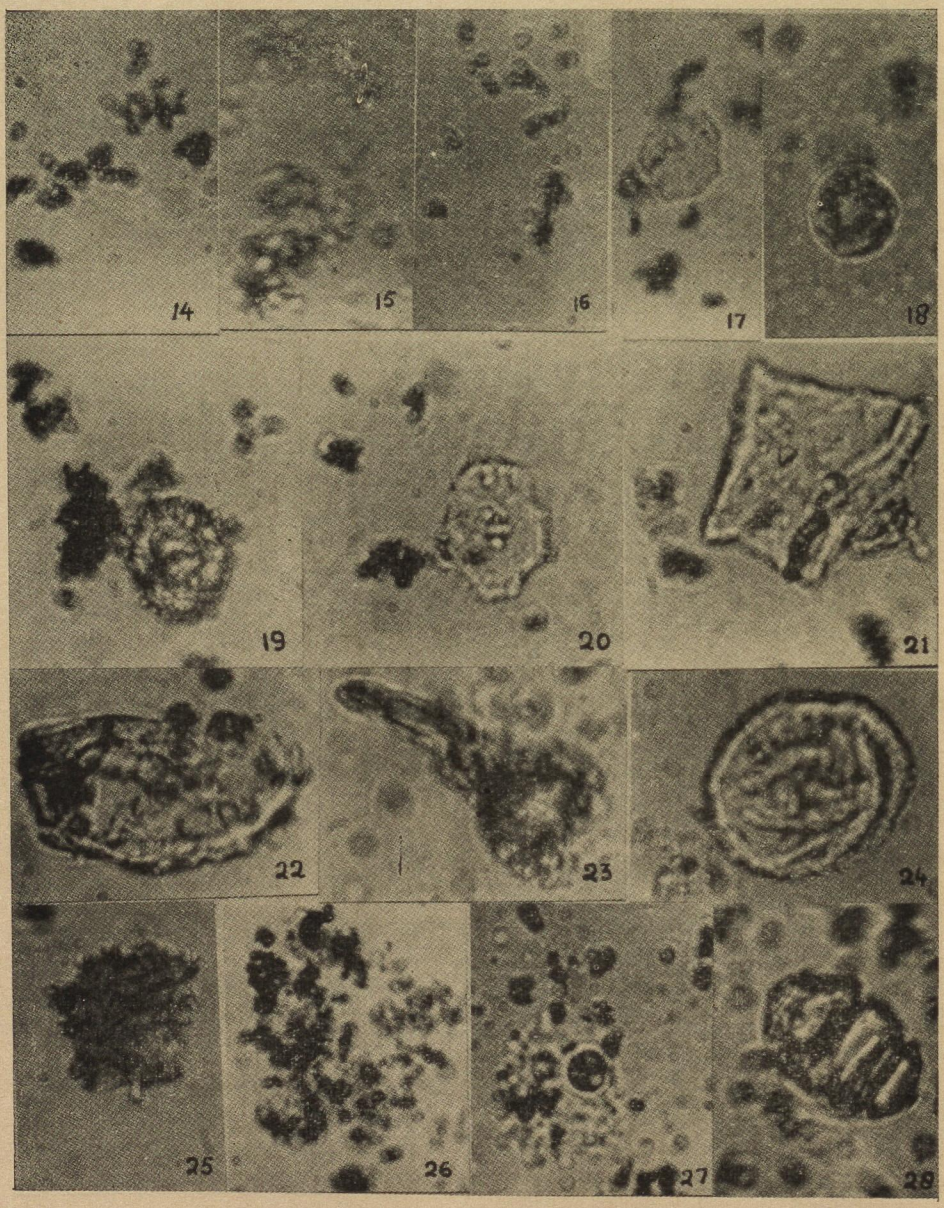
We are also grateful to the authorities of Th. D. S. B. Government, College, Naini Tal, and, of Allahabad University, Allahabad, for providing research facilities.

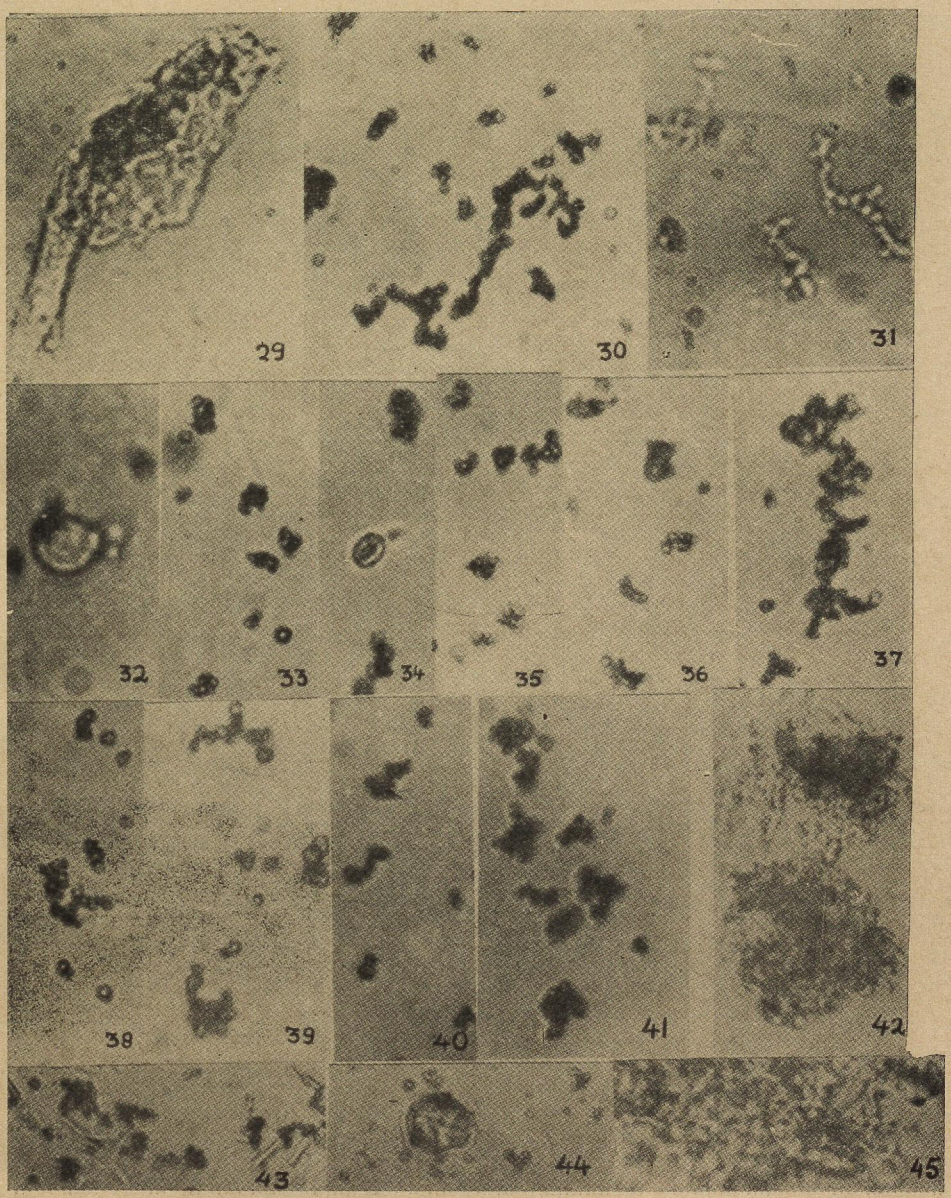
REFERENCES

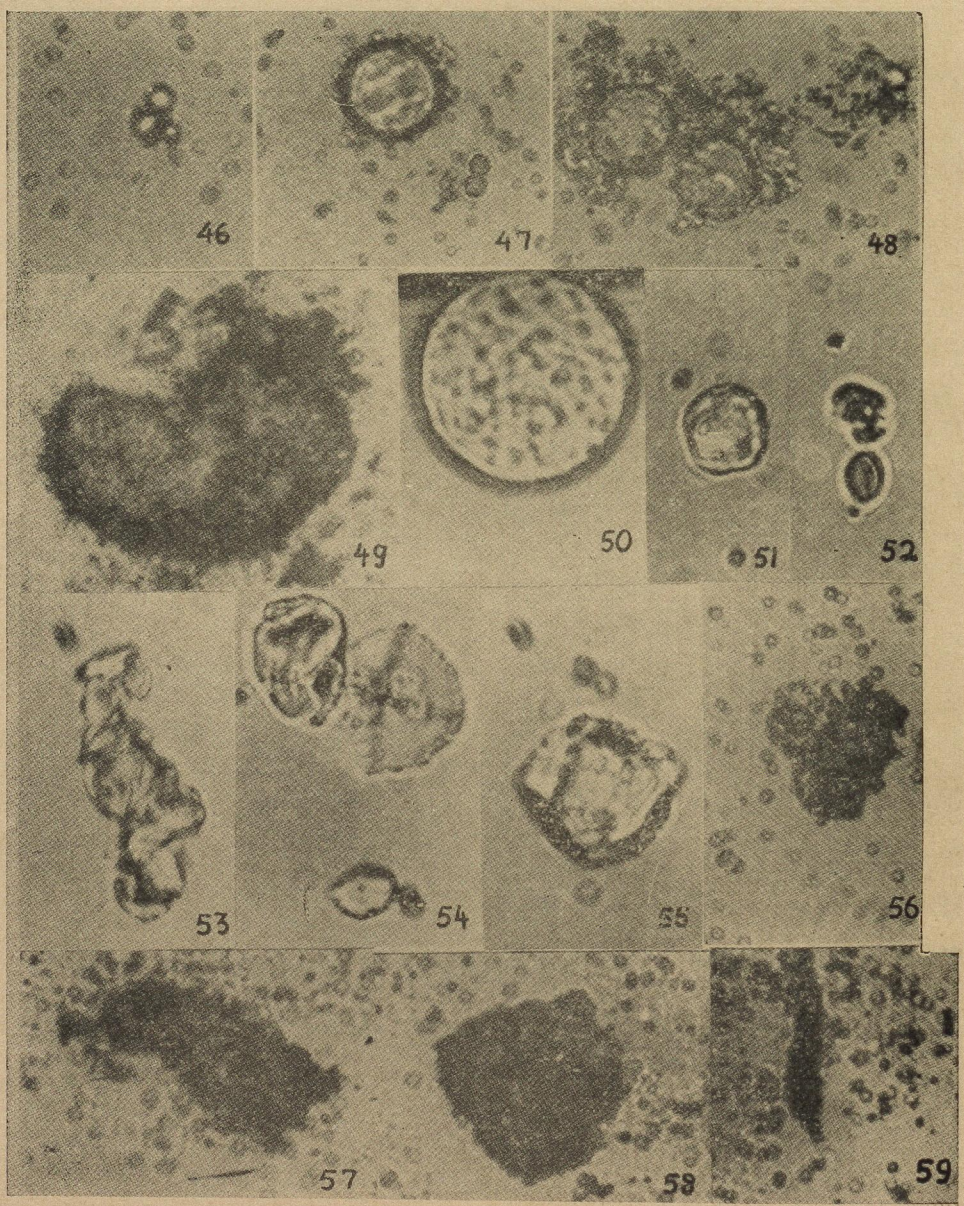
1. Pauling, L., Preface to *How Life began by Irving Adler* (1957); available also as Signet Key Book Ks 369 (1959).
2. Haldane, J.B.S., *New Biology* **16,** 12 (1954).
3. Bernal, J.D., Proceedings of the International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 40 (1959)
4. Konikova, A. S., Proceedings of the International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 116 (1959).
5. Vernadski, V.I., *Izbrannya Sochineniya*, Vol I, Moscow (1954).
6. Horowitz, N.H., Proceedings of the International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 106 (1959).
7. Pirie, N.W., Proceedings of the International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 118 (1959).
8. Firsoff, V.A., *Life Beyond the Earth*, Hutchinson, 3 (1963).
9. Shapley, H., 'On climate and Life', *Climatic Change* (A symposium edited by H. Shapley), Harvard University Press (1953).
10. Jones, H.S., *Life on Other Worlds*, English Universities Press, London (1940).
11. Oparin, A., & Fessenkov, V., *Le Vie dans l' Univers*, Editions en Langues Estrangeres, Moscow (1958).
12. Gatland, K.W., & Dempster, D.D., *The Inhabited Universe*, Wingate, London (1957); also available as Premier Book 2nd reprint (1963).
13. *Man and the Planets*, Sidgwick and Jackson, London (1954); in U.S.A. the book is sold under the title *Exploring Mars*.
14. Firsoff, V.A., *Life Beyond the Earth*, Hutchinson, 106-145 (1963).
15. Strughold, H., *The Green and Red Planet*, Sidgwick and Jackson, London (1954).
16. Tikhov, G.A., *Jour. of the British Astrono. Assoc.*, **65** (5), 193-204 (1955).
17. *New Scientist*, **9** (228), 810-811 (1961).
18. Firsoff, V.A., *Life Beyond the Earth*, Hutchinson 93 (1963).
19. Postgate, J., *New Biology*, 17 (1957).
20. *The Times*, 'Life in another part of the universe' 17 March (1961).
21. See reference 9.
22. Pirie, N.W., *New Biology*, Penguin Books, **16,** 41-53 (1954).
23. Kuiper G., et al., *The Atmospheres of the Earth and Planets*, 2nd edition, University of Chicago Press (1952).

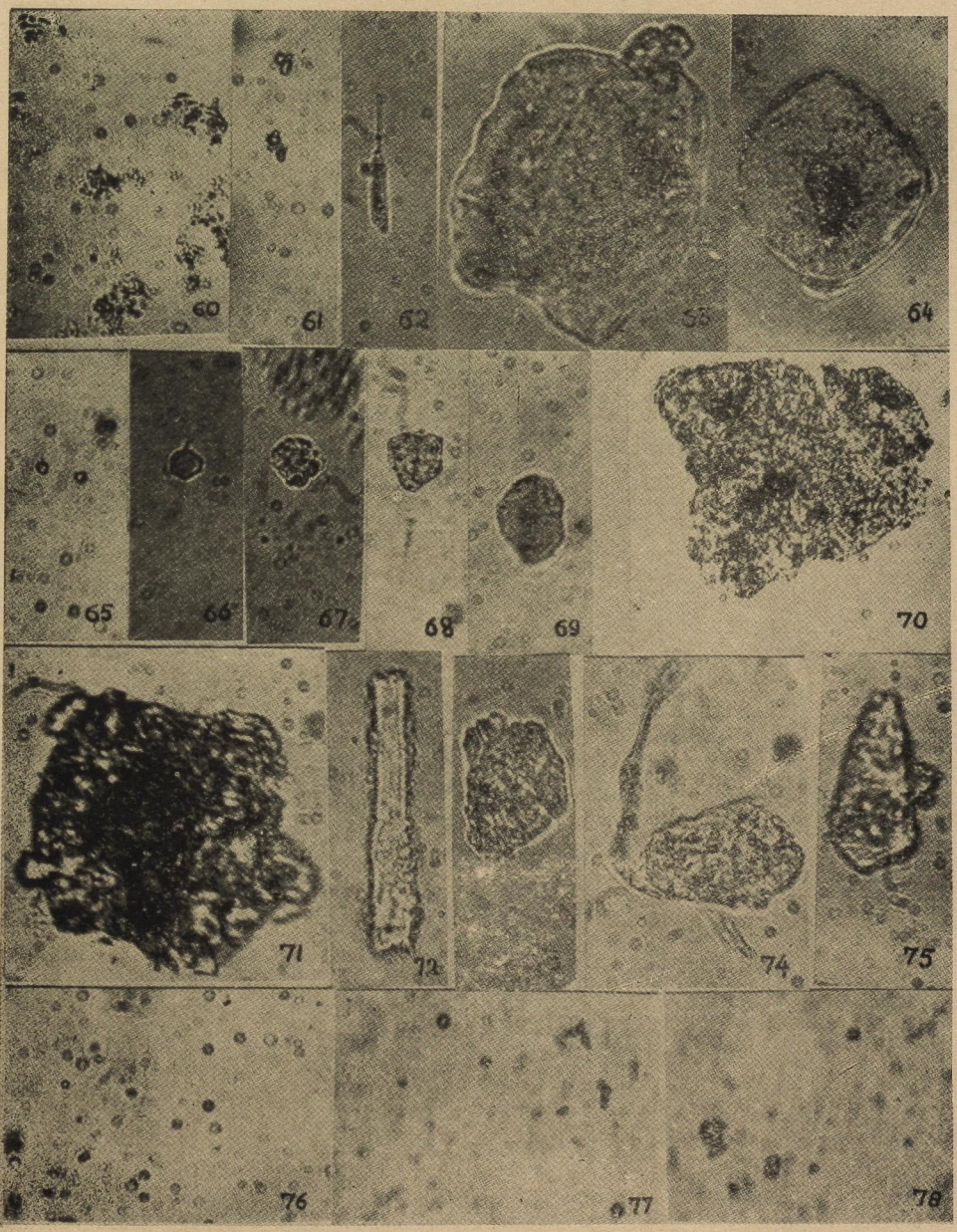
24. Fogg, G.E., Blue-green algae, *New Biology*, **5** (1948).
25. Haldane, J.B.S., *New Biology*, **16,** 12-27 (1954).
26. Firsoff, V.A., *Life Beyond the Earth*, Hutchinson, 61-62 (1963).
27. Gatland, K. W., & Dempster, D. D., *The Inhabited Universe*, Premier Book, 2nd reprint, 84 (1963); Wingate, London (1957).
28. Coleman, J.A., *Modern Theories of the Universe*, Signet Books (1963).
29. Lwoff, A., *L'evolution physiologique, etules des pertes des functions chez les micro organisms*, Paris (1943).
30. See Proceedings International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press (1959).
31. Traube, M., *Zbl. med. Wiss.*, **95**, 609 (1864); **97**, 113 (1866); *Arch physiol*, **87**, 129 (1867).
32. Butschli, O., *Untersuchungen uber microscopische Schaume und das Protoplasma*, Leipig (1892).
33. Rhumbler, L., *Ergebn. Anat. Entwichklungsgesch*, 15 (1906).
34. Leduc, S., *Lee bases physiques de la vie*, Paris (1907).
35. Bosse, G., *From inanimate to animate*, Vologda (1925) (Russian).
36. Kuckuck, *Losung des Problems der Urzeugung*, Leipzig (1907).
37. Oparin, A. I., *et al., Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R.*, **104,** 581 (1955).
38. Oparin, A.I., Proceedings International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 425-436 (1959).
39. Fox, S. W., *Science*, **129,** 1221-1223 (1959).
40. Fox, S.W., *Science*, **132,** 200-208 (1960).
41. Oparin, A.I., *Life: Its Nature, Origin and Development*, Oliver and Boyd, Edinburgh (1961).
42. Fox, S.W., & Yuyama, S., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **108,** 487-494 (1963).
43. Bungenberg D. Jong, H.G., In *Colloid Science* (Ed.H.R. Kruyt), Elsevier, **II,** 433-482 (1949).
44. Fox, S W., & Yuyama, S., *Jour. of Bacteriology*, **85,** 279-283 (1963).
45. Fox, S. W., & Yuyama, S., *Comparative Biochemistry and Physiology*, **11,** 317-321 (1964).
46. Perti, O. N., *Agra University J. Research (Sci.)*, **XII** (Part II); 1-48 (1963).
47. Jordan, P., *Phys. Z.*, **39,** 711 (1938).
48. Jordan, P., *Z. Phys.*, **113,** 431 (1939).
49. Jordan, P., *Fundam. radiol.*, **5,** 43 (1939).
50. Jordan, P., *Immun. Forsch.*, **97,** 330 (1940).
51. Pauling, L., *et al, Science*, **92,** 77 (1940).
52. Bahadur, K., & Verma, H. C., *Cytologia*, **23,** No. I, 9-13 (1958); *Zentb.f.Bakt.*, II, **112,** 34-37 (1958); *ibid.*, II, **111,** 405-409 (1958); *Vigyan Parishad Anusandhan Patrika*, **3,** Part 2, 163-168 (1959); *Zentb. f. Bakt.*, II, **113,** 511-514 (1960).
53. Verma, H.C., Studies in mineral intake of yeast cells, *D.Phil. Thesis*, University of Allahabad, India (1963).
54. Bahadur, K., *et al., Vigyan Parishad Anusandhan Patrika*, **6,** 94-117 (1963).
55. Bahadur, K., *et al., Zbt. Bakt.*, **117**, 567-602 (1964); **118,** 671-694 (1964).
56. Briggs, M.H., 'Experiments on the origin of cells', under publication in *Journal of British Interplanetary Society*. See also M.H. Briggs: "The formation of cell-like structures by the action of light on a possible primitive earth hydrosphere" communicated to 4th International Congress on Photobiology held at Oxford on July 28, 1964.
57. Dillon, L.S., *Evolution*, **16,** 102 (1962).
58. Pirie, N.W., *New Biology*, **16,** 41 (1954).
59. Bernal, J.D., Proceedings of the International Symposium on *The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, 40 (1959).
60. Pattee, H.H., *Biophysical, J.*, **1,** No. 8, 683-710 (1961).
61. Kalinenko V.O., *Microbiology (Russian)*, **XXXIII,** No. 2, 356-363 (1964).
62. Reich, W., The Discovery of Orgone (Orgone Institute Press, New York, (1948).

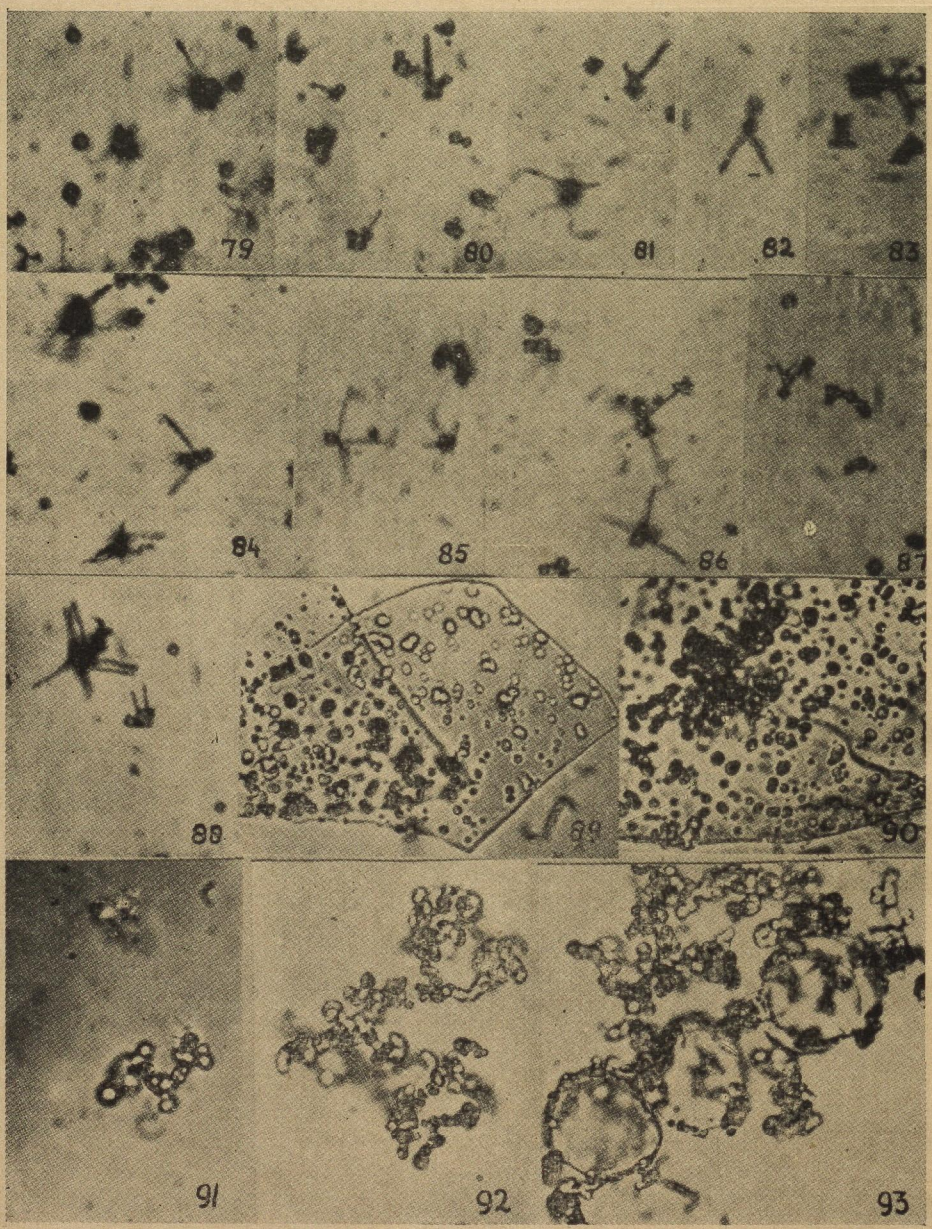

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

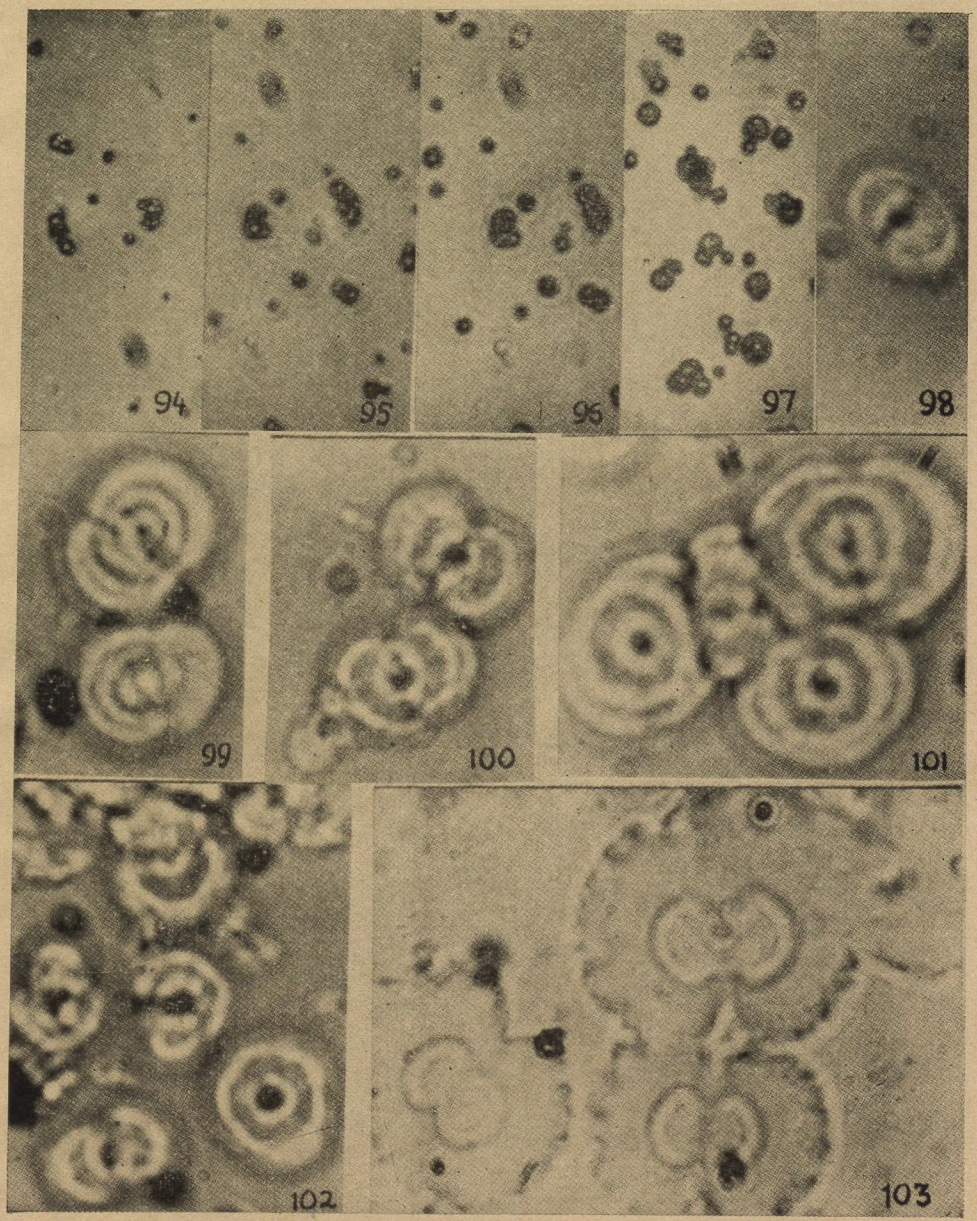

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

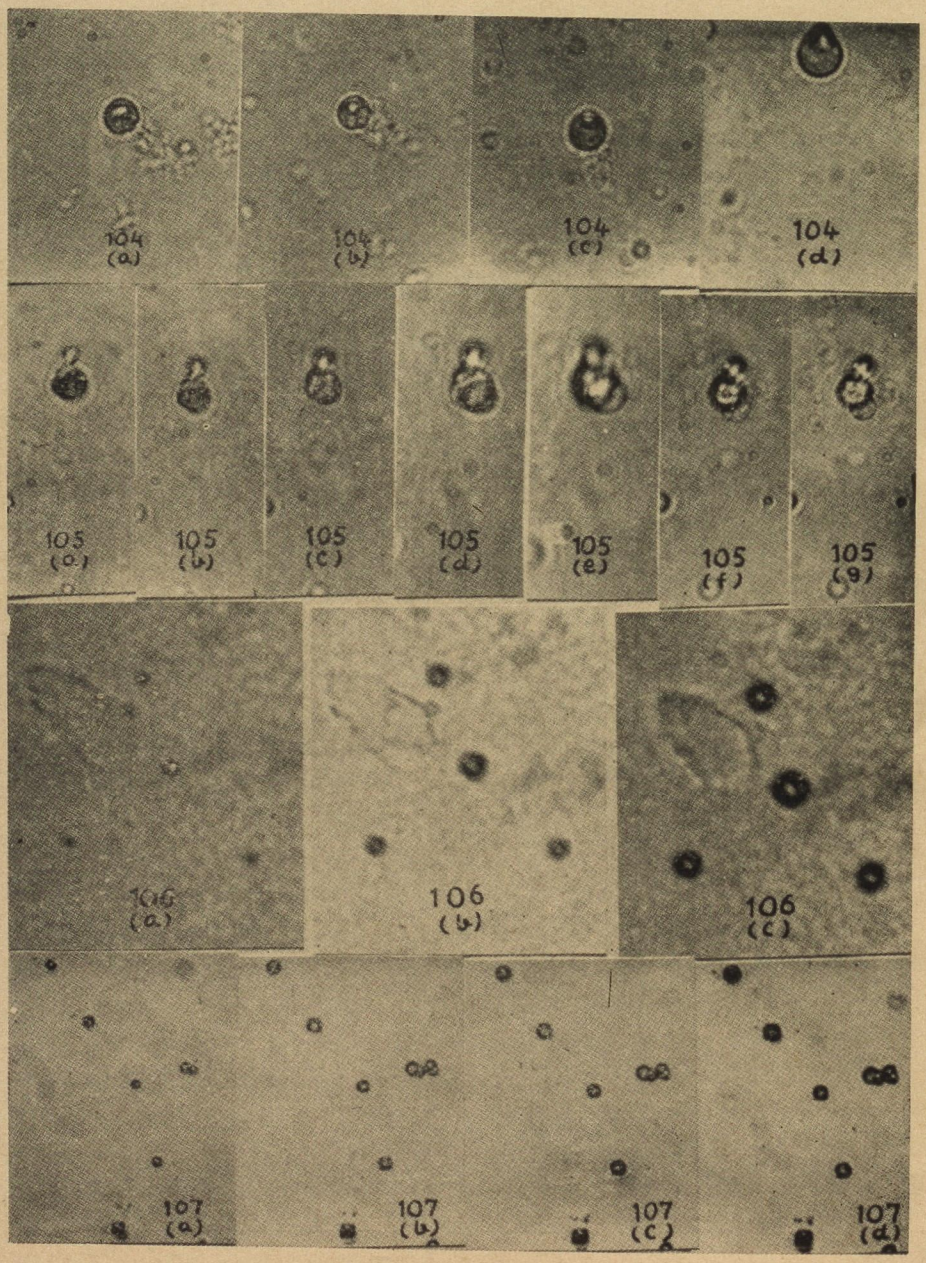

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

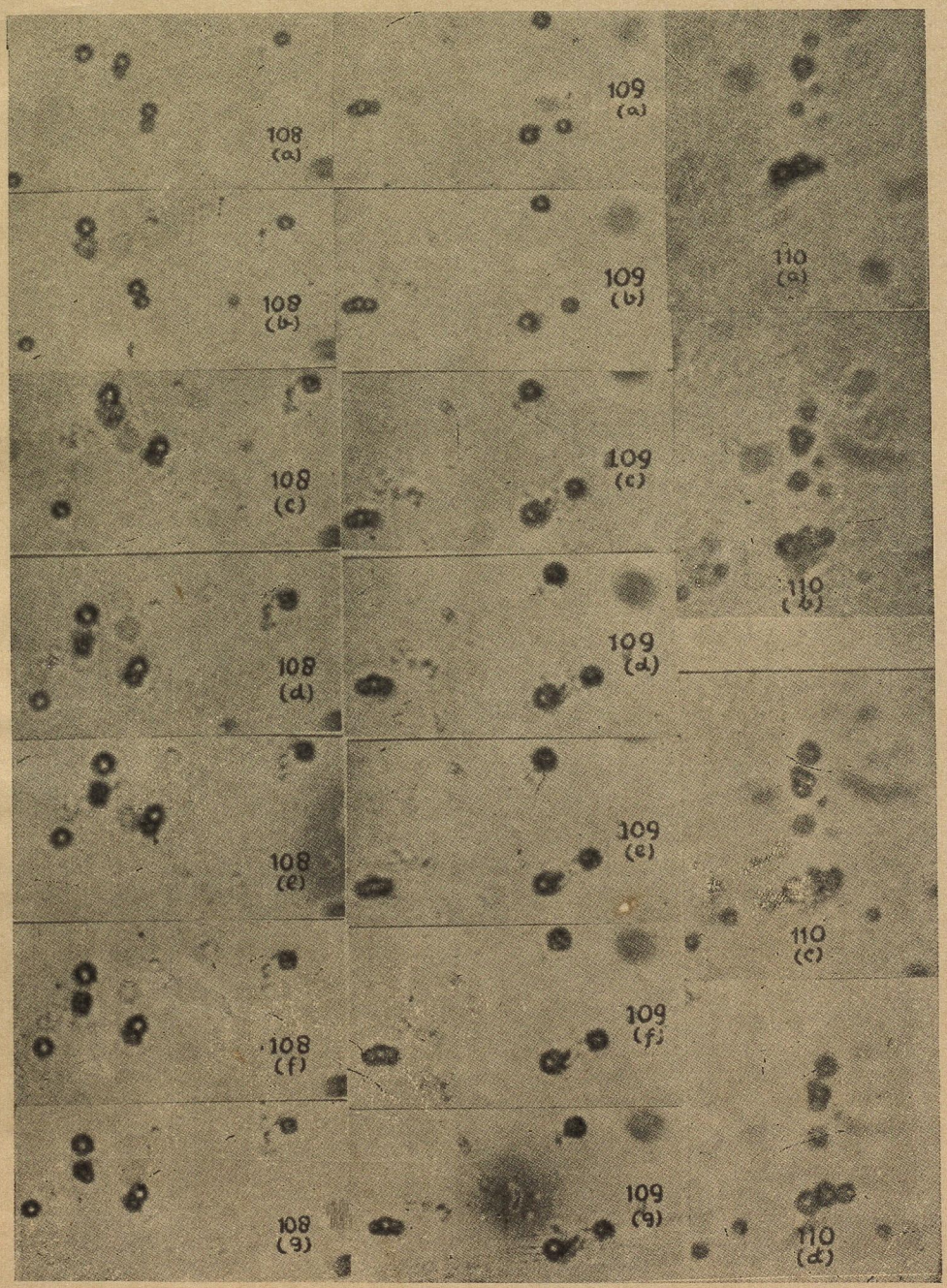

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

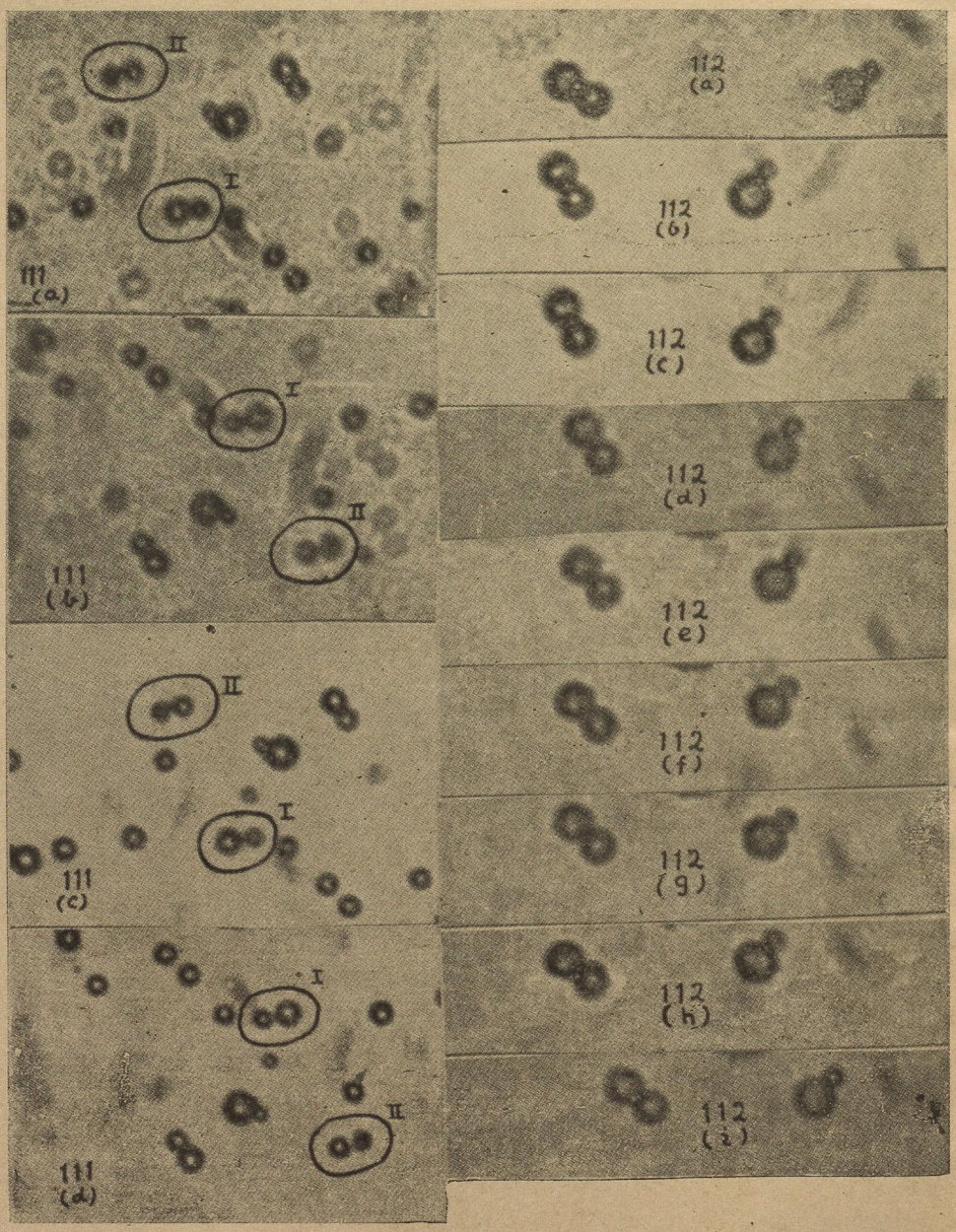

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
74
75
76
77
78


79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93


94
95
96
97
98
99
100
101
102
103


104 (a)
104 (b)
104 (c)
104 (d)
105 (a)
105 (b)
105 (c)
105 (d)
105 (e)
105 (f)
105 (g)
106 (a)
106 (b)
106 (c)
107 (a)
107 (b)
107 (c)
107 (d)


108 (a)
109 (a)
110 (a)
108 (b)
109 (b)
108 (c)
109 (c)
110 (b)
108 (d)
109 (d)
108 (e)
109 (e)
110 (c)
108 (f)
109 (f)
108 (g)
109 (g)
110 (d)


II
I
111 (a)
I
II
111 (b)
II
I
111 (c)
I
II
111 (d)
112 (a)
112 (b)
112 (c)
112 (d)
112 (e)
112 (f)
112 (g)
112 (h)
112 (i)

पैराफार्मेल्डीहाइड तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त विसंक्रमित जलीय मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा कृष्ण मुरारी लाल अग्रवाल

रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

१९६५, भाग ८, संख्या २, पृ० ७१-८२ से पुनर्मुद्रित

Photochemical fixation of nitrogen in sterilized aqueous mixtures containing paraformaldehyde and inorganic catalysts

By

K. Bahadur and K. M. L. Agrawal, Chemical Laboratories,

Dept. of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1965, Vol. 8, No. 2, Pages 71-82

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका
१९६५, ८, ७१-८२

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1965, 8, 71-82

पेराफार्मेल्डीहाइड तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त विसंक्रमित जलीय मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

कृष्ण बहादुर तथा कृष्ण मुरारी लाल अग्रवाल
रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—अप्रैल 2, 1965]

सारांश

कार्बन स्रोत के रूप में पैराफार्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरकों के रूप में मोलिब्डिनम, आयरन, वेनेडियम, निकेल तथा कोबाल्ट के कलिलीय ऑक्साइड युक्त, विसंक्रमित जलीय मिश्रण, 400 घंटे तक सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये। समरूप मिश्रणों को, चार बार तह किये हुए मोटे काले कपडे से लपेट कर, सूर्य के प्रकाश में रक्खे हुए मिश्रणों के पास रक्खा गया। कलिलीय मोलिब्डिनम आक्साइड युक्त मिश्रण ने सबसे अधिक नाइट्रोजन का स्थिरीकरण 60मि०लि० में 0·5400 मि० ग्राम प्रदर्शित किया। सूर्य के प्रकाश में रक्खे हुए मिश्रण में, प्रोलीन, एलानीन तथा सिरीन का प्रकाश-संश्लेषण हुआ। अंधकार में रक्खे गये समरूपी मिश्रणों में, सूक्ष्म मात्रा में एलानीन तथा सिरीन पाये गये। इन उत्प्रेरकों का नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर उत्प्रेरकीय प्रभाव का निम्न क्रम देखा गया :

$$Mo > Co > V > Ni$$

कलिलीय फेरिक ऑक्साइड उत्प्रेरक से युक्त मिश्रण ने, कथित समय तक प्रकाश में रखे रहने पर नाइट्रोजन का सांख्यिकीय रूप से उपेक्ष्य स्थिरीकरण प्रदर्शित किया।

Abstract

Photochemical fixation of nitrogen in sterilized aqueous mixtures containing paraformaldehyde and inorganic catalysts. *By* K. Bahadur and K. M. L. Agrawal, Chemical Laboratories, Dept. of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad.

Sterilised aqueous mixtures containing paraformaldehyde as the source of carbon and colloidal oxides of molybdenum, iron, vanadium, nickel and cobalt as catalysts were exposed to sunlight for 400 hours. Similar mixtures were covered with four-folds of thick black cloth and these mixtures were kept near the exposed mixtures. The mixture containing colloidal molybdenum oxide catalyst showed maximum fixation of 0·5400 mg. of nitrogen in 60 ml. of the mixture. Photosynthesis

of proline, alanine and serine was recorded in the mixtures exposed to sunlight. Similar mixtures kept in dark indicated the presence of traces of alanine and serine only. The catalytic influence of these metallic ions on photochemical fixation of nitrogen was observed in the following order :

$$Mo > Co > V > Ni$$

The mixture containing colloidal ferric oxide catalyst showed statistically insignificant fixation of nitrogen after the said period of exposure to sunlight.

पौधों के लिए नाइट्रोजन एक महत्वपूर्ण पोषक तत्व है और इस प्रकार, प्रत्यक्ष अथवा अप्रत्यक्ष रूप से यह सभी प्राणियों के लिए जिनमें मनुष्य भी सम्मिलित है, अत्यावश्यक है। मिट्टी में इसकी सामान्य कमी ने, नाइट्रोजन स्थिरीकरण की व्यापारिक विधियों के विकास के लिए समस्त संसार के वैज्ञानिकों का ध्यान आकर्षित किया है। नाइट्रोजन के जीव-वैज्ञानिक तथा प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर इन विधियों द्वारा नाइट्रोजन का यथेष्ट स्थिरीकरण प्राप्त करने की दशाओं की खोज के लिए सर्वत्र विस्तृत अध्ययन हो रहा है।

प्रस्तुत लेख में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर आयरन, कोबाल्ट, वेनेडियम, मोलिब्डनम तथा निकेल के कलिलीय आक्साइडों के प्रभाव का अनुसंधान किया गया है। अध्ययन के लिए कार्बन स्रोत के रूप में पैराफॉर्मेल्डीहाइड की उपयोग किया गया। बहादुर, रंगानायकी तथा सान्तामेरिया[1] ने यह प्रेक्षण किया कि पैराफार्मेल्डीहाइड, पानी तथा कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड के विसंक्रमित विलयन को कृत्रिम प्रकाश में रखने पर उनमें कुछ एमीनो अम्ल बनते हैं। स्थिरीकृत नाइट्रोजन से रहित इन मिश्रणों में, एमीनो अम्लों का बनना, मिश्रण में नाइट्रोजन का स्थिरीकरण सूचित करता है।

फार्मेल्डीहाइड का प्रकाश-संश्लेषण अनेक कार्यकर्ताओं ने सूचित किया है [2–5]। उत्प्रेरकों की उपस्थिति अथवा अनुपस्थिति में, कार्बोनिक अम्ल तथा बाइकार्बोनेटों को प्रकाश में रखने पर उन्होंने फॉर्मेल्डीहाइड प्राप्त किया। तथापि कुछ लेखकों ने इसके विपरीत नकारात्मक परिणाम प्राप्त किये हैं [6–9]। वर्षा के जल में भी फॉर्मेल्डीहाइड की पहचान की गई है और यह सम्भवतः वायुमंडल में प्रकाश-संश्लेषण द्वारा बनता है [10]। अभी हाल में पौधों के उचित तथा स्वस्थ विकास के लिए सूक्ष्म तत्वों जैसे निकेल, ताँबा, कोबाल्ट, मोलिब्डिनम, लोहा, वेनेडियम आदि की थोड़ी मात्रा का मिट्टी में विद्यमान होना आवश्यक माना गया है [11–15]। म्यूलेन ने इस तथ्य की ओर ध्यान आकर्षित किया है कि कम उपजाऊ मिट्टी की अपेक्षा अधिक उपजाऊ मिट्टी में, मोलिब्डिनम की मात्रा अधिक होती है। एज़ोटोबैक्टर तथा रीज़ोबिया द्वारा नाइट्रोजन स्थिरीकरण के लिए लीपर ने [17] मोलिब्डिनम को आवश्यक माना है। बैरट्रैण्ड [18] ने मिट्टी में वेनेडियम की मात्रा 3.1 से 6.8 अंश प्रति दशलक्ष तक सूचित की है। भारत में अनाजों की अनेकों जातियों में वेनेडियम की पहचान वर्णक्रम मापन द्वारा की गई है।[19] इस लेख में, सूक्ष्म तत्वों का नाइट्रोजन के स्थिरीकरण पर प्रभाव का अध्ययन किया गया है।

प्रयोगात्मक

उत्प्रेरक के रूप में प्रयुक्त कलिलीय विलयनों का बनाना

1. फेरिक ऑक्साइड कलिल बनाना [20]—फेरिक क्लोराइड का सान्द्र विलयन बूँद-बूँद करके, उबलते हुए पानी में डाला गया। फलस्वरूप प्राप्त लाल रंग के कलिल को 7 दिन तक अपोहित किया गया।

2. मोलिब्डिनम ऑक्साइड कलिल बनाना [21]—पोटैसियम मोलिब्डेड के 5 प्रतिशत विलयन में, हाइड्रोक्लोरिक अम्ल का सान्द्र विलयन लगातार विलोडन के साथ, बूँद-बूँद करके तब तक मिलाया गया जब तक कि यह कुछ अधिकता में न हो जाये। फिर इसे 15 दिन तक अपोहित किया गया।

3. निकेल ऑक्साइड कलिल बनाना [22]—निकेल टार्टरेट के तनु विलयन में, 0.1 N कास्टिक सोडा का विलयन मिलाने से निकेल ऑक्साइड कलिल प्राप्त किया गया। इस प्रकार प्राप्त कलिल को 15 दिन तक अपोहित किया गया तो यह नाइट्रोजनीय अपद्रव्यों से रहित हो सका।

4. कोबाल्ट ऑक्साइड कलिल बनाना [23]— 1 ग्राम अणु कोबाल्टस क्लोराइड तथा 2 ग्राम अणु कास्टिक सोडा को परस्पर मिलाने पर कोबाल्टस हाइड्राक्साइड प्राप्त हुआ। क्षार का आयतन इस प्रकार समंजित किया गया कि कोबाल्टस आयन कुछ अधिकता में बने रहें। सद्यः प्राप्त अवक्षेप को दो बार आसुत जल से धोने के बाद इसको पानी में आलम्बित करके उसमें कर्णातीत तरंगें प्रवाहित की गईं।

5. वेनेडियम पेण्टॉक्साइड कलिल बनाना [24]—एमोनियम वेनेडेट में लाल-भूरे उत्पाद प्राप्त होने तक, तनु हाइड्रोक्लोरिक अम्ल मिलाया गया। इस अवक्षेप को आसुत जल से तब तक धोया गया जब तक यह फिल्टर-पत्र से न निकलने लगा। इस प्रकार प्राप्त वेनेडियम के कलिलीय आक्साइड को नाइट्रोजन के अपद्रव्यों से रहित करने के लिए 30 दिन तक अपोहित किया गया।

150 मि० लि० के शंकु फ्लास्कों (सिगकॉल) में A, B तथा C सेटों के लिए 9 मिश्रण बनाये गये जिनमें प्रत्येक का संघटन निम्न प्रकार था :—

(A) 0.40 ग्राम पैराफार्मेल्डीहाइड, 5 मि० लि० कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड तथा 55 मि० लि० आसवित जल

(B) 0.40 ग्राम पैराफार्मेल्डीहाइड, 5 मि० लि० कलिलीय आयरन ऑक्साइड तथा 55 मि० लि० आसवित जल

(C) 0.40 ग्राम पैराफार्मेल्डीहाइड 5 मि०लि० कलिलीय वेनेडियम ऑक्साइड तथा 55मि० लि० आसवित जल।

इसी प्रकार सेट D तथा E के लिए 11 मिश्रण बनाये गये जिनका संघटन नीचे दिया गया है :

(D) 0.80ग्राम पैराफार्मेल्डीहाइड, 10 मि० लि० कलिलीय निकेल ऑक्साइड तथा 90 मि० लि० आसवित जल।

(D) 0.80 ग्राम पैराफार्मेल्डीहाइड 10 मि० लि० कलिलीय कोबाल्ट ऑक्साइड तथा 90 मि० लि० आसवित जल।

इन मिश्रणों से युक्त फ्लास्कों में शल्य रुई की ढाठ लगाई गई। एक ऑटोक्लेव में 15 पौण्ड दाब के अन्दर मिश्रणों को 30 मिनट तक विसंक्रमित किया गया। ठंडे होने पर इन फ्लास्कों के मुँह पर पॉलीथीन का कागज तथा चिपकने वाला फीता लपेटा गया।

A, B तथा C सेट में से प्रत्येक से 4 मिश्रण तथा D तथा E के प्रत्येक से 5 मिश्रण, सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये। मिश्रणों की इतनी ही संख्या को चार बार तह किये गये काल कपड़े से लपेटकर प्रकाश में रखे गये मिश्रणों के पास रक्खा गया। प्रत्येक सेट के एक मिश्रण को नियन्त्रित अवस्था में रक्खा गया।

मिश्रणों को सूर्य के प्रकाश में प्रतिदिन 7 घंटे के लिए रक्खा गया और शेष समय के लिए दिन के विसरित प्रकाश तथा रात के अंधकार में रक्खा गया। उस अवधि की गणना की गई जिसमें मिश्रण प्रकाश में रक्खे गये थे।

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे रखने के बाद, मिश्रणों का विश्लेषण किया गया। प्रकाश में रखे गये तथा अंधकार में रक्खे मिश्रणों में केल्डाल की उपसूक्ष्म विधि[25] द्वारा नाइट्रोजन का परिमापन किया गया। इस विधि द्वारा नाइट्रोजन के परिमापन के लिए प्रयुक्त सभी रसायनों में से नाइट्रोजननीय अपद्रव्यों की अन्तिम लेशमात्र दूर करने के लिए उन्हें कई बार पुनर्क्रिस्टलीकरण द्वारा शुद्ध किया।

इन मिश्रणों में प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा संश्लेषित एमीनो अम्लों को वर्णलेखीय विधि द्वारा पहचाना गया।

परिणामों की गणना सांख्यिकीय रूप से की गई।

सारणी 1

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के बाद, कार्बन स्रोत के रूप में पेराफॉर्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश रासायनिक स्थिरीकरण

क्रमांक	अवस्था	मिश्रण में बने ऐमोनिया के लिए N/48·5 सल्फ़्यूरिक अम्ल की आवश्यक मात्रा (मिली०)	सांख्यिकीय मध्यमान	मिश्रण के 60 मिली० में उपस्थित नाइट्रोजन की मात्रा (मिग्रा०)	पहचाने गये एमीनो अम्ल
1	प्रकाश	4·0			
2		4·1			प्रोलीन
3		4·3	4·050.	1·1664	एलानीन
4		4·8	± 0·1041	± 0·0299	सिरीन
5	अंधकार	2·4			
6		2.2	2·175	0·6264	एलानीन
7		2.0	± 0·0854	± 0·0246	सिरीन
8		2.1			
9	नियंत्रित	2.0	—	0·5760	×

टिप्पणी—(क) मिश्रण के 60 मि० लि० में स्थिरीकृत नाइट्रोजन = 0·5400 मि० ग्राम.

(ख) सार्थकता गुणनखंड $3(a^2+b^2)^{1/2}$ जहाँ a तथा b सांख्यिकीय त्रुटियां हैं, — 0.4041 औसत अनुमापानांक के अन्तर 1·875 से कम हैं, अतः फल सांख्यिकीयतः सार्थक हैं।

(ग) सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों में प्रोलीन, एलानीन तथा सिरीन बनते हैं। अँधेरे में रक्खे समरूप मिश्रणों में केवल सूक्ष्म मात्रा में एलानीन तथा सिरीन बनते हैं। सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों द्वारा प्राप्त वलयों की तीव्रता, अँधेरे में रक्खे गये मिश्रणों से कहीं अधिक है। इससे प्रदर्शित होता है कि सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों में अँधेरे में रक्खे मिश्रणों की अपेक्षा, एमीनो अम्लों की सान्द्रता अधिक है। व्यक्तिगत एमीनो अम्लों के वलयों की तीव्रता का क्रम निम्न है :

प्रकाश में—सिरीन > प्रोलीन > एलानीन

अंधकार में—सिरीन > एलानीन

सारणी 2

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के बाद कार्बन स्रोत के रूप में पेराफॉर्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय वेनेडियम पेण्टॉक्साइड से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश रासायनिक स्थिरीकरण

क्रमांक	अवस्था	मिश्रण में बने एमोनिया के लिये N/52·5 सल्फ्यूरिक मात्रा की आवश्यक मात्रा (मिली०)	सांख्यिकीय मध्यमान	मिश्रण के 60 मिली० में उपस्थित नाइट्रोजन की मात्रा (मिग्रा०)	पहचाने गये एमीनो अम्ल
1	प्रकाश	2·16	2·20 ± 0·0141	0·5852 ± 0·0037	एस्पार्टिक अम्ल
2		2·20			
3		2·22			
4		2·22			
5	अंधकार	1·68	1·67 ± 0·0122	0·4442 ± 0·0033	×
6		1·65			
7		1·70			
8		1·65			
9	नियंत्रित	1·63	—	0·4335	×

टिप्पणी—(क) मिश्रण के 60 मि० लि० में प्रकाश द्वारा स्थिरीकृत नाइट्रोजन = 0·1410 मि० ग्राम

(ख) सांख्यिकीय सार्थकता गुणनखंड 0·0574, औसत अनुमापनांक के अन्तर 0·53 से कम है अतः फल सांख्यिकीयतः सार्थक है।

(ग) सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रण में एस्पार्टिक अम्ल पाया जाता है। अंधकार में रक्खे गये समरूप मिश्रण एमीनो अम्लों की अनुपस्थिति सूचित करता है।

सारणी 3

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के बाद कार्बन स्रोत के रूप में पैराफॉर्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय फेरिक ऑक्साइड से मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

क्रमांक	अवस्था	मिश्रण में बने एमोनिया के लिये N/48·5 सल्फ्यूरिक अम्ल की आवश्यक मात्रा (मिली०)	सांख्यिकीय मध्यमान	मिश्रण के 60 मिली० में उपस्थित नाइट्रोजन की मात्रा (मिग्रा०)	पहचाने गये एमीनो अम्ल
1	प्रकाश	23·6			
2		23·4	23·45	6·753	प्रोलीन
3		23·5	± 0·0416	± 0·0120	एलानीन
4		23·3			सिरीन
5	अंधकार	23·2			
6		23·3	23·325	6·717	प्रोलीन
7		23·6	± 0·0937	± 0·0269	सिरीन
8		23·2			
9	नियंत्रित	23·2	—		

टिप्पणी—(क) मिश्रण के 60 मि०लि० में प्रकाश द्वारा स्थिरीकृत नाइट्रोजन की मात्रा = 0·0360 मि 0ग्राम।

(ख) सांख्यिकीय सार्थकता गुणनखण्ड, 0·3078, औसत अनुमापनांक के अन्तर 0·125 से अधिक है अतः फल सांख्यिकीय रूप से निरर्थक है।

(ग) सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रण में, प्रोलीन, एलानीन तथा सिरीन बनते हैं। अंधेरे में रक्खा समरूप मिश्रण केवल सूक्ष्म मात्रा में प्रोलीन तथा सिरीन की उपस्थिति सूचित करता है।

सारणी 4

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के बाद, कार्बन स्रोत के रूप में पैराफॉर्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय कोबाल्ट ऑक्साइड से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

क्रमांक	अवस्था	मिश्रण में बने एमोनिया के लिये N/52·5 सल्फ्यूरिक अम्ल की आवश्यक मात्रा (मिली०)	सांख्यिकीय मध्यमान	मिश्रण के 100 मिली० में उपस्थित नाइट्रोजन की मात्रा (मिग्रा०)	पहचाने गये एमीनो अम्ल
1	प्रकाश	2·68	2·72 ± 0·0149	0·7254 ± 0·0038	अनुपस्थित
2		2·76			
3		2·76			
4		2·60			
5		2·80			
6	अंधकार	1·68	1·652 ± 0·0357	0·4405 ± 0·0095	अनुपस्थित
7		1·64			
8		1·60			
9		1·68			
10		1·66			
11	नियंत्रित	1·56	—	0·4159	अनुपस्थित

टिप्पणी—(क) मिश्रण के 100 मि० लि० में प्रकाश द्वारा स्थिरीकृत नाइट्रोजन की मात्रा = 0·2859 मि० ग्राम।

(ख) सांख्यिकीय सार्थकता गुणनखंड 0·1163, औसत अनुमापनांक के अन्तर 1·068 से कम है अतः फल सांख्यिकीयतः सार्थक है।

(ग) नाइट्रोजन की उपस्थित के लिये सूर्य के प्रकाश तथा अंधेरे में रक्खे गये दोनों ही मिश्रणों में ऋणात्मक फल प्राप्त हुए।

सारणी 5

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के पश्चात् कार्बन स्रोत के रूप में पैराफॉर्मेल्डीहाइड तथा उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय निकेल ऑक्साइड से युक्त मिश्रणों में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

क्रमांक	अवस्था	मिश्रण में बने एमोनिया के लिए N/52·5 सल्फ़्यूरिक अम्ल की आवश्यक मात्रा (मिली०)	सांख्यिकीय मध्यमान	100मिली० मिश्रण में उपस्थित नाइट्रोजन की मात्रा (मिग्रा०)	पहचाने गये एमीनो अम्ल
1	प्रकाश	2·84			
2		2·84	2·836	0·7563	आरनीथीन
3		2·88	± 0·0132	0·0035	(लेशमात्र)
4		2·80			
5		2·82			
6	अंधकार	2·06			
7		2·08	2.06	0·5494	
8		2·04	± 0.0089	± 0·0023	अनुपस्थित
9		2.04			
10		2.08			
11	नियंत्रित	2·00			अनुपस्थित

टिप्पणी—(क) मिश्रण के 100 मि० लि० में प्रकाश द्वारा स्थिरीकृत नाइट्रोजन की मात्रा = 0·2069 मि० ग्राम।

(ख) सांख्यिकीय सार्थकता गुणनखंड 0·0480, औसत अनुमापनांक के अन्तर 0·776 से कम है अतः फल सांख्यिकीयतः सार्थक है।

(ग) प्रकाश तथा काले कपड़े से लपेटे गये दोनों ही मिश्रण, एमीनो अम्लों के अनुरूप किसी भी स्पष्ट वलय की अनुपस्थिति सूचित करते हैं। तथापि, आरनीथीन के आर० एफ० मान के अनुरूप एक अत्यन्त हल्का वलय सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रण में देखा जाता है।

विवेचना

कार्बन के स्रोत के रूप में पैराफार्मेल्डीहाइड से युक्त जलीय विसंक्रमित मिश्रणों में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर मोलिब्डिनम, वेनेडियम, लोहा, कोबाल्ट तथा निकेल की कलिलीय ऑक्साइडों के उत्प्रेरकीय प्रभाव का अनुसन्धान किया गया है। नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण तथा एमीनो अम्ल के प्रकाश-संश्लेषण दोनों के लिये ही प्रस्तुत अध्ययन के सभी उत्प्रेरकों में, कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड सबसे अच्छा पाया गया। कलिलीय मोलिब्डिनम ऑक्साइड युक्त मिश्रण के 100 मिली० में 0·90 मि० ग्राम नाइट्रोजन स्थिर हुआ। सूर्य के प्रकाश में रक्खे गये मिश्रणों के वर्णलेखों में प्रोलीन तथा सिरीन के स्पष्ट वलय देखे गये। तथापि अंधेरे में रक्खे गये समरूप मिश्रणों में केवल एलानीन तथा सिरीन की उपस्थिति ही सूचित की। प्रेक्षण से इस तथ्य की पुष्टि होती है कि साधारणतः उपजाऊ मिट्टी में कम उपजाऊ मिट्टी की अपेक्षा, मोलिब्डिनम की मात्रा अधिक होती है।[16] सोरटेबर्ग ने खेत में एमोनियम मोलिब्डेट के प्रयोग से सलाद के पौधों की लब्धि में वृद्धि पाई[15]। ये परिणाम बहादुर तथा रंगानायकी[35] के प्रेक्षणों से भी समानता प्रदर्शित करते हैं कि विलयित कार्बन डाइऑक्साइड तथा मोलिब्डिनम ऑक्साइड से युक्त जलीय मिश्रणों में एमीनो अम्लों का संश्लेषण होता है।

जहाँ तक नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण पर इसके उत्प्रेरकीय प्रभाव का सम्बन्ध है, इस श्रेणी में कोबाल्ट ऑक्साइड मोलिब्डिनम ऑक्साइड के बाद आता है। इस प्रकार जब कलिलीय कोबाल्ट ऑक्साइड उत्प्रेरक के रूप में प्रयोग किया जाता है तो 100 मिली० मिश्रण में 0·2849 मि० ग्राम नाइट्रोजन स्थिर होता है। यह उत्प्रेरक एमीनो अम्लों के संश्लेषण में सहायक नहीं है। सम्भवतः इन मिश्रणों में अनुबन्धित नाइट्रोजन एमीनो अम्लों के रूप में न होकर किसी और रूप में है। ये परिणाम इस तथ्य से समानता दिखाते हैं कि फसल तथा पौधों के उचित तथा स्वस्थ विकास के लिए थोड़ी मात्रा में कोबाल्ट का होना आवश्यक है यद्यपि इसका वास्तविक कार्य अज्ञात है।

मिश्रणों में नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण में वेनेडियम तथा निकेल के कलिलीय ऑक्साइड भी अच्छे उत्प्रेरक हैं। कलिलीय वेनेडियम तथा निकेल ऑक्साइडों से युक्त मिश्रणों में क्रमशः 0·2350 तथा 0.2069 मिग्रा० नाइट्रोजन स्थिर हुई। कलिलीय वेनेडियम ऑक्साइड युक्त मिश्रण को, सूर्य के प्रकाश में रखने पर इसमें एस्पार्टिक अम्ल की यथेष्ट मात्रा बनी। काले कपड़े से लपेट कर रक्खे गये मिश्रण में नकारात्मक परिणाम मिला। कलिलीय निकेल ऑक्साइड युक्त मिश्रण, केवल ऑरनीथीन की सूक्ष्म मात्रा का प्रकाश-संश्लेषण सूचित करता है। फसल पैदा करने के लिये आवश्यक मुख्य तत्वों, जैसे, पोटैशियम, कैल्सियम, फॉस्फोरस, क्लोरीन, गंधक नाइट्रोजन आदि में ये तत्व भी सम्मिलित किये जाते हैं। म्योर ने सूचित किया है कि यद्यपि भू-पटल में वेनेडियम तथा निकेल की उपस्थिति लगभग बराबर ही है, निकेल अधिक विस्तृत रूप से वितरित है[36] कुछ फफूँदियों के लिये वेनेडियम की सूक्ष्म मात्रा भी आवश्यक है[37]। खेतों में, नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण के साथ, इन धातुओं का कार्य भी सम्बद्ध है।

सूर्य के प्रकाश में 400 घंटे तक रखने के बाद उत्प्रेरक के रूप में कलिलीय फेरिक आक्साइड युक्त मिश्रण, नाइट्रोजन के स्थिरीकरण को सांख्यिकीय रूप से निरर्थक प्रदर्शित करता है।

मिश्रण में, प्रोलीन एलानीन तथा सिरीन की सूक्ष्म मात्रा में ही प्रकाश-संश्लेषित होती है। काले कपड़े से लपेटे हुए मिश्रण में सूक्ष्म मात्रा में प्रोलीन तथा सिरीन बनते हैं।

नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक अनबन्धन में, इन उत्प्रेरकों की क्षमता का क्रम निम्न है :

$$Mo > Co > V > Ni > Fe$$

एमीनो अम्लों के प्रकाश-रासायनिक रूप से बनने में इन आयनों का उत्प्रेरकीय प्रभाव का क्रम निम्न है :

$$Mo > Fe > V > Ni$$

निर्देश

1. बहादुर, के०, रंगानायकी, एस० तथा सान्तामेरिया, एल०। — **नेचर, लन्दन,** 1958, 182, 1668।
2. यूशर तथा प्रीस्टले। — **प्रोसी० रायल सोसा०** 1911, B 84; 101।
3. बेली, हेलीब्रॉन तथा बारकर। — **जर्न० केमी० सोसा०,** 1921, **119,** 1025।
4. धर तथा सहयोगी। — **जर्न० फिजी० केमि०,** 1925, **29,** 926; 1931, **35,** 1418, 1932, **36,** 567।
5. मेजड्रोली तथा सहयोगी। — **एटी० एके० लिंसी,** 1927, **6,** 160।
6. सूक्र। — **जर्न० अमे० केमि० सोसा०,** 1923, **45,** 1148।
7. बौर तथा रहमान। — **हेल० किम० एक्टा०,** 1922, **5,** 938।
8. इनर्सन, जे०। — **जनरल फिजियोलोजी,** 1929. **13,** 163।
9. शीले। — **जर्न० अमे० केमि० सोसा०,** 1932, **54,** 937।
10. रसेल, ई० जे०। — अध्यक्षपदीय भाषण, ब्रिटिश एसो० नेचर में सूचित, 1949 भाग 164, 417, 597।
11. बियर, एफ० ई० तथा किचेन, एच०बी०। — **सॉयल साइंस,** 1945, **60,** 1-189।

बीसन, के० सी०। — **यु० एस० डिपार्टमेंट एग्रो० इनफॉर्मेशन बुले०** 1950, 7।

13. सिन्हा, के० तथा कोडेटा, एफ०। **जर्न० सांइस सॉयल मेन्योर, जापान,** 1952, **22,** 310-12।

14. बरशद, आई०। **सॉयल** साइंस 1951, **71,** 297-313।

15. सोरटेबर्ग, ए०। Forskn. Fros. Landbr. 1954, **50,** 161-98।

16. टरम्यूलेन, एच०। Rec. Trav. Chem. Pays-bas, 1931, **50,** 491-504।

17. लीपर, सी० डब्ल्यू०। "Introduction to Soil Science" 1948, 188, संस्करण।

18. बरट्रैण्ड, डी०। **कैरैण्ड,** 1942, **212,** 1170।

19. बॉयड, टी० सी० तथा दे, एन० के०। **इंडि० जर्न० मेडि० रिसर्च०,** 1933, **20,** 789।

20. डेब्रे। **कौम्प्ट रैण्ड,** 1869, **68,** 914।

21. ग्रैह्म। **एन०** 1865, **135,** 65।

22. टॉवर तथा कुक। **जर्न० फिजी० केमि०,** 1922, **26,** 728।

23. पाण्डेय, ए० डी०। **डी० फिल, थीसिस,** इलाहाबाद विश्वविद्यालय, इलाहाबाद।

24. ब्लिट्ज डब्ल्यू०। **बैरे०,** 1904, **37,** 1098, 1170।

25. केल्डाल, जे० जेड०। **एना० केमि०,** 1883, **22,** 366।

26. गर्निंग, जे० डब्ल्यू०। **जेड० एना० केमि०,** 1889, **28,** 188।

27. ऑरनॉल्ड, सी०। **केमि० जेण्टर,** 1892, 1886, 337।

28. ऑरनॉल्ड, सी० तथा वेडेनमेयर, के०। **जेड एना० केमि०,** 1892, **31,** 525।

29. कोलथाफ, आई० एम० तथा स्टैन्जर, बी० ए०। Procedure of Volumetric Analysis. 1947 संस्करण, पृष्ठ 173।

30. मुअर, एच० सी०। **इंग इंग केमि०,** 1920, **12,** 669।

31. प्रिंस, ए० एल०। **जर्न० एसो० आफीसल० एग्री० केमि०,** 1925, 410।

32. गिरी, के० वी० तथा राव, एन० ए० एन०। **जर्न० इंडि० इंस्टी० साइंस,** 1952, **34,** 95।

33. गिरी, के० वी० तथा प्रसाद, ए० एल० एन० । **नेचर,** 1951, 158, 786।

34. कांसडेन, आर०, जारडिऑन ए० एच० तथा मार्टिन ए० जे० पी० । **बायोकेमि० जर्न०,** 1944, **38,** 224।

35. बहादुर, के०, तथा रंगानायकी, एस० । **यू० एस० एस० आर० एक०, साइंस,** 1957 नम्बर, 6 75405।

36. म्योर, सी० । **मेटालर्जिक,** 1943, **75** ।

37. ऑरनॉन, डी० आई० तथा वेसेल, जी० । **नेचर, लन्दन,** 1953, 172, 1039।

टेकनिकल प्रेस प्रा० लि०, प्रयाग

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

7 (2) : 86—92, 1965

Adaptability in Enzymes

KRISHNA BAHADUR and INDRA SAXENA

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad, India

biologia plantarum

PRAHA 1965

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

7 (2) : 86—92, 1965

Adaptability in Enzymes

KRISHNA BAHADUR and INDRA SAXENA

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad, India

Received August 20, 1964

Abstract: In studying inhibitors and activators of enzymes it has often been found that inhibitors act as activators when in very low concentrations and that certain activators (in suitable concentrations) show inhibition. Similar results were obtained in the present work in studying urease from soya bean in the presence of lead acetate. Lead acetate is normally an inhibitor of urease. It was found, however, that in small concentrations of lead acetate increase in the activity of urease occurs. On prolonging the time of the reaction inhibition develops and still later increased enzymatic activity again occurs. The results were elaborated statistically and are discussed in relation to the use of "adaptation" of urease in unfavourable conditions in reaction mixtures by the action of lead acetate.

Adaptability is one of the essential properties of life and so far this has not been observed in a non-living system, though modern computers do have a certain degree of the capacity of learning. The problem of origin of the property of adaptability thus still remains unsolved. It is interesting to investigate whether the adaptability originated only when some system became alive, or the property of adaptability is inherent in matter and is only best displayed in a system which is capable of duplication and which has its self-energy release system.

We have repeatedly observed that when enzymic reactions are studied in their natural environment, i.e. when the enzyme is not purified and made free from other proteinous matter with which it occurs in the tissue, it does retain a certain degree of adaptability. If the enzymes are studied under these conditions, it is a matter of common observation that the reactivity of the enzyme decreases with increased period of reaction and it has been explained to be due to the formation of inhibitors in the mixture (BAHADUR, CHANDRA 1961). However, we (BAHADUR, CHANDRA 1959) have found that this decrease in reactivity with increasing period of reaction is not uniform and the enzyme once or twice is reactivated before it finally loses all its enzymic property. Whatever may be the explanation for such activation after a definite decrease in activity, it certainly can be explained by the simple process of feed back, and it can definitely be called an effort of the enzyme to counteract the unfavourable conditions created by the inhibitory substances present in the field of enzymic reactions.

During our study of the inhibitors and activators of enzymes it has been repeatedly observed that an inhibitor acts as an activator when present in very small quantities, and in appropriate concentrations certain activators show inhibition. In case of inhibition after a certain period of lag the enzyme will show another maximum of activation before being finally inhibited by the inhibitor.

Such conditions have been statistically investigated and will be reported in this paper. Urease from soyabean has been used as the source of urease enzymes, and urea as the substrate. The reaction has been studied at pH = 6.6 using lead acetate as an inhibitor (BAHADUR, CHANDRA 1959).

Methods and Results

Urea solution: 4% solution of urea of A.R. quality was prepared by dissolving it in redistilled water prepared from all glass distilling apparatus.

Urease solution: 0·6% of soyabean powder in redistilled water was prepared. It was shaken well and allowed to stand for $^1/_2$ an hour and filtered through a cotton plug. The filtrate was used.

Buffer solution: Phosphate buffer of 0·2 M potassium dihydrogen phosphate (B.D.H.) and 0·2 M sodium hydroxide was used.

Lead acetate solution: 0·4620% solution of lead acetate $Pb(CH_3COO)_2 . 3H_2O$ (A.R., B.D.H.) in boiled distilled water was prepared.

The reaction was carried out in pyrex tubes. Two sets of experiments were performed side by side, i.e. one as control and other to study the influence of lead acetate on the activity of urease against urea. For each set a series of five parallel experiments were performed, whose statistical average is tabulated below.

Table 1 (Fig. A & B)

Decomposition of urea without and with 0·7 ml. and 1·4 ml. of 0·4620 % concentration of lead acetate solution

S. No.	Difference between the titre values at	0.20 mts	20—40 mts	40—60 mts	60—80 mts	80—100 mts
1	Control (Statistical average)	1·54±0·081	1·00±0·010	1·82±0·022	1·00± 0·010	0·30±0·010
	With 0·7 ml. of lead acetate soln (Statistical average)	1·82±0·037	1·90±0·070	0·38±0·037	1·96±0·012	0·84±0·012
	Statistical Remark	Significant	Significant	Significant	Significant	Significant
2	Control (Statistical Average)	1·22±0·040	1·36±0·040	1·52±0·020	1·12±0·020	0·48±0·037
	With 1·4 ml. of lead acetate soln (Statistical average)	1·24±0·071	1·40±0	0·82±0·037	0·18±0·020	0·12±0·020
	Statistical Remark	Insignificant	Insignificant	Significant	Significant	Significant

Table 2

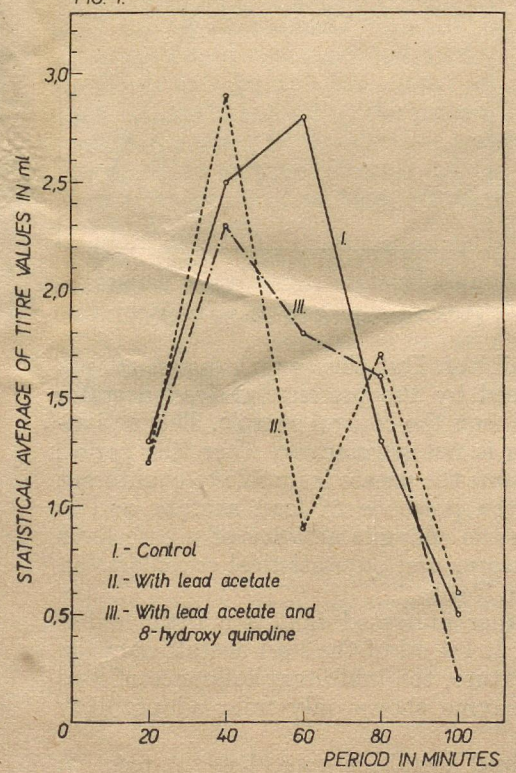
S. No.	Difference between the titre values at	0—20 mts	20—40 mts	40—60 mts	60—80 mts	80—100 mts
I 35° C	1) Control (Statistical average)	1·36±0·330	2·56±0·033	2·86±0·066	1·36±0·088	0·50±0·057
	(2) With lead acetate (Statistical average)	1·20±0	2·96±0·033	0·93±0·066	1·73±0·068	0·66±0·088
	(3) With lead acetate + + 8-hydroxy quinoline after 40 mts (Statistical average)	1·20±0·057	2·33±0·087	1·86±0·066	1·66±0·066	0·20±0
	Statistical 1 & 2	Insignificant	Significant	Significant	Insignificant	Significant
	Remark 1 & 3	Insignificant	Insignificant	Significant	Significant	Significant
II 33° C	(1) Control (Statistical average)	1·10±0	1·82±0·047	2·10±0·040	1·50±0·040	1·02±0·022
	(2) With lead acetate (Statistical average)	1·30±0·057	2·07±0·045	0·95±0·028	1·75±0·050	0·60±0·014
	(3) With lead acetate + + 8-hydroxy quinoline after 40 mts (Statistical average)	1·20±0·024	1·80±0·057	1·52±0·024	1·60±0·057	0·62±0·047
	Statistical 1 & 2	Significant	Significant	Significant	Insignificant	Insignificant
	Remark 1 & 3	Significant	Insignificant	Significant	Insignificant	Significant
III 30° C	(1) Control (statistical average)	1.4±0	1.52±0.047	1.72±0.047	1.50±0.04	1.40±0.05
	(2) With lead acetate (Statistical average)	1·35±0·050	1·80±0·040	0·92±0·024	1·60±0·040	1·67±0·047
	(3) With lead acetate + + 8-hydroxy quinoline after 40 mts (Statistical average)	1·40±0·040	1·60±0	1·30±0·040	1·37±0·007	1·25±0·080
	Statistical 1 & 2	Insignificant	Significant	Significant	Insignificant	Significant
	Remark 1 & 3	Insignificant	Insignificant	Significant	Significant	Insignificant

The reaction mixture contains 16·6 ml urea, 6·6 ml urease, 6·6 ml buffer, and redistilled water, while in another case together with all the above the requisite amount of lead acetate was also added. The total volume of the sets was made equal with the help of redistilled water.

The reaction was carried out at pH 6·6 and at 35° C temperature. The samples were withdrawn at 20 minutes intervals. The liberated ammonia from the decomposition of urea was titrated against N/25—H_2SO_4.

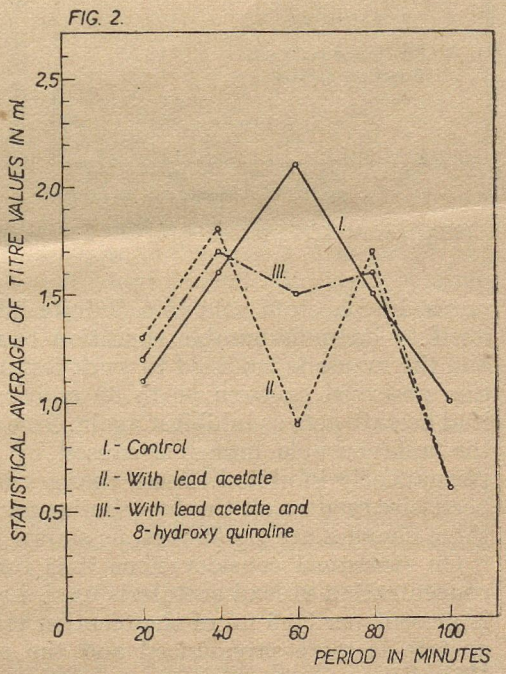
The reaction was carried out in three sets, i.e. 1st set was control, 2nd set with 0.7 ml of lead acetate and in the 3rd set 2 ml of 8-hydroxy quinoline was added after 40 minutes to the reaction mixture containing 0·7 ml of lead acetate initially. The reaction was carried out at pH 6·6 and at three temperatures, i.e. 35° C, 33° C and 30° C. The samples were withdrawn at intervals of 20 minutes. The liberated ammonia from the decomposition of urea was titrated against N/25—H_2SO_4. For each set at different temperatures a series of 4 parallel experiments were performed whose statistical average is tabulated In the Table 2.

FIG. 1.



(REACTION AT TEMPERATURE — 35°C)

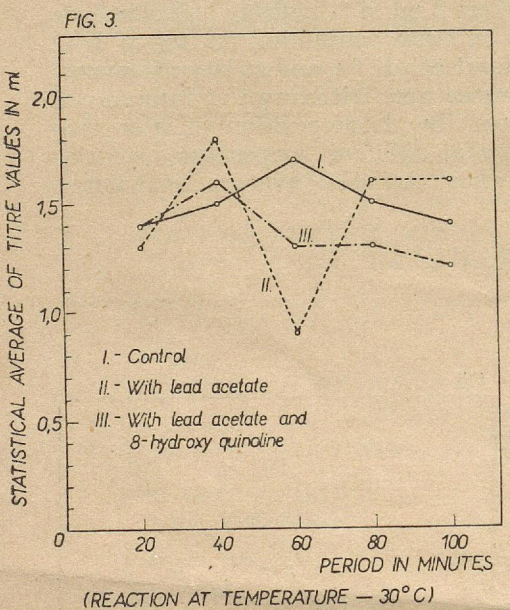
FIG. 2.

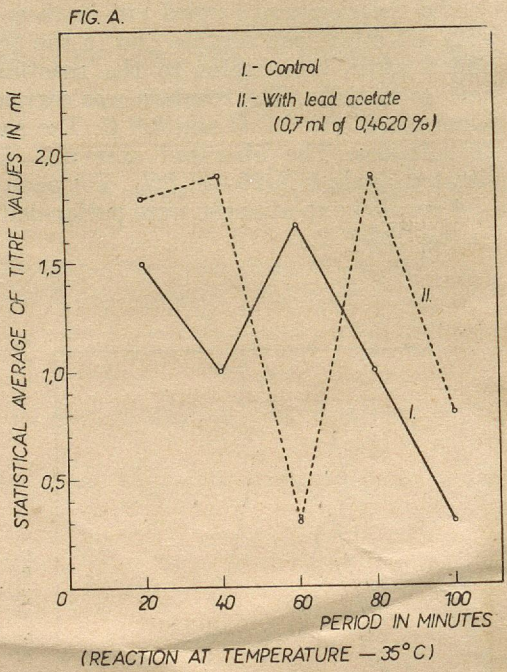


(REACTION AT TEMPERATURE — 33°C)

Discussion

Lead acetate in concentrations higher than studied here acts as inhibitor for urease from soyabean. In small concentration of lead acetate, i.e. when 0·7· ml of the lead acetate solution is present per 38·8 ml of the enzyme substrate mixture, lead acetate acts as a definite activator during the first 40 minutes of the reaction. During the next 20 minutes, i.e. between 40 to 60 minutes, lead acetate acts as a definite inhibitor. But the enzyme again adapts itself to its unfavourable condition caused by the presence of lead acetate, and the urease is modified to work faster than the control sample. This activation observed between 60 to 80 minutes is not permanent, after this period lead acetate acts as inhibitor again. This time the urease is unable to counteract the unfavourable influence caused by the presence of lead acetate and is permanently inhibited. These changes in the enzymic activity of urease have been observed in all the five similar mixtures and on statistical consideration these changes are significant, as shown in Table 2.





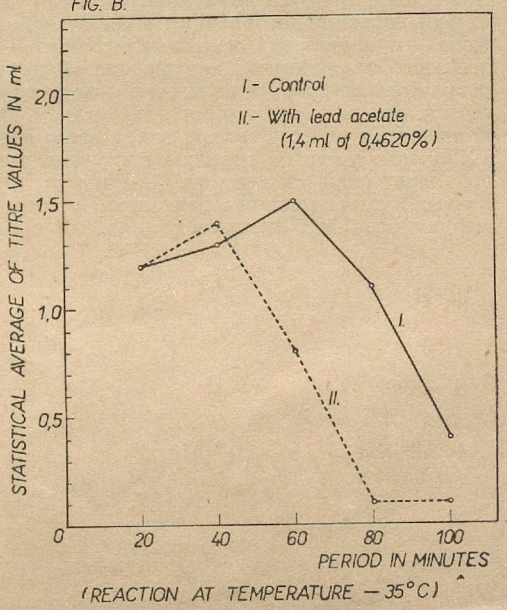
On statistical considerations it is further indicated that if a little higher concentration of lead acetate is used, i.e. if 1·4 ml of the lead acetate solution is present per 38·8 ml of the reaction mixture, the inhibitory influence of lead acetate is more pronounced and the enzyme shows only mild adaptability (Fig. B).

However, if a very small quantity of lead acetate is present in the reaction mixture and the experiments are performed keeping a number of similar

mixtures and the results are considered statistically to decrease any possibility of error, even then the adaptability of the enzyme is observed. Thus, if only 0·7 ml of the lead acetate is present per 38·8 ml of reaction mixture, the enzyme conveniently adapts itself to its unfavourable influence, and in its efforts to adapt to this unfavourable influence it becomes a better enzyme than the control one in urea decomposition (Fig. A).

In order to see whether the activation in the enzymic property caused by the lead acetate is permanent or it is only when lead acetate is present in the reaction mixture, 8-hydroxy quinoline was added in the reaction mixture after 40 minutes to remove the excess of lead acetate present in the mixture. It was observed that the activation of the enzyme is continued for the next 20 minutes and this effect is best observed at 33° C (Fig. 2), while at 30° C (Fig. 3) and at 35° C (Fig. 1) it is not so pronounced. This shows that the enzyme is modified during its effort to adapt to the unfavourable condition caused by the presence of lead acetate in the mixture, and this modified enzyme remains active even after the lead acetate is removed from the mixture.

FIG. B.



(REACTION AT TEMPERATURE — 35°C)

Each experiment was performed in a series of five similar mixtures and statistical calculations show a definite significance of the results. This behaviour of the enzyme is very similar to the process of adaptability in the living systems and the adaptability is an inherent property of matter which can be observed in bigger molecules if suitable reactions for their study are known.

References

BAHADUR, K., CHANDRA, V.: Inhibition of urease by lead-acetate. Enzymologia XX : 355—358, 1959.

BAHADUR, K., CHANDRA, V.: Influence of enzyme and substrate concentration on the decomposition of urea by commercial urease and urease obtained from glycine soyabeans in phosphate buffer. Enzymologia XXIII : 117—122, 1961.

BAHADUR, K., ATREYA, B. D.: Influence of aminoacids and amines on the enzymic activity of papain. Proc. Natl. Acad. Sci. (India) **30** : 126—140, 1961.

K. BAHADUR, I. SAXENA, Chemické odd. University v Allahabadu, Indie: **Přizpůsobivost enzymů.** — Biol. Plant. 7: 86—92, 1965.

V průběhu studia inhibitorů a aktivátorů enzymů bylo často zjištěno, že inhibitor působí jako aktivátor, jestliže je ve velmi malých koncentracích a jisté aktivátory (ve shodných koncentra-

cích) vykazují inhibici. Podobné výsledky jsme získali při studiu ureázy ze sojových bobů v přítomnosti octanu olovnatého. Octan olovnatý je normálně inhibitor ureázy. Bylo však zjištěno, že v malých množstvích octanu olovnatého nastává zvýšení aktivity ureázy. Prodloužením doby reakce nastává inhibice a ještě později opět zvýšení enzymatické ativity. Výsledky jsou statisticky zpracovány a jsou diskutovány ve vztahu k určité „adaptaci" ureázy na nepříznivé podmínky v reakční směsi způsobené octanem olovnatým.

К. Бахадур, И. Саксена, Химическое отделение Аллахабадского университета, Аллахабад, Индия: **Приспособительность энзимов**. — Biol. Plant. **7** : 86—92, 1965.

При изучении ингибиторов и активаторов энзимов часто наблюдается, что ингибиторы — присутствуя в малых количествах — действуют в качестве активаторов, и определенные активаторы (в подходящих концентрациях) оказывают ингибицию. Подобные результаты мы получили изучая уреазу из сои в присутствии ацетата свинца. Ацетат свинца нормально является ингибитором уреазы. Установлено, однако, что в малых количествах ацетата свинца имеет место повышение активности уреазы. В результате удлинения времени реакции наступает ингибиция и еще позже опять повышение энзиматической активности. Результаты статистически обработаны и обсуждаются в связи с определенной «адаптацией» уреазы на неблагоприятные условия реакционной смеси, вызванные ацетатом свинца.

© Nakladatelství Československé akademie věd 1965

[Jour. Indian Chem. Soc., Vol. 42, No. 2, 1965]

Photochemical Formation of Peptides in Aqueous Solution of Glutamic Acid in Presence of Different Catalysts

Krishna Bahadur and R. S. Pandey

Sterilised aqueous solutions of glutamic acid after irradiation to sunlight for 400 hours, separately and also along with some of the catalysts of inorganic and organic origin, reveal by a two-way paper chromatographic technique the presence of several peptide spots along with a few amino-acids. Constituent amino-acids of the peptides have been observed by the same chromatographic technique after hydrolysing the irradiated mixtures. The dark solutions, covered with thick black cloth and equally irradiated, also furnish some of the peptides and amino-acids due to the influence of other radiations including the cosmic one.

Photochemical formation of amino-acids was reported by Bahadur and co-workers[1-3] when an aqueous mixture of paraformaldehyde, an inorganic source of nitrogen, and metallic ions as catalysts was exposed to sunlight or artificial light of an electric lamp. This work was further extended and the influences of *p*H and different sources of carbon and metallic catalysts[4] were studied on photochemical formation of amino-acids[5]. The synthesis of amino-acids involving the fixation of molecular nitrogen was also reported[6-9] when the aqueous mixtures of organic compounds and metallic ions were exposed to sunlight or artificial light.

Perti *et al.*[10-15] have synthesised peptides photochemically by exposing the sterilised aqueous solutions of amino-acids containing sugar and metallic catalysts to sunlight and artificial light. Fox's thermal synthesis of peptides[16] by heating aqueous mixtures of amino-acids to 170° is also noteworthy.

Bahadur[17] has already stressed, on these lines, the formation of proteins or at least peptide-like material in prebiological era, which on further molecular evolution formed

1. Bahadur, *Nature*, 1954, **173**, 1141.
2. Bahadur and Ranganayaki, *Compt. rend.*, 1955, **240**, 246.
3. Bahadur and Srivastava, *Vigyan Parishad Anusandhan Patrika, India*, 1962, **5**, 57.
4. Bahadur and Ranganayaki, *Nat. Acad. Sci., India*, 1954, **23A**, 21.
5. Bahadur and Srivastava, *Zhur. Obsch. Khim.*, 1961, **31**, 317.
6. Bahadur and Ranganayaki, *Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1958, **27A**, 292.
7. *Idem*, *J. Acad. Sci., U.S.S.R.*, 1957, **6**, 754.
8. Bahadur, and Agrawal, *Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1962, **32A**, 83.
9. *Idem*, *J. Sci. Ind. Res.*, 1962, **21B**, 336.
10. Bahadur *et al.*, *Nature*, 1959, **182**, 1168.
11. Bahadur and Ranganayaki, *Izvest. Akad. Nauk*, 1958, **11**, 1361.
12. Bahadur and Srivastava, *Indian J. Appl. Chem.*, 1960, **23**, 3, 131.
13. Perti *et al.*, *Biokhimia, U. S. S. R.*, 1962, 4T, **27**, 708.
14. *Idem*, *Proc. Nat. Acad. Sci., India*, 1964, **30A**, 206.
15. Pathak, H. D., Ph. D. thesis, Photochemical formation of peptides in aqueous solutions", Agra University, 1962.
16. Fox, *Science*, 1960, **132**, 200.
17. Bahadur, Report International Symposium on "Origin of life on the Earth", Moscow, pp. 86-96, 1957.

proteins; the theory regarding the origin of life on the Earth has been developed recently[18-19].

In the present communication, the influence of some of the inorganic and organic catalysts on the photolysis of glutamic acid in aqueous solution and photochemical formation of peptides has been reported.

EXPERIMENTAL

The following nine sets, each of two Sigcol conical flasks of 150 ml capacity, were prepared. Each flask contained 100 ml solution in redistilled water. Glutamic acid used in the following sets was chromatographically pure.

(*a*) 0.05% Glutamic acid.

(*b*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% ferrous sulphate (A.R.).

(*c*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% nickel sulphate (A.R.).

(*d*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% cobalt sulphate (A.R.).

(*e*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% molybdic acid (prepared from the interaction of A. R. potassium molybdate with A.R. HCl).

(*f*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure anthracene.

(*g*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure phenanthrene.

(*h*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure naphthalene.

(*i*) 0.05% Glutamic acid + 0.02% pure fluorene.

The flasks were plugged with surgical cotton and sterilised at 15 lbs. pressure for 30 minutes. The mouths of the flasks were wrapped with polythene paper and sealed with cello-adhesive tape. One flask of each set was covered with thick black cloth and the other remained as such. All the covered and uncovered flasks were exposed to sunlight. After an exposure for 400 hr., the solutions of the covered and uncovered flasks were examined under the oil imersion microscope (D. R. P. Leitz Wetzlar microscope) using aseptic conditions and no bacterial growth was observed. The sterility of the exposed solutions was also checked by the culture-count method. A few drops of the exposed solution to be tested were introduced over the agar nutrient in the petri dishes under aseptic conditions and kept at 35° in the incubator for 3 to 4 days. The solutions did not show any bacterial growth during the exposure. These were analysed for hydrolysed and non-hydrolysed nitrogenous constituents by the two-way paper chromatographic technique, employing phenol-water (80:20) and butanol-acetic acid-water (120:30:50) as two running solvents. Hydrolysis was done with 10*N*-HCl in sealed, hard neutral glass ampules, kept in boiling water for 24 hr. The hydrolysed samples were dried and neutralised simultaneously in a vacuum desiccator in presence of

18. Bahadur *et al.*, *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika, India*, 1963, **6**, 63-117.

19. Perti, *Agra Univ. J. Res* (*Sci.*), Vol. XII, Part II, pp. 1-48, May, 1963.

20. Agrawal, K. M. L., D. Phil. thesis, "Photochemical and Biochemical Fixation of Nitrogen", University of Allahabad, 1963.

fused NaOH. Whatman No. 1 chromatographic papers were used. Spots of amino-acids and peptides were developed by spraying 0.2% ninhydrin solution in acetone over the dried chromatograms. The R_f values changed due to many factors, such as change of room temperature[21], the change of the time of running of the chromatograms in a particular solvent, and also due to the degree of hydration of the same solvent. Therefore the R_f values of known amino-acids were occasionally determined and the R_f values of unknown amino-acids were compared with these known ones. Two running solvents were used in all the experiments for identification. This was accompanied with two-dimensional chromatography.

The final identification was done by simultaneous running of known amino-acids with the running solvents used in these expriments. The results of the chromatographic analysis of each set are recorded in Tables I-IX, when time of exposure=400 hr.

TABLE I

Glutamic acid solution in water.

Conc. of glutamic acid=0.05%.

S. No.	R_f values in Phenol: water (80:20).	Butanol-acetic-acid-water (120:30:50).	*Identification.	Remarks.
	A. Solution of uncovered flask (light).			
Unhydrolysed:				
1.	0.33	0.20	Peptide	Purple
2.	0.68	0.60	Peptide	Purple, faint
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.37	Aspartic acid	Purple
2.	0.23	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.32	0.36	Serine	,,
4.	0.84	0.71	Norleucine	,,
5.	0.94	0.77	?	Purple, faint
	B. Solution of covered flask (dark).			
Unhydrolysed:				
1.	0.07	0.21	Peptide	Purple
2.	0.21	0.21	Peptide	,,
3.	0.38	0.21	Glutamic acid?	,,
4.	0.81	0.62	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.27	?	Pink
2.	0.00	0.36	?	,,
3.	0.23	0.37	Glutamic acid	Purple
4.	0.84	0.71	Norleucine	Purple, faint

*With 0.2% ninhydrin solution in acetone.

21. Bate Smith, Biochem. Society Symposia, No. 3, p. 62, 1950.

TABLE II

Aqueous glutamic acid solution (0.05%)+*ferrous sulphate* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Indentification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.17	0.23	Peptide	Purple, faint
2.	0.32	0.29	Glutamic acid	Purple
3.	0.45	0.23	Glycine	,,
4.	0.75	0.50	?	,,
5.	0.91	0.63	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.29	?	,,
2.	0.32	0.23	Glycine	,,
3.	0.30	0.29	Glutamic acid	,,
4.	0.72	0.46	Alanine?	,,
5.	0.62	0.78	?	,,
		B. Solution of covered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.05	0.31	Peptide	Purple
2.	0.13	0.31	Aspartic acid	,,
3.	0.32	0.30	Glutamic acid	,,
4.	0.71	0.71	Peptide	,,
Hydrolysed:				
1.	0.05	0.11	?	Purple, faint
2.	0.06	0.22	?	Red
3.	0.05	0.31	?	Purple
4.	0.12	0.30	Aspartic acid	,,
5.	0.25	0.38	Glutamic acid	,,
6.	0.40	0.28	Glycine	,,
7.	0.90	0.70	Norleucine	,,
8.	0.95	0.73	?	,,

TABLE III

Aqueous solution of glutamic acid (0.05%)+*nickel sulphate* (0.02%) *as catalyst.*

S.No.	R_f values in Phenol-water (80:20).	Butanol-acetic acid-water (120:30:50).	Identification.	Remarks.
		A. Solution of uncovered flask.		
Unhydrolysed:				
1.	0.05	0.20	Peptide	Red
2.	0.15	0.20	Peptide	Purple
3.	0.37	0.20	Peptide	Purple
4.	0.78	0.60	Peptide	Brown
Hydrolysed:				
1.	0.10	0.40	Aspartic acid	Purple
2.	0.20	0.42	Glutamic acid	,,
3.	0.35	0.36	Serine	,,
4.	0.87	0.75	?	,,
5.	0.97	0.68	Methionine	,,

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser!

Sonderdruck aus dem

Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., 119

VEB Gustav Fischer Verlag in Jena.

Printed in Germany. Veröffentlicht unter der Lizenz-Nr. 1063

1965

Nachdruck verboten

[From the Department of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad]

Study of the influence of the sodium salts of fatty acids on the biological fixation of N_2

Krishna Bahadur and **Krishna Kumar Sinha**

It was observed that the unsterilised soil when kept for a few months had gained slightly in the nitrogen contents which appears in the organically combined state (1). This not only received support but also drew the attention towards the biological fixation of nitrogen when WINOGRADSKY isolated a nitrogen fixer nonsymbiotic anaerobe *Clostridium pasteurianum* from the culture media containing sugar, phosphate, sulphate, calcium carbonate and soil (2). This was followed by the isolation of another nonsymbiotic anaerobe: Blue Green Algae (3). Besides these anaerobes, the aerobes *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter agilis* were also isolated (3). All these microbes are nitrogen fixer.

Out of all these nitrogen fixers the *Azotobacters* growing in nitrogen free media containing mineral nutrients, has drawn much attention. The nitrogen fixed is upto the extent of 20 mg. per gm. of sugar (4, 5), even more than *Cl. pasteurianum*-microbe.

The probable mechanism of the nitrogen fixation is that the first product of the fixation is ammonia which combines with the organic residues formed by the degradation of carbohydrates present in the culture media to form amino acids (6) which is slowly excreted into the medium (7).

Mannitol is the best source of carbon for nitrogen fixing organisms (8). When some sodium salts like benzoate and lactate were used as carbon sources the formation of amino acid was observed (9, 10). Here an attempt has been made to employ sodium salts of the fatty acids as the source of carbon and to examine whether these can act as useful source of carbon and if so the salts of which organic acid helps in the maximum fixation of nitrogen thereby to find the course of the degradation of the carbon source leading to the formation of the carbon chain which actually forms the initial compounds with the fixed nitrogen. If organic acids are used as such the growth is inhibited because it lowers down the hydrogen ion concentration of the media. It was, therefore, necessary to use the acids in the form of sodium salts.

Isolation of the organism

Some nitrogen fixing micro-organisms were isolated from the lawn soil of the Nuffield Colony at 6, Prince Albert Road, London (11). These organisms have been used for the nitrogen fixation described here. They have been grown in the nitrogen free medium of the composition:

Potassium dihydrogen phosphate	= 1.6 gm.
Potassium monohydrogen phosphate	= 0.4 gm.
Sodium chloride	= 0.2 gm.
Magnesium sulphate	= 0.2 gm.
Molybdic acid	= 0.001 gm.
Ferric chloride	= 0.0001 gm.
Calcium chloride	= 0.1 gm.
Mannitol	= 15 gm.
Distilled water	= 1000 ml.

The hydrogen ion concentration of the medium was adjusted to 7.5 by an electric pH meter.

Experimental

The culture media having above composition except that the mannitol is reduced to 5 gm. in one litre, has been prepared. The pH is adjusted to 7.5 by an electric pH meter. 25 ml. of it is transferred in boiling tubes containing one gm. of the sodium salt of the fatty acid. The boiling tubes are cotton plugged, sterilised in an autoclave at 15 lbs. pressure for 30 minutes, cooled to room temperature and inoculated with the organism to be studied. They are kept in an incubator at 28 °C for 3 months and 20 days. After this period the content of each boiling tube is made upto 100 ml. 20 ml. of it is used both for carbon estimation (12) and nitrogen estimation (13). A brief account is given below:

Carbon estimation

20 ml. of the culture media is heated in KJELDAHL flask containing 0.5 gm. of potassium sulphate, a few crystals of copper sulphate and 20 ml. of A. R. sulphuric acid. The sulphur dioxide thus formed is passed through the conical flask containing standard iodine solution. The iodine used up is calculated by titrating against the standard hypo solution and hence the equivalent carbon is calculated.

$$C + 2\,H_2SO_4 = CO_2 + 2\,SO_2 + 2\,H_2O$$
$$2\,SO_2 + 2\,I_2 + 4\,H_2O = 2\,H_2SO_4 + 4\,HI$$
$$C = 4\,I$$

Nitrogen estimation

20 ml. of the culture is digested in a KJELDAHL flask containing 0.5 gm. of potassium sulphate, a few crystals of copper sulphate and 20 ml. of A. R. sulphuric acid for about 3 hours till the contents become colourless. The nitrogen present in the media is converted into ammonium sulphate which is decomposed by 80% caustic soda solution to ammonia. This ammonia is received in water and it is titrated against standard sulphuric acid.

Table 1

Salt — Sodium succinate
pH = 7.5 Temp. = 28 °C
Total amount of carbon in 25 ml. of cult. = 0.049 + 0.296 = 0.345 gm.

S. No.	Bacteria	Volume of N/45.75 H_2SO_4 for 20 ml. of cult	Total amount of N_2 fixed by 100 ml. of cult.	ml. of N/10.68 I_2 for carbon present in 20 ml.	Total amount of carbon consumed in 100 ml. (in gm.)	Period of analysis	Amount of N_2 fixed/gm. of carbon consumed (in mg.)
1.	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,B}$	1.2 mg.	1.80 mg.	89 ml.	0.2204	3 months and 20 days	8.16
2.	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,A}$	1.2 mg.	1.80 mg.	86.5 ml.	0.2239	3 months and 20 days	7.60
3.	$\frac{123}{2}$	1.1 mg.	1.65 mg.	110.4 ml.	0.1905	3 months and 20 days	8.66
4.	Wo	1.3 mg.	1.95 mg.	32.1 ml.	0.3002	3 months and 20 days	6.49

Table 2

Salt — Sodium fumarate
pH = 7.5 Temp. 28 °C
Total amount of carbon = 0.049 + 0.3000 = 0.349 gm.

S. No.	Bacteria	Period of analysis	Ml. of N/45.75 H_2SO_4 for 20 ml. of cult.	Total amount of N_2 fixed in mgs. in 100 ml.	Ml. of N/10.68 I_2 for carbon present in 20 ml.	Total amount of carbon consumed in 100 ml. cult. (in gm.)	Amount of N_2 fixed/gm. of carbon consumed (in mg.)
1.	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,B}$	3 months and 20 days	0.91	1.365	53.7	0.255	6.06
2.	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,A}$	3 months and 20 days	0.45	0.675	32.1	0.289	2.33
3.	$\frac{123}{2}$	3 months and 20 days	0.40	0.600	55.3	0.254	2.37
4.	Wo	3 months and 20 days	1.00	1.50	67.0	0.231	6.49

Discussion

It has been observed that the sodium salt of the organic acids are favourable for the nitrogen fixation by *Azotobacter*. This study shows that the organism $\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,B}$ gives maximum fixation in presence of sodium pthalate whereas in presence of other sodium salts the fixation is considerably decreased in the order:

Pthalate > citrate > succinate > fumarate > acetate.

Although it shows maximum fixation in presence of pthalate yet its consumption

Table 3

Salt — Sodium acetate
pH = 7.5 Temp, 28 °C
Total amount of carbon present initially = 0.3418 gm.

S. No.	Bacteria	Period of analysis	Ml. of N/45.75 H_2SO_4 for 20 ml. of cult.	Total amount of N_2 fixed in 100 ml. cult. (in mg.)	Ml. of N/10.68 I_2 for carbon present in 20 ml.	Total amount of carbon consumed in 100 ml. (in gm.)	Amount of N_2 fixed/gm. of carbon consumed
1.	120/1 B / 2/2 B	3 months and 20 days	0.2	0.3	21.4	0.3111	0.9
2.	120/1 B / 2/2 A	3 months and 20 days	0.3	0.45	26.0	0.3049	1.4
3.	123 / 2	3 months and 20 days	0.5	0.75	30.7	0.2982	2.4
4.	Wo	3 months and 20 days	1.9	2.85	15.5	0.3193	7.46

Table 4

Salt — Sodium citrate
pH = 7.5 Temp. = 28 °C
Total amount of carbon present initially = 0.4238 gm.

S. No.	Period of analysis	Bacteria	Ml. of N/45.75 H_2SO_4 for 20 ml. of cult.	Total amount of N_2 fixed in 100 ml. in mgs.	Ml. of N/11.03 I_2 for carbon present in 20 ml.	Total amount of carbon consumed in 100 ml. cult. in gm.	Mg. of N_2 fixed/gm. of carbon consumed
1.	3 months and 20 days	120/1 B / 2/2 B	1.3	1.95	45	0.3653	5.3
2.	3 months and 20 days	120/1 B / 2/2 A	1.5	2.25	23.1	0.3926	5.7
3.	3 months and 20 days	123 / 2	1.2	1.80	18.7	0.3995	4.5
4.	3 months and 20 days	Wo	1.6	2.40	21.2	0.3848	6.2

of carbon is comparatively high thus giving the fixation per gm. of the carbon consumed in the order

succinate > fumarate > citrate > pthalate > aceta te.

It is really surprising that not only the rate of the fixation of nitrogen is influenced but different organisms have selective utilisation of carbon of the sodium salts stu died.

Table 5

Salt — Sodium phthalate
pH = 7.5 Temp. 28 °C
Total amount of carbon present initially = 0.6270 gm.

S. No.	Period of analysis	Bacteria	Ml. of N/45.75 H_2SO_4 for 20 ml. of cult.	Total amount of N_2 fixed by 100 ml. in mg.	Ml. of N/11.03 I_2 for carbon present in 20 ml.	Total amount of carbon consumed by 100 ml. (in gm.)	Mg. of N_2 fixed/gm. of carbon consumed
1.	3 months and 20 days	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,B}$	2.0	3.00	31.9	0.5730	5.2
2.	3 months and 20 days	$\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,A}$	1.4	2.10	32.7	0.5841	3.6
3.	3 months and 20 days	$\frac{123}{2}$	0.7	1.05	30.5	0.5874	1.7
4.	3 months and 20 days	Wo	1.2	1.80	18.5	0.6030	3.0

Wo = *Azotobacter chroococcum.*

In the lack of information that the organisms shall be able to utilise the carbon of the organic salts, a little initial mannitol was added in the media with the view that the organisms may be able to grow and adopt to the use of the carbon of the salts of the organic acids. In every case it is observed that not only the carbon present initially due to mannitol is consumed but a little of it present due to sodium salt is also consumed.

The organism $\frac{120}{2}/\frac{1\,B}{2\,A}$ shows maximum fixation in presence of citrate. The order of the fixation of nitrogen with different salts of the organic acids used is:

citrate > pthalate > succinate > fumarate > acetate.

But because of the different amount of the carbon consumed the mg. of nitrogen fixed per gm. of the carbon consumed is of the order:

succinate > citrate > pthalate > fumarate > acetate.

The nitrogen fixed in the case of the organisms $\frac{123}{2}$ and Wo is of the order respectively,

succinate > citrate > pthalate > acetate > fumarate
acetate > citrate > succinate > pthalate > fumarate

and mg. of the nitrogen fixed per gm. of the carbon consumed is respectively of the order:

succinate > citrate > acetate > fumarate > pthalate
acetate > fumarate > citrate > pthalate
= Succinate

In every case it is observed that apart from the carbon present due to mannitol certain quantity of the carbon of the sodium salt is also consumed and the organic acids, succinic fumaric, pthalic, citric, and acetic acid of the KREB's cycle are used as source of carbon by the organism.

This experiment shows that it shall be worthwhile to see whether these organisms can grow in media having no mannitol but only the organic acids used as sodium salts and whether the amount of nitrogen fixed and the carbon consumed follows the same pattern. Also if microbial counting is taken then it can be known whether the carbon consumed has helped in the formation of some individual cells or the nitrogen fixation only. Thus it can be found out that which salt helps in the growth of the cells and which in the fixation. Further if amino acids in the media are identified (within the cell and outside) then it can be known whether these acids are directly converted to amino acids formed during the fixation or the process is different.

Literature

1. BERTHELOT, M., C. R. Acad. Sci. **10**, 775—781 (1885). — 2. WINOGRADSKY, S., Arch. Sci. biol. St. Petersburg **3**, 297—352 (1895). — 3. BEIJERINCK, M. W., Zbl. Bakter. II **117**, 561—582 (1901). — 4. FISCHER, W. K., Arch. Mikrobiol. **14**, 353—406 (1949). — 5. WILSON, P. W., and R. H. BURRIS, Biological nitrogen fixation, a re-appraisal. Amer. Rev. Microbiol. **7**, 415—432 (1953). — 6. HORNER, C. K., and D. BURK, Trans. 3rd Comm. Int. Soc. Soil Sci. A, 160—174 (1939). — 7. KOSTYTSCHEV, S., A. RYSKATTSCHUK and O. SCHWEZOWA, Z. Physiol. Chem. **154**, 1—17 (1926). — 8. MEYRHOF, O., and D. BURK, Z. Physik. Chem. A., **139**, 117—142 (1928). — 9. WINOGRADSKY. S., C. R. Acad. Sci. **190**, 661—665 (1930). — 10. Ders., Zbl. Bakter. II **97**, 399—413 (1938). — 11. Thesis of D. I. C. of Bacteriology of Botany Department, Imperial College of Science and Techn. London (1961). — 12. ROBINSON, W., H. MCLEAN and B. W. WILLIAMS, J. Agric. Sci. **19**, 315 (1929). — 13. KJELDAHL, J., Z. anal. Chem. **22**, 366 (1883).

Authors' address:

Prof. Dr. Krishna Bahadur and Krishna Kumar Sinha, Department of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad, India.

J. Chem. U.A.R., **9**, No. 1, 67–72 (1966)

INFLUENCE OF HYDROGEN ION CONCENTRATION ON THE PHOTOCHEMICAL FIXATION OF NITROGEN IN MIXTURES CONTAINING TARTARIC ACID AS THE SOURCE OF CARBON AND MIXTURE OF COLLOIDAL MOLYBDENUM AND IRON OXIDES AS CATALYST

By

KRISHNA BAHADUR

Chemistry Department, University of Allahabad, India

AND

KRISHNA MURARI LAL AGRAWAL

Chemistry Department, Motilal Nehru Regional Engineering College, Allahabad, India.

SUMMARY

Sterilised aqueous mixtures containing tartaric acid as the source of carbon and a mixture of colloidal molybdenum and ferric oxides as the catalyst at pH values 5.8, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 7.9 were exposed to sunlight for 400 hours. Similar mixtures were covered with four fold thick black cotton cloth and kept as controls near the exposed mixtures. Loss of nitrogen was observed in the mixture at pH value 5.8 after an exposure of 400 hours to sunlight. However, similar mixtures at pH values 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 7.9 showed statistically significant fixations of nitrogen under similar conditions. Maximum fixation of 0.51 mg of nitrogen was observed in 100 ml of the mixture containing buffer solution of pH value 7.5.

Several amino acids were synthesised in mixtures exposed to sunlight. Traces of a few of these were also identified in similar mixtures kept in dark. The nature of the amino acids photosynthesised in these mixtures varied considerably with the pH values of he mixtures.

INTRODUCTION

It has been observed by Bahadur and co-workers that hydrogen ion concentration of the mixture greatly influences the photosynthesis of amino acids in aqueous sterilised mixtures containing an organic source of carbon and catalysts when exposed to light (1). Thus it was recorded that, with increasing

hydrogen ion concentration of the mixtures, formation of amino acids in the mixtures also increased to a certain extent. The nature of the amino acids synthesised in the mixtures varied with the hydrogen ion concentration.

Dhar performed a series of experiments with soil with different hydrogen ion concentration in photochemical fixation of nitrogen and observed loss of nitrogen in acidic soils. He has also shown that these soils can fix atmospheric nitrogen if mixed with suitable amounts of basic slag (2 — 6). Dhar and co-workers have shown that hydrogen ion concentration of the soil is one of the major factors in deciding its fertility or nitrogen fixing capacity. Thus it is of interest to study the influence of hydrogen ion concentration on photochemical fixation of nitrogen in synthetic mixtures. The mixtures studied here contain tartaric acid as the source of carbon and a mixture of colloidal molybdenum and iron oxides as the catalyst.

EXPERIMENTAL

Eleven mixtures of the following compositions were prepared for the following six sets in 150 ml conical flasks :

(*a*) 0.80 g tartaric acid, 10 ml colloidal molybdenum oxide, 10 ml colloidal ferric oxide, 20 ml of buffer solution of pH 5.8 (sodium hydroxide and acid hydrogen phosphate buffer) and 60 ml distilled water.

(*b*) 0.80 g tartaric acid, 10 ml colloidal molybdenum oxide, 10 ml colloidal ferric oxide, 20 ml buffer solution of pH 6.0 and 60 ml distilled water.

(*c*) 0.80 g tartaric acid, 10 ml colloidal molybdenum oxide, 10 ml colloidal ferric oxide, 20 ml buffer solution of pH 6.5 and 60 ml distilled water.

(*d*) 0.80 g tartaric acid, 10 ml colloidal molybdenum oxide, 10 ml colloidal ferric oxide, 20 ml buffer solution of pH 7.0 and 60 ml glass-distilled water.

(*e*) 0.80 g tartaric acid, 10 ml colloidal molybdenum oxide, 10 ml colloidal ferric oxide, 20 ml buffer solution of pH 7.9 and 60 ml distilled water.

Preparation of ferric oxide sol.—The method adopted was the one described by Debray and Krecke (7,8) which consists of hydrolysis of ferric chloride by slowly pouring a concentrated solution of the salt in boiling water, followed by dialysis to remove hydrochloric acid.

Preparation of Molybdenum oxide solution.—Molybdenum trioxide sol was prepared by the method described by Graham (9). To a 5 % solution of potassium molybdate a concentrated solution of hydrochloric acid was added drop by drop with constant stirring till a slight excess.

The whole content was dialysed for fifteen days and the sol was found free from nitrogenous impurities.

Preparation of buffer solution.—Buffer solutions were prepared by mixing the following amounts of 0.2 M acid potassium phosphate solution and 0.2N sodium hydroxide solution :

50 ml 0.2 M acid potassium phosphate X ml
0.2 N sodium hydroxide solution

pH	X	pH	X
5.8	3.72	7.0	32.50
6.0	5.70	7.5	42.80
6.5	16.00	7.9	46.80

The flasks containing these mixtures were plugged with surgical cotton and the mixtures were sterilised at 15 lbs pressure for 30 minutes in an autoclave. On cooling the mouths of these flasks were sealed with polythene paper and cello-adhesive tape.

Five mixtures each of these sets were exposed to sunlight. Another similar number of mixtures were covered with four fold of black cloth and were kept near the exposed mixtures. The remaining one mixture of each set was used for control determinations. The variation in temperature of water kept near the exposed flasks was recorded from time to time. The mixtures were analysed after 400 hours exposure to sunlight. Nitrogen contents of the mixtures were determined by the semi-micro Kjeldahl method : (10 — 16) and amino acids synthesised in these mixtures were identified by chromatographic techniques (17 — 21). The results were statistically cacultated as illustrated in Table I.

DISCUSSION

Loss of 0.04 mg of nitrogen was observed in the mixture containing tartaric acid, colloidal molybdenum oxide, colloidal ferric oxide and water at pH 5.8 when exposed to sunlight for 400 hours under perfectly sterile conditions. The mixture exposed to light did not indicate the formation of any amino acid. However, a similar mixture covered with black cloth indicated the presence of traces of ornithine. Similar mixtures at pH value 6.0 showed fixation of 0.19 mg of nitrogen in 100 ml of the mixture. Aspartic acid, glutamic acid and arginine were photosynthesised in the mixture exposed to light. Out of all these the concentration of aspartic acid was found to be the maximum. Only traces of aspartic acid were observed in similar mixtures kept in the dark.

Table I

Photochemical fixation of nitrogen in mixtures containing tartaric acid as the source of carbon and the mixture of colloidal molybdenum and iron oxides as catalysts at pH value 5.8 after exposure of 400 hours to sun light.

(Variation of temperature during the period of exposure 25 to 56°)

Serial Number	Condition	N/52.5 sulphuric acid in ml required to neutralise ammonia produced in the mixture	Statistical average	Mg of nitrogen present in the mixture	Amino acids present
1	light	0.88	—	—	—
2		0.86	—	—	—
3		0.82	0.840	0.2234	absent
4		0.78	+0.0179	+0.0048	—
5		0.86	—	—	—
6	dark.	1.02	—	—	—
7		1.06	1.004	0.2671	Ornithine
8		1.00	+0.0152	0.0040	(traces)
9		0.98	—	—	—
10		0.96	—	—	—
11	Control	1.28	—	0.3405	absent

NOTES: (1) Loss of nitrogen by light in 100 ml. of the mixture 0.04 mg.

(2) Statistical significance factor 3 $(a^2+b^2)^{1/2}$, where a and b are the statistical errors for the two sets of reading in light and dark is less than difference of the average titre readings dav. Therefore, the loss of nitrogen is statistically significant.

$$3\ (a^2+b^2)^{\frac{1}{2}} = 0.0703$$

$$\text{dav} = 0.164$$

Fixation of nitrogen increased to 0.48 mg in the mixtures at pH 6.5 under similar conditions. Aspartic acid, asparagine and alanine were formed in the mixtures exposed to light. Only traces of aspartic acid were observed in similar mixtures kept in dark. The mixture at pH 7.0 showed a slight decrease in the fixation of nitrogen. Several amino acids were synthesised in these mixtures. Alanine, serine, aspartic acid, glutamic acid and leucine were observed in these mixtures exposed to light. Similar mixtures kept in dark indicated the formation of alanine, serine and aspartic acid only. Again an increase in the fixation of nitrogen was recorded in the mixture at pH 7.5.0.51 mg of nitrogen was fixed in the mixture at pH 7.5 which was the maximum of all the values

obtained with other mixutres. Alanine, serine, aspartic acid, glutamic acid and lysine are formed in this mixture exposed to light. Similar mixtures showed the formation of traces of alanine, serine and aspartic acid when kept in dark. A decrease in fixation of nitrogen was again observed in the mixture at pH value 7.9. Thus this mixture showed the fixation of 0.42 mg of nitrogen. Aspartic acid, glutamic acid, alanine and serine were formed in the mixtures exposed to light.

Thus the pH value of 7.5 provided the optimum hydrogen ion concentration for photochemical fixation of nitrgen in these mixtures. The nature of the amino acids synthesised also varied with the pH values of the mixtures. Several amino acids were formed in mixtures at pH values 7.0, 7.5 and 7.9.

REFERENCES

1.—**Bahadur, K. and Raganayaki, S.,** *Izvest, Akad. Nauk. S.S.S.R. Otdel. Khim. Nauk.*, 754, (1957).

2.—**Dhar, N.R.,** *Presid. Addr. Natl. Acad. Sci., India,* p. 47 (1952).

3.—**Dhar, N.R. and Misra, S.G.,** *Natl. Acad. Sci. India Symp. on Recent Trends in Soil Research,* **24**, Part III, 305 (1954).

4.—**Pathak, A.N.,** *Agra. Univ. J. Res. (Sci.),* **3**, 217 (1954).

5.—**Ghosh, S.K.,** *Mother Eearth,* **9**, 255-260 (1955).

6.—**Vyas, N.D. and Dessi, J.R.,** *J. Ind. Soc. Soil Sci.*, **1**, 32 (1953).

7.—**Debray,** *Compt. rend.*, **68**, 914 (1869).

8.—**Krecket,** *J. Prak. Chem.*, (2) **3**,286-95 (1817).

9.—**Graham,** *Ann.*, **135**, 65 (1865).

10.—**Kjeldhal, J.Z.,** *Anal. Chem.*, **22**, 366 (1883).

11.—**Gunning, J.W.,** *Z. Anal. Chem.*, **28**, 188 (1889).

12.—**Arnold, C.,** *Chem. Zentr.*, 1886, 337 (1892).

13.—**Arnold, C., and Wedemeyer, K.,** *Z. Anal. Chem.*, **31**, 525 (1892).

14.—**Kolthroff, I.M. and Stenger, V.A.,** *Procedure of Volumetric Analysis,* p. 173 (1947).

15.—**Moore, H.C.,** *Ind. Eng. Chem.*, **12**, 669 (192).

16.—**Prince, A.L.,** *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 410 (1925).

17.—**Giri, K.V. and Rao, N.A.N.,** *J. Ind. Inst. Sci.* **34**, 95 (1952).

18.—**Giri, K.V. and Prasad, A.L.N.,** *Nature,* **158**, 786 (1951).

19.—**Giri, K.V., Krishnamurthy, K., and Venkatasubramanium, T.A.,** *Curr. Sci.*, **21**, 44 (1952).

20.—**Giri, K.V.,** *Curr. Sci.*, **20**, 295 (1951).

21.—**Consden, R., Gordon, A.H. and Martin, A.J.P.,** *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).

(Received., 19/5/1965)

أثر الأس الهيدروجينى على التثبيت الكيميائى ـ الضوئى للنتروجين فى مخاليط تحوى حمض الطرطريك والموليبدنوم الغروى مع أكاسيد الحديد

كريشنا بهادور و كريشنا مورارى لال أجراوال

الملخص

تكونت عدة أحماض أمينية بتعويض مالخيط تحوى حمض الطرطريك كمصدر للكربون ومزيج من الموليبدنوم الغروى وأكاسيد الحديد كعامل مساعد لضوء الشمس . وقد تغيرت طبيعة الأحماض الأمينية الى حد كبير بالأس الهيدروجينى.

सिट्रिक अम्ल एवं ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बनों के मिश्रण में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा विनोद कुमार श्रीवास्तव

रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

1966, भाग 9, संख्या II, पृ० 75-80 से पुनर्मुद्रित

Photochemical fixation of nitrogen in a mixture containing citric acid as the source of carbon and aromatic hydrocarbons anthracene, fluorene and naphthalene as catalysts.

By

Krishna Bahadur and Vinod Kumar Srivastava,

Chemical laboratories, University of Allahabad, Allahabad.

Rprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1966, Vol. 9, Part II, Pages 75-80.

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका
1966, **9**, 75-80

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1966, **9**, 75-80

सिट्रिक अम्ल एवं ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बनों के मिश्रण में नाइट्रोजन का प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण

कृष्ण बहादुर तथा विनोद कुमार श्रीवास्तव
रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

(प्राप्त–नवम्बर 1, 1965)

सारांश

एक संश्लेषित मिश्रण में, जिसमें कार्बनिक स्रोत सिट्रिक अम्ल था और ऐंथ्रासीन उत्प्रेरक के रूप में था, 0.2990 मिग्रा०/100 मिली० आणविक नाइट्रोजन का स्थिरीकरण देखा गया। जब ऐंथ्रासीन के स्थान पर फ्लोरीन को उत्प्रेरक के रूप में प्रयुक्त किया गया तो स्थिरीकृत नाइट्रोजन 0.3310 मिग्रा०/100 मिली० था। नैप्थलीन के प्रयुक्त किये जाने पर यही मान 0.1600 मिग्रा०/100 मिली० प्राप्त हुआ। सभी मिश्रणों में प्रकाश तथा अंधकार दोनों में ही अमीनों अम्लों का निर्माण देखा गया किन्तु प्रकाश में रखे मिश्रण में अमीनो अम्लों की मात्रा अधिक थी।

Abstract

Photochemical fixation of nitrogen in a mixture containing citric acid as the source of carbon and aromatic hydrocarbons anthracene, fluorene and naphthalene as catalysts. *By* Krishna Bahadur and Vinod Kumar Srivastava, Chemical laboratories, University of Allahabad, Allahabad.

In the synthetic mixture containing citric acid as the source of carbon with aromatic hydrocarbon anthracene as catalyst showed 0·2990 mg/100 ml. of fixation of molecular nitrogen. When fluorene was used as catalyst instead of anthracene fixed 0·3310 mg./100 ml of molecular nitrogen. In the similar mixture with naphthalene as catalyst fixed 0·1600 mg/100 ml of molecular nitrogen. All the mixtures showed the formation of amino acids both in light and dark. The amino acids formed in light mixture was more than dark mixture.

नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण के समय अमीनो अम्लों के प्रकाशसंश्लेषण की घटना का सर्वप्रथम प्रदर्शन बहादुर तथा सहयोगियों[1] द्वारा उस निर्बीजित जलीय मिश्रण में जिसमें पैराफार्मैल्डीहाइड तथा कोलायडीय मालिब्डनम आक्साइड थे, किया गया। बहादुर तथा अग्रवाल[2] ने विभिन्न अकार्बनिक उत्प्रेरकों के द्वारा आणविक नाइट्रोजन का प्रकाश रासायनिक स्थिरीकरण प्रदर्शित किया।

सन् १९६३ में बहादुर तथा रंगनायकी[3] ने यह सूचित किया कि उस जलीय मिश्रण में जिसमें कार्बन के स्रोत के रूप में टार्टरिक अम्ल प्रयुक्त हुआ था और फ्लोरीन उत्प्रेरक के रूप में था उसे सूर्य प्रकाश द्वारा किरणीभवन करने पर कई अमीनो अम्ल निर्मित हुए। पाण्डेय[4] ने विभिन्न ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बनों को व्यवहृत करते हुए ऐसे ही प्रयोगों द्वारा अमीनो अम्लों के साथ ही पेप्टाइडों का निर्माण होते देखा।

प्रस्तुत शोधपत्र में कतिपय बहुनाभिकीय ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बनों को उत्प्रेरक की भाँति प्रयुक्त करते हुए नाइट्रोजन के प्रकाश-रासायनिक स्थिरीकरण एवं अमीनों अम्लों के प्रकाश-संश्लेषण में उनके प्रभावों का अध्ययन दिया गया है। जिन तीन ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बनों का प्रयोग किया गया वे हैं ऐंथ्रासीन, नैप्थलीन तथा फ्लोरीन। मिश्रण में सिट्रिक अम्ल को कार्बन स्रोत के रूप में व्यवहृत किया गया।

प्रयोगात्मक

प्रयोगों के लिए विशुद्ध सिट्रिक अम्ल एवं उत्प्रेरक चुने गये। सभी मिश्रणों को पूर्ण काँच यन्त्र में तैयार किये गये आसवित जल में बनाया गया।

अनुप्रभाव के लिए संश्लिष्ट मिश्रण की तैयारी

निम्न संघटन वाले नौ मिश्रणों को 250 मिली० के पलिघों में प्रत्येक सेट के लिए तैयार किया गया:—

सिट्रिक अम्ल	1.000 ग्राम
उत्प्रेरक	0.020 ग्राम
जल	100 मिली०

इन पलिघों को शल्य रुई की ढाठ से बन्द करके 15 पौंड दाब पर 30 मिनट तक निर्बीजित किया गया। इन पलिघों के मुहों को पालीथीन तथा चिपकने वाले फीते से बन्द कर दिया गया। प्रत्येक सेट के चार पलिघों को काले कपड़े की कई परतों से आच्छादित किया गया, चार अन्य पलिघों को बिना आच्छादित किये छोड़ दिया गया और शेष एक पलिघ को नियन्त्रण के रूप में रखा गया। प्रतिदिन 8 घंटे तक सूर्य प्रकाश में रखते हुए 300 घंटों के अनुप्रभाव के पश्चात् संश्लिष्ट मिश्रण को आणविक नाइट्रोजन स्थिरीकरण ज्ञात करने के लिए जेल्डाल विधि द्वारा विश्लेषित किया गया।

अमीनो अम्लों की पहचान द्वि-मार्गी आरोही पत्र क्रोमैटोग्राफीय विधि द्वारा की गई। पेप्टाइडों की पहचान के लिए मिश्रण को पहले *1N* HCl द्वारा जलविश्लेषित कर लिया गया और फिर क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण करके रचक अमीनों अम्लों के धब्बे ज्ञात किये गये। जिन विलायकों का व्यवहार हुआ वे थे फीनोल: जल (80 : 20) तथा ब्यूटैनाल : एसीटिक अम्ल : जल (120 : 30 : 50)। व्यक्तकारी अभिकर्मक के रूप में 0.2% निनहाइड्रिन विलयन से सिक्त व्हाटमैन न०1 फिल्टर पत्र प्रयुक्त हुआ। जलविश्लेषण की क्रिया *1N* HCl के द्वारा सील की हुई उदासीन कठोर काँच की नली में 24 घंटे तक उबलते हुए जल में रखकर सम्पन्न की गई। जलविश्लेषित मिश्रण को निर्वात डेसीकेटर में सुखाया गया।

विवेचना

जिस मिश्रण में कार्बन स्रोत के रुप में सिट्रिक अम्ल था और उत्प्रेरक के रूप में ऐंथ्रासीन था उसमें 300 घंटे तक सूर्य प्रकाश के अनुप्रभाव के पश्चात् प्रति 100 मिली० में 10.2990 मिग्रा० नाइट्रोजन का स्थिरीकरण देखा गया। इसी मिश्रण के क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण से जल अविश्लेषित तथा जल विश्लेषित दोनों ही अवस्थाओं में अमीनो अम्लों के पाँच निनहाइड्रिन धब्बे प्राप्त हुए। पहचान करने पर यह अमीनो अम्ल ऐस्पैर्टिक अम्ल, ग्लुटैमिक अम्ल, वैलीन, ल्यूसीन निकले तथा एक बिना पहचान किया धब्बा भी मिला।

बिना अनुप्रभावित मिश्रण में जलविश्लेषित तथा जल अविश्लेषित दोनों ही दशाओं में तीन अमीनो अम्लों के धब्बे प्राप्त हुए जो पहचान के बाद ऐस्पार्टिक अम्ल, ग्लुटैमिक अम्ल तथा वैलीन सिद्ध हुए।

फ्लोरीन को उत्प्रेरक के रूप में प्रयुक्त करने पर उपयुक्त दशाओं में 0.3310 मिग्रा० नाइट्रोजन स्थिर हुआ। अनुप्रभावित मिश्रण के क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण से जिन पाँच अमीनो अम्लों के धब्बे देखे गये। उनकी पहचान करने पर ग्लुटैमिक अम्ल, वैलीन, सेरीन, हाइड्राक्सिप्रोलीन तथा अनपहचाना धब्बा निकले। बिना अनुप्रभावित मिश्रण से तीन निनहाइड्रिन धब्बे प्राप्त हुए जिनकी पहचान करने पर वे ग्लुटैमिक अम्ल, वैलीन तथा हाइड्राक्सिप्रोलीन के निकले।

नैप्थलीन को उत्प्रेरक की भाँति प्रयुक्त करने पर उन्हीं दशाओं में 0.1600 मिग्रा० नाइट्रोजन स्थिर हुआ। अनुप्रभावित मिश्रण के क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण से जलविश्लेषित एवं जलअविश्लेषित दोनों ही दशाओं में चार निनहाइड्रिन धब्बे देखे गये जिनकी पहचान करने पर वे ग्लुटैमिक अम्ल, वैलीन, ल्यूसीन तथा अनपहचाना धब्बा निकले। बिना अनुप्रभाव वाले मिश्रण में जिन तीन अमीनो अम्लों के धब्बे देखे गये वे पहचान करने पर ग्लुटैमिक अम्ल, वैलीन तथा सिरीन सिद्ध हुए।

इन परिणामों से यह स्पष्ट हो जाता है कि नाइट्रोजन स्थिरीकरण में ऐरोमैटीय हाइड्रोकार्बन अत्यन्त सक्षम हैं। उनकी क्षमताओं में निम्न क्रम पाया गया :—

फ्लोरीन > ऐंथ्रासीन > नैप्थलीन

सारणी 1

प्रयुक्त उत्प्रेरक—ऐंथ्रासीन

ताप में परिवर्तन 22°-40° से० अनुप्रभाव काल 300 घंटे

क्रमांक	दशा	मिश्रण से निस्सृत अमोनिया के उदासीनीकरण के लिए आवश्यक $N/46{\cdot}6$ H_2SO_4 का आयतन (मिली०)	सांख्यिकीय माध्य	मिश्रण में उपस्थित नाइट्रोजन (मिग्रा०)	प्रकाश द्वारा स्थिर नाइट्रोजन (मिग्रा०)
1	प्रकाश	6·20			
2		6·20	6·25±0·0498	1·9229±0·0014	
3		6·40			
4		6·20			+0.2990
5	अंधकार	5·40	5·4±0·0816	1·6230±0·0816	
6		5·20			
7		5·60			
8		5·40			
9	नियंत्रण	3·30		1·5920	

टिप्पणी (1) 100 मिली० मिश्रण में प्रकाश में स्थिर नाइट्रोजन =0·2990 मिग्रा०

(2) मध्यम अनुमापन मान 0.85 से सार्थकता गुणक 0·2875 न्यून है अतः यह फल सांख्यकीय रूप से सार्थक है

क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण

अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ऐस्पैटिक अम्ल+ग्लुटैमिक अम्ल+वैलीन+ल्यूसीन+बिना पहचाना धब्बा।

जल विश्लेषित : ऊपर की ही भाँति।

अन अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ऐस्पैटिक अम्ल+ग्लुटैमिक अम्ल+वैलीन

जल विश्लेषित : ऊपर की भाँति।

नियन्त्रण पलिघ में कोई धब्बे नहीं मिले।

सारणी 2

प्रयुक्त उत्प्रेरक—फ्लोरीन

शेष दशायें सारणी 1 की भाँति

क्रमांक	दशा	मिश्रण से निस्सृत अमोनिया के उदासीनीकरण के लिए आवश्यक N/46·6 H_2SO_4 का आयतन (मिली०)	सांख्यिकीय माध्य	मिश्रण में उपस्थित नाइट्रोजन (मिग्रा०)	प्रकाश द्वारा स्थिर नाइट्रोजन (मिग्रा०)
1	2	3	4	5	6
1	प्रकाश	5·50	5·52±0·0629	1·6590±0·0189	
2		5·40			+0·3310
3		5·20			
4		5·50			
5	अंधकार	4·40	4·42±0·0476	1·2280±0·0143	
6		4·50			
7		4·50			
8		4·30			
9	नियन्त्रण	4·30		1·2920	

टिप्पणी: (1) 100 मिली० मिश्रण में प्रकाश में स्थिर नाइट्रोजन=0·3310 मिग्रा०।

(2) सार्थकता गुणक 0·2374 है जो माध्य अनुमापन मान से न्यून है अतः परिणाम सांख्यिकीय रूप से सार्थक हैं।

क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण

अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल+सेरीन+वैलीन+हाइड्राक्सि प्रोलीन+अनपहचाना धब्बा।

जल विश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल+सिरीन+वैलीन+हाइड्राक्सि प्रोलीन+अनपहचाना धब्बा।

अन अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल+वैलीन+हाइड्राक्सि प्रोलीन।

जल विश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल+वैलीन+हाइड्राक्सि प्रोलीन।

नियन्त्रण पलिघ में कोई धब्बा नहीं मिला।

सारणी 3

प्रयुक्त उत्प्रेरक—नैप्थलीन

शेष दशायें पूर्ववत्

1	2	3	4	5	6
1	प्रकाश	7·70			
2		7·70	7·80±0·0408	2·344±0·0122	
3		7·80			
4		7·80			+0·1600
5	अंधकार	7·20	7·27±0·0251	2·1840±0·0075	
6		7·30			
7		7·30			
8		7·30			
9	नियन्त्रण			2·1330	

टिप्पणी (1) 100 मिली० मिश्रण में स्थिर नाइट्रोजन=0·1600 मिग्रा०

(2) सार्थकता गुणक 0·1438 है जो माध्य अनुमापन मान 0·53 से न्यून है अतः सांख्यिकीय रूप से फल सार्थक है।

क्रोमैटोग्राफीय विश्लेषण

अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल+वैलीन+ल्यूसीन+अनपहचाना धब्बा।

जल विश्लेषित : उपरिवत्।

अन अनुप्रभावित मिश्रण

जल अविश्लेषित : ग्लुटैमिक अम्ल + वैलीन + ल्यूसीन ।

जल विश्लेषित : उपरिवत् ।

नियन्त्रण पलिघ में कोई धब्बे नहीं मिले ।

निर्देश

1. बहादुर, के०, रंगनायकी, एस० तथा सेंटामेरिया, एल० । **नेचर**, 1958, **182**, 1668 ।
2. अग्रवाल, के० एम० एल० । **डी० फिल० थीसिस, इलाहाबाद विश्वविद्यालय,** 1963.
3. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **जर्न० जन० केमि०**, 1963, **33**.
4. पाण्डेय, आर० एस० । **डी० फिल० थीसिस, इलाहाबाद विश्वविद्यालय,** 1964

आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी नवीन धारणा

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी

रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

1966, भाग 9, संख्या III, पृ० 117-126 से पुनर्मुद्रित

New approach to molecular or chemical evolution

By

K. Bahadur and S. Ranganayaki

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1966, Vol. 9, Part III, Pages 117-126

(*Reprinted from Nature, Vol.* 173, *p.* 1141, *June* 12, 1954)

Photosynthesis of Amino-Acids from Paraformaldehyde and Potassium Nitrate

THE role of light in the synthesis of amino-acids and proteins in plants is still not very clear[1]. Previously it was believed that, in higher plants, synthesis of proteins is confined to the leaves[2] and might depend on light. It has been known that proteins are formed in leaves when there is an adequate supply of carbohydrates, and there is some evidence that the rate of protein synthesis in leaves is greater in the light than in the dark[3].

The parent substance from which higher plants derive their nitrogen is nitrate. This nitrate is reduced to nitrite in the roots and stem of plants. Schimper[4] has found that nitrites are always present in the living leaf in the dark and they disappear in the light.

I have now been able to synthesize amino-acids from paraformaldehyde and potassium nitrate with the help of light.

Three groups of three solutions each were prepared. Group 1 solutions contained 2 gm. of paraformaldehyde, and 1 c.c. of 6 *N* ferric chloride each. To the three solutions were added 1 gm., 0·5 gm. and 0·25 gm. of potassium nitrate respectively. The solutions were kept in 250 c.c. Sigcol beakers and 100 c.c. of distilled water was added in each. All three were exposed to bright sunlight for 80 hr. The temperature variation during the exposure was between 18° and 23·5° C.

A similar group of three solutions was kept in the dark. The third group, which was similar to the others but contained no ferric chloride, was kept in sunlight.

After an exposure of 80 hr. the solutions were tested for the presence of amino-acids by Giri's circular paper chromatography method[5,6] using butanol – acetic acid – water as solvent and ninhydrin as the developing reagent for producing colours with amino-acids.

Many of these amino-acids were qualitatively separated and their identification confirmed by circular paper chromatography as described by Giri, Krishnamurthy and others[7].

The solutions kept in the dark did not show the presence of amino-acid. Those containing no ferric chloride but kept in the light showed the formation of a few amino-acids, but the rings were very faint and no definite conclusion could be drawn. The

solutions containing ferric chloride and kept in the light showed the formation of definite rings.

Among the solutions containing ferric chloride kept in the light, that containing 1 gm. of potassium nitrate gave rings identified as due to asparagine, serine, arginine and proline. However, two rings, one pale yellow of relative R_F 0·34 and another deep yellow of relative R_F 0·39, are also seen, which could not be identified. The solution which contained 0·5 gm. of potassium nitrate showed the presence of asparagine, arginine, serine, proline and ornithine. The solution which contained only 0·25 gm. of potassium nitrate showed the presence of valine, histidine, proline, lysine, serine, aspartic acid, glycine, asparagine and arginine. There also appeared a light yellow ring of relative R_F 0·57 and a dark yellow ring of relative R_F 0·43, neither of which could be identified.

All the three solutions containing ferric chloride and kept in the light became strongly acidic on exposure and their *p*H varied between 1 to 0·8. The solutions containing no ferric chloride and kept in the light had *p*H between 4·5 to 4·8 at the end. The solutions kept in the dark had *p*H about 6.

An attempt to separate these amino-acids from the mixture containing 0·25 gm. of potassium nitrate was made by circular paper chromatography, and crystalline serine, aspartic acid, glycine and asparagine were separated; only a few crystals of each were obtained. Attempts to separate histidine, arginine, lysine and proline have met with little success so far. Quantitative separation of these amino-acids will be undertaken shortly.

Preliminary analyses of only three of the separated amino-acids have been done so far.

Serine. On boiling with sulphuric acid it gave ammonia and pyruvic acid[8]:

$$OHCH_2—CH(NH_2)COOH \rightarrow CH_2=C(NH_2)—COOH \rightarrow CH_3—C(=NH)—COOH \rightarrow CH_3.CO.COOH + NH_3.$$

The amino-acid gave glyceric acid and a small quantity of acetaldehyde on treatment with nitrous acid. It was oxidized to glycolaldehyde[9] with periodic acid[10].

Aspartic acid. It formed a barium salt which was insoluble in alcohol. The acid did not pass over into pyrrolidone carboxylic acid in hot aqueous solution. This distinguishes it from glutamic acid[11]. The acid yields nitrogen on treating with nitrous acid.

The amino-acid gave a benzoyl derivative of melting point 162° C. and hydantoic acid, melting point 162° C.

Asparagine. On boiling the crystals of asparagine with hydrochloric acid, DL-aspartic acid was obtained.

On boiling with dilute alkali, it yielded ammonia and DL-aspartic acid. It gave a picrate which decomposed at 175° C.; it produced α-naphthylhydantoic acid, melting point 199° C.

KRISHNA BAHADUR

Chemistry Department,
Allahabad University,
Allahabad.

[1] Stiles, W. S., "Photosynthesis", 203 (Longmans, Green and Co., London, 1925).
[2] Pfeffer, W., "The Physiology of Plants", 1 (Oxford, 1900).
[3] "Photosynthesis", 220 (Chemical Catalog Co., New York, 1926).
[4] Schimper, *Bot. Z.*, **45**, 65 (1888).
[5] Giri, K. V., *Current Sci.*, **20**, 258 (1951).
[6] Giri, K. V., and Prasad, A. L. N., *Nature*, **168**, 786 (1951).
[7] Giri, K. V., Krishnamurthy, K., and Venkitasubramanian, T. A., *Current Sci.*, **21**, 11 (1952).
[8] Bettzieche, *Z. physiol. Chem.*, **150**, 177 (1925).
[9] Nicolet and Shinn, *J. Amer. Chem. Soc.*, **61**, 1615 (1929).
[10] Folch and Schneider, *J. Biol. Chem.*, **137**, 15 (1941).
[11] Foreman, *Biochem. J.*, **8**, 461, 481 (1914).

Printed in Great Britain by Fisher, Knight & Co., Ltd., St. Albans.

विज्ञान परिषद् अनुसंधान पत्रिका
1966, 9, 117-126

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1966, 9, 117-126

आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी नवीन धारणा

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी
रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

[प्राप्त—अप्रैल 2, 1966]

सारांश

जीवित प्रणाली के सर्वप्रथम उदय होने के पूर्व आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी धारणा के सम्बन्ध में कुछ कारण प्रस्तुत किये गये हैं। विकासवाद की यह धारणा बिना प्राकृतिक वरण अथवा अनुकूलन के भ्रामक है। प्राकृतिक वरण न तो पुराने और न नये माडलों के निर्माण सम्बन्धी नियमों को लाद ही सकता है वह स्वतः पुनरावृतिकारी प्रणाली का निर्माण कर ही नहीं सकता। यह तभी प्रभावशाली हो सकता है। जब कुछ विचलन एवं अनुकूलन के गुणधर्मों से सम्पन्न स्वतः प्रतिकृतिकारी प्रणालियाँ उपस्थित हों। अनुकूलन एवं गुणन पदार्थ के मूलभूत गुणधर्म हैं जिनका प्रेक्षण उपयुक्त अवस्थाओं के अन्तर्गत किया जा सकता है। गत्यात्मक सन्तुलन पर सूक्ष्म अणुओं से बनी हुई रसायनों की प्रणाली उपयुक्त दशाओं में ऐसी वस्तुयें निर्मित कर सकती है जिनमें वृद्धि, गुणन तथा उपापचयन सक्रियता के गुणधर्म प्रदर्शित होते हों। ऐसे पदार्थों में अनुकूलन का गुण विद्यमान रह सकता है। इनमें आकारीय लक्षण हो सकता है और ये संवर्द्ध में संवर्द्धित किये जा सकते हैं। जीवाणु ऐसे ही पदार्थ हैं।

आणविक अथवा रासायनिक विकास पहले तो आणविक समुदायों के रूप में प्रकाशीय सूक्ष्मदर्शी के परास से परे और बाद में माइक्रानों के आकार में प्रगतिशील रहा।

ऐमीनो अम्ल तथा पेप्टाइडों से निर्मित जीवाणुओं ने विकास के फलस्वरूप कोशीय जीवित प्रणाली का रूप ग्रहण किया और इस प्रकार जीवित प्राणालियों के निकटतम पूर्व-उत्पादक बने।

Abstract

New approach to molecular or chemical evolution. *By* K. Bahadur and S. Ranganayaki, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

The reasons for the concept of molecular or chemical evolution preceding the appearance of the earliest living system have been discussed. This concept of evolution without natural selection or adaptability is misleading. Natural selection can neither impose rules for the formation of an old or new models, least the formation of a self-replicating system and it can be effective only when self-replicating systems with

slight variations and with properties of adaptability are present. Adaptability and multiplication are the inherent properties of matter and these can be observed under suitable conditions. A system of chemicals at dynamic equilibrium and made of smaller molecules could under appropriate condition form objects which showed the properties of growth, multiplication and metabolic activity in biological sense. These objects have property of adaptability so could evolve. These have morphological look and can be subcultured in appropriate environmental medium. Jeewanu are such objects.

The molecular or chemical evolution was in progress first in molecular associations beyond the range of optical microscope and later in the size of microns.

Jeewanu which were made of amino acid and peptides on evolution formed cellular living system and were thus the immediate precursors of our living systems.

बीसवीं शती में पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति की समस्या ने नवीन प्रकार की शोधों को जन्म दिया है और प्रथम कोशों की उत्पत्ति के पहले आणविक या रासायनिक विकास की धारणा ऐंगेल्स[1], मिचेल[2], ओपैरिन[3], कैल्विन[4] तथा अन्य अनेक वैज्ञानिकों के सोचने के फलस्वरूप बनी है। सर्वप्रथम 1926 ई० में रूस की वनस्पति परिषद् की एक बैठक में ओपैरिन ने वास्तविक जीवित प्रणालियों की उत्पत्ति के पूर्व ही पृथ्वी पर आणविक विकास के विचार को स्पष्ट कर दिया था। तब से उन्होंने इस विचार को काफी विकसित किया और उसे अपनी पुस्तक "जीवन का उदय" में बराबर स्थान देते आये हैं। ठीक इसी प्रकार का विचार करने के पश्चात् कैल्विन[4] ने प्रथम जीवित प्रणाली के पूर्व रासायनिक विकास सम्बन्धी विचार विस्तुत किया है। बर्नाल[5] का सुझाव है कि प्रथम जीवित प्रणाली के अस्तित्व में आने के बहुत पूर्व ही रासायनिक उपापचयन अग्रसर होकर पूर्णता प्राप्त कर रहा था।

ऐसे विचारों के लिये जो प्रमुख कारण उत्तरदायी थे उनमें प्रथम यह था कि कोश में जो अणु विद्यमान हैं वे आकृति में बड़े एवं संरचना में जटिल हैं। प्रकृति में ऐसे अणुओं की उत्पत्ति ऐसे ही नहीं हो सकती। सरल अणुओं से ऐसे अणुओं के बनने के लिये किसी न किसी प्रकार की पूर्ण प्रक्रिया की आवश्यकता होगी। दूसरे यह कि जब से पृथ्वी जीवित प्रक्रमों को धारण करने के लिये अनुकूल हुई उस काल से लेकर उस काल के बीच जबकि जीवित प्रणालियों के चिन्ह ढूंढ़ निकाले गये हैं काफी अवकाश है अतः इस अवकाश में जीवित प्रणालियों के न पाये जाने का कारण यही हो सकता है कि इस अवधि में कोई पूर्ण प्रक्रिया क्रियाशील रही हो जो अन्त में जीवित प्रणाली में परिणत हो गई हो और इसके पूर्व पूर्णता को प्राप्त न हुई हो। सामान्यतः जीवन की उत्पत्ति सम्बन्धी मान्य काल प्रायः $2{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्ष पूर्व है किन्तु पृथ्वी पर जल तथा वायुमण्डल का अस्तित्व प्रायः 4×10^{12} वर्षों से है। इस प्रकार से आणविक विकास के अग्रसर होने के लिये काफी समय मिला होगा जिसके कारण प्रायः $1{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्षों तक पृथ्वी में जीवित प्रणालियों का अभाव रहा होगा।

फिर भी इन दोनों तर्कों में दोष हैं। सर्वप्रथम तो यह कि हमें यह पता ही नहीं है कि कोशा में पाये जाने वाले यौगिक जिनसे हम परिचित हैं वे पहले पहल प्रकृति में निर्मित होकर प्रारम्भिक कोशाओं

में सम्मिलित हो गये अथवा वैकल्पिक रूप में यह कि विकास की अवधि में ये यौगिक कोशाओं के ही भीतर निर्मित हुये और प्रारम्भिक कोशाओं को निर्मित करने वाले यौगिकों से ये सर्वथा भिन्न हैं। ये दोनों ही तर्क समान रूप से सम्भव हैं। पृथ्वी की प्रारम्भिक अवस्था में जैसी परिस्थितियाँ थीं उनके अन्तर्गत इन पदार्थों के बन जाने की सम्भावना से इस बात की पुष्टि नहीं मानी जा सकती है ये उत्पन्न हुये ही होंगे और ऐसे यौगिक जो इन अवस्थाओं में प्रकृति में उत्पन्न हो सकते हैं किन्तु कोशा के भीतर उपस्थित नहीं हैं उनकी संख्या अधिक होगी। दूसरे यह कि वह काल जब कि सर्वप्रथम जीवित प्रणालियों का उदय हुआ पूर्वअनुमानित काल से काफी पहले सरक सकता है। बर्नाल[5] तो इस काल को $3{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्ष पूर्व तक पछेल देने के पक्ष में हैं जिस काल में भूपर्पटी पिघली भर थी[6]—चाहे वह उस समय गरम पिंड के रूप में थी अथवा ठंडे पदार्थ कणों के संघनन अवशेष के रूप में रही हो[7-8-9]।

किन्तु आणविक या रासायनिक विकास पद का व्यवहार बारम्बार होता रहा है। जब तक पूर्ण स्व-प्रतिकृतिक मशीन तैयार न हो ले प्राकृतिक वरण द्वारा विकास की ऐसी कल्पना कर पाना कठिन है जिसे हम व्यवहार में लाये जाने वाले विकास पद का सच्चा रूप कह सकें। जैसा कि ब्लम[10] ने प्रस्तावित किया है कि यह आवश्यक निर्देश है क्योंकि जीवित प्रणालियों की उत्पत्ति के सम्बन्ध में विचार करते समय त्रुटि हो सकती है क्योंकि प्रत्यक्ष या अप्रत्यक्ष रूप से कभी-कभी प्राकृतिक वरण पद का व्यवहार त्रुटि-वश ऐसी वस्तुओं की उत्पत्ति के लिये किया जाता है जो प्राकृतिक वरण द्वारा विकास के पूर्व भी विद्यमान थीं।

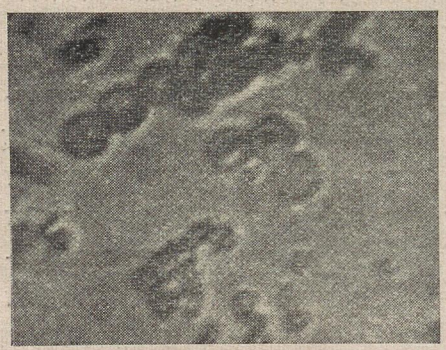
यदि कतिपय अणुओं के निर्माण सम्बन्धी विचारों के लिये कुछ हद तक रासायनिक रूपान्तरों की आवश्यकता पड़े तो रासायनिक विकास के स्थान पर रासायनिक रूपान्तर पद का व्यवहार किया जा सकता है। ऐसे रासायनिक रूपान्तर ऊष्मागतिकीय तथा गतिज मान्यताओं के अनुसार अग्रसर हो सकते हैं और इनके साथ विकास सम्बन्धी किसी भी प्रकार की विचारधारा को, यहाँ तक कि दूरतम प्रसंग में भी, सम्मि-लित नहीं किया जा सकता। ऐसे रासायनिक रूपान्तरों के लिये केवल ऊष्मागतिकीय एवं गतिज विचार ही आवश्यक होंगे, प्रतिकृतिक प्रकार के सूचक किसी भी त्रिविमीय अवयव की आवश्यकता नहीं है। इससे निर्जीव प्रणालियों के सामान्य रासायनिक रूपान्तर एवं जीवित प्रणाली के विकासमान अनुकूलनों में स्पष्ट अन्तर हो जाता है।

ऊष्मागतिकी मान्यताओं के अनुसार समय के बढ़ने के साथ ही ऐसे निर्जीव रासायनिक रूपान्तरों के ऐन्ट्रापी में वृद्धि होगी जिससे सुसंयोजित ढाँचा बनने के बजाय अनिश्चितता की दशा प्राप्त होगी। यदि जीवन की उत्पत्ति होनी ही हो तो कोई न कोई व्यवस्थित प्रक्रम अवश्य रहता किन्तु ऐसे प्रक्रम का होना आणविक या रासायनिक विकास सम्बन्धी आधुनिक विचारधारा द्वारा तब तक विवेचित नहीं हो पाता जब तक कि द्रव्य में कुछ ऐसी अतिरिक्त विशिष्टतायें न हों जिनका उल्लेख आगे किया जा रहा है। अप्रत्यक्ष रूप से ऐसा विचार किया जाता है कि एक बार अवयवी अणुओं का मिश्रण उपस्थित हो जाय तो जीवन का स्वतः उदय एवं विकास होने लगेगा।

आज की कोशाओं के कई अंग हैं—यथा क्लोरोप्लास्ट जो प्रकाश संश्लेषण में सहायता करते हैं; माइटोकोण्ड्रिया जो उपापचयन को नियन्त्रित करने वाले ऐंजाइमी-परिवर्तनों को लाते हैं, माइक्रोसोम जो

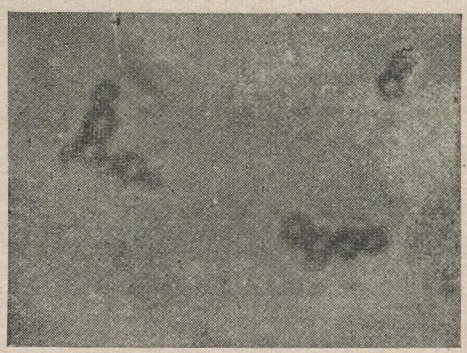
प्रोटीन तथा कतिपय राइबोन्यूक्लिक अम्लों का संश्लेषण करते हैं एवं डेसाक्सीराइबोज न्यूक्लिक अम्ल युत क्रोमोसोम आदि। किन्तु ये सभी उस विशिष्ट स्थिति के ही सूचक हैं जो प्रारम्भ में आणविक संयोजन के फलस्वरूप सर्वसत्ता-जीवित प्रणाली के रूप में थी न कि किसी एक न्यूक्लिक अम्ल के अणु को जो अपने में कुछ भी नहीं है[5]।

प्रकाश रासायनिक विधि से संश्लिष्ट जीवाणु का माइक्रोग्राफ। आवर्धन $\times 1500$



Micrograph of Jeewanu synthesised photochemically, mag. $\times 1500$

जीवाणु का माइक्रोग्राफ जिसमें कलिकायें प्रदर्शित हैं। आवर्धन $\times 1000$



Micrograph of Jeewanu showing buddings, mag. $\times 1000$.

जीवाणु का माइक्रोग्राफ जिसमें सीमा-भित्ति तथा आन्तरिक संरचनायें प्रदर्शित हैं। आवर्धन $\times 2000$



Micrograph of Jeewanu showing the boundary wall and internal structures mag. $\times 2000$.

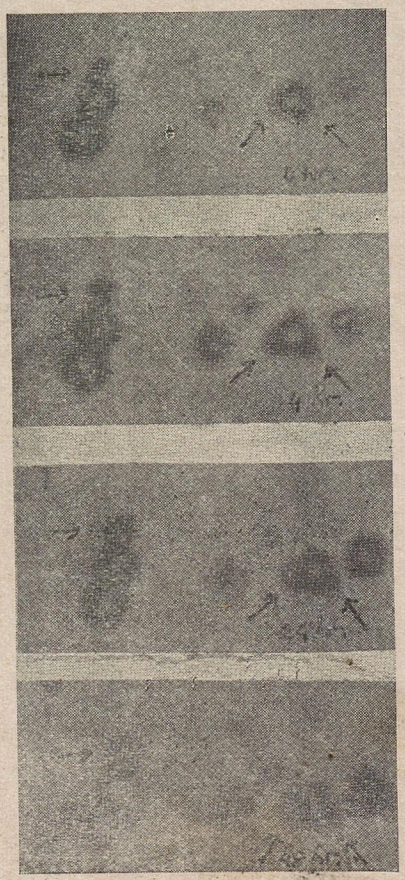
कलिका-यत जीवाणु का माइक्रोग्राफ़ 1500 गुना आवर्धित



Micrograph of a Jeewanu with a bud (photographed at 1500 mag. and highly magnified).

वर्तमान जीवित प्रणालियों में आनुवंशिक पितृ से सन्तानों तक न्यूक्लिक अम्ल द्वारा स्थानान्तरित होता है । अनुक्रम परिकल्पना (sequence hypothesis) से यह अनुमोदन होता है कि न्यूक्लिक अम्ल अणुओं में आनुवंशिक (genetic) सूचनायें संग्रह रहती हैं और ये रैखिक रूप में प्रेषित होती हैं। इसे प्रोटीन में पाये जाने वाले ऐमीनो अम्लों के अवशेषों के रैखिक क्रम द्वारा व्यक्त किया जाता है। यह सूचना केवल एक दिशा में प्रेषित की जाती है अर्थात् न्यूक्लिक अम्ल के आधार अनुक्रम (base sequence(से प्रोटीन अणुओं के ऐमीनो अम्ल तक। क्रिक[11] ने प्रमाण प्रस्तुत किये हैं कि प्रोटीन की त्रिविमीय संरचना, प्रोटीन अणुओं के भीतर एंव परिवेश के अणुओं की प्रति क्रियायें (interaction) तथा प्रोटीन के समूहन की क्रियायें अवयवी ऐमीनों अम्लों की विशिष्ट व्यवस्था के कारण हैं। ऐसे काल निरपेक्ष शब्दकोश के संग्रह का कार्य चालू है जो न्यूक्लिक अम्ल आधारों के अनुक्रम को व्यक्त कर सके जो प्रोटीन में विशिष्ट ऐमीनो अम्लों में प्रेषित होते हैं [12–16]।

जीवाणु में कालिकाओं का निर्माण एवं वृद्धि को दिखाने वाले माइक्रोग्राफ, आवर्धन × 1500



Time-lapse micrograph showing formation of buds and their growth in Jeewanu, mag. × 1500.

किन्तु किसी भी पुनरावृत्ति एवं प्रोटीन संश्लेषण के आधुनिक सिद्धान्त द्वारा आनुवंशिक पाठ की उत्पत्ति प्रस्तावित नहीं होती जो क्रियात्मक प्रोटीनों में प्रतिकृति, अनूदित तथा व्यक्त होती हो। अनुकृत, कोडिंग (संकेतन) तथा प्रोटीन संश्लेषण की अनुकृति के अधिकांश सिद्धांत जैविक वृहद अणुओं की उप-इकाई के अनुक्रम में किसी प्रकार के नियम, नियन्त्रण या सम्भवन का अभाव देखते हैं जब तक कि आनु-वंशिक अनुक्रम में कोई ऐसा क्रम पहले से विद्यमान न हो[17]।

सामान्यतः आनुवंशिकीविदों का विश्वास है कि इस आनुवंशिक क्रम की उत्पति, जो न्यूक्लिक अम्ल में आधारों के रेखीय अनुक्रमों के रूप में पाया जाता है यादृच्छिक, कल्पित त्रुटियों की स्मृति में प्राकृतिक वरण के विकासमान प्रक्रम के रूप में अथवा किसी पहले से विद्यमान अनुक्रम की पुनरावृति के रूप में अथवा पुनर्जनन के प्रक्रम में अनुक्रमों के मिश्रण के फलस्वरूप हुई होगी। आनुवंशिक क्रम का प्रारम्भिक उदय उप-इकाइयों के संयोजन के फवस्वरूप हुआ माना जाता है जो आज्ञात कारणों से स्वतः आवृति करने में समर्थ

हो सका। यह प्राकृतिक वरण की विचार-धारा का गलत प्रयोग है। प्राकृतिक वरण का सिद्धान्त ऐसी इकाइयों से जो अनुकृति में समर्थ हैं उनमें से अन्ततः चुनाव करने को दर्शाता है। यह संश्लेषण के समय किसी विशिष्ट क्रम के होने के सम्बन्ध में किसी नियम को निर्धारित नहीं करता और पुनर्जनन की क्षमता के सम्बन्ध में तो बिल्कुल ही नहीं।

मुलर के अनुसार[18] गुणन, परिवर्तन, वरण तथा अनुकूलन के प्रक्रमों द्वारा आनुवंशिक सूचना उत्पन्न होती है जिससे किसी एक अनुक्रम का चुनाव होता है। किन्तु इनसे ऐसी आनुवंशिक सूचनायें ही संग्रहीत होती हैं जिससे विशिष्ट दशा का बोध होता है किन्तु प्रारम्भिक दशाओं में इस अवस्था को उत्पन्न करने के सम्बन्ध में किसी प्रकार की सूचना प्रदान नहीं करता।

विकास में अनुकूलन की घटना महत्वपूर्ण है और जीवित प्रणाली के लिए आवश्यक गुणधर्म मानी जाती है। जहाँ तक किसी प्रजाति के लक्षणों के परिवर्तन का प्रश्न है यह अनुकूलन विकास का महत्वपुर्ण पक्ष है और जितने भी परम्परागत अनुकूली विभिन्नता हैं वे विकासीय परिवर्तन हैं। किन्तु इसका विलोम कथन कि सभी विकासीय परिवर्तन अनुकूली हैं सत्य नहीं है।

विकास के दो प्रमुख पक्ष हैं। प्रथम तो वह जो परिवर्तनों द्वारा व्यक्त होता है और दूसरा वह जिससे नवीन प्रजातियों का जन्म होता है। अधिकांश विकासीय परिवर्तन प्रथम कोटि में आते है और ये वे परिवर्तन हैं जो किसी प्रजाति या प्रजाति के सदस्य में परिवेश के अनुसार होते हैं। इन्हीं परिवर्तनों से जनसंख्या का अस्तित्व बना रहता है। तब केवल प्राकृतिक वरण का क्रम चालू होता है। इसके द्वारा पितृ एंव शेष जनसंख्या में कोई असमानता नहीं आने पाती। असमानता के कारण ही प्राकृतिक वरण होता है। यदि क्रमिक मन्द परिवेशात्मक परिवर्तन होता है तो प्राकृतिक वरण के द्वारा जनसंख्या में अनुकूलन के परिवर्तन परिलक्षित हो सकते हैं।

इस प्रकार विकास को अनुकूलनों का सार-संकलन कहा गया है। इसे और सरल शब्दों में इस प्रकार कहा जा सकता है कि "अनुकूलन ही विकास है"।[19]

विभिन्न सदस्यों से बनी हुई जनसंख्या उसके द्वारा वहन की जाने वाली विभिन्न जीनों (genes) की आवृतियों में क्रमानुसार परिवर्तन के माध्यम से नये पिरविेश के अनुसार अपने को ढालती है। जीवाणवीय जनसंख्या जिसमें एकाकी जीन परिवर्तनों के द्वारा कतिपय परिवेशीय प्रतिबंध पूर्ण होते हैं तथा जहाँ संततियाँ पितृ के ही समान होती हैं वहाँ जनसंख्या का अनुकूलन एक ही पीढ़ी में पूरा हो जाता है। द्विगुणित संकर निषेचित सदस्यों में जीन पुनःसंयोजन के फलस्वरूप समलक्षणी पितृ एवं उसकी संततियों में जीवाणुओं की अपेक्षा कहीं न्यून सम्बन्ध देखा जाता है।

अनुकूलन की घटना को इस प्रकार व्यक्त किया जा सकता है: "यदि किसी जीवित प्रणाली पर प्रतिबन्ध लगाया जाय तो यदि सम्भव हुआ तो प्रणाली में ऐसा परिवर्तन घटित होगा जिससे वह प्रतिबन्ध समाप्त हो जाय।" कोई भी जीवित प्रणाली संतुलन में रहने वाली प्रणाली है। अतः अनुकूलन की उपर्युक्त परिभाषा को इस प्रकार संशोधित किया जा सकता है कि "यदि किसी संतुलन को प्राप्त प्रणाली पर प्रति-

बन्ध लगाया जाय तो प्रणाली के भीतर ऐसा परिवर्तन होगा जिससे यह प्रतिबन्ध दूर हो जाय'' किन्तु यह तो ल शतालिए का सिद्धान्त है जिसे उन्होंने रासायनिक संतुलन के लिये 1888 ई० में प्रस्तावित किया था।

इस प्रकार अनुकूलन न केवल रासायनिक सन्तुलन में पाया जाता है वरन् यह सन्तुलन को प्राप्त किसी भी प्रणाली में, जिसमें जीवित प्रणाली सम्मिलित है, पाया जाता है। बहादुर तथा सक्सेना[19] ने ऐंजाइम-माध्यमों में अनुकूलन की घटना का अवलोकन किया है। एंजाइमों में ऐसे भी अनुकूलन देखे गये हैं[20] जहाँ उबालने या विप्रकृतीकरण के द्वारा प्रोटीन अणुओं में अव्यवस्था आ जाती है किन्तु इस प्रभाव का शीघ्र ही निराकरण हो जाता है जिसमे नवीन अणुओं की सृष्टि न होकर अकुंडलित दशा से व्यवस्थित दशा प्राप्त हो जाती है। यह सूचित किया गया है कि ऐजाइम को निष्क्रिय बना कर यह दिखाया जा सकता है कि निष्क्रियता का कारण उन तृतीयक तथा चतुर्थक संरचनाओं का विनष्टीकरण है जो परस्पर संकुलित हैं किन्तु प्राथमिक संयोजकता द्वारा जुड़ी नहीं हैं। इस निष्क्रिय पदार्थ को उपयुक्त ताप पर रखने पर 95% ऐंजाइमी-सक्रियता पुनः प्राप्त की जा सकती है और तृतीयक तथा चतुर्थक संरचनायें पुनरुत्पादित हो सकती हैं[21]। इस प्रकार के विनष्टीकरण द्वारा प्राथमिक संरचना प्राप्त की जा सकती है और विपरीत दिशा में चलकर तृतीयक तथा चतुर्थक संयोजन तक पहुँचा जा सकता है। ऐल्डोलेक्स में इस दशा को पूर्णरूप से प्राप्त किया जा सकता है।[21]

इनमें से अनेक परिवर्तनों की विवेचना ऊष्मागतिकी स्थायित्व के द्वारा की जा सकती है। बहादुर तथा रंगनायकी[22,23] का अभिमत है कि किसी भी संतुलन प्राप्त प्रणाली में अनुकूलन का गुणधर्म निहित रहता है जिसकी अभिव्यक्ति ल शतालिए का सिद्धान्त है। किन्तु कोरे अनुकूलन के कारण विकास सम्भव नहीं। विकास के पूर्व प्रणाली में प्रतिकृति करने की क्षमता होनी अनिवार्य है। बहादुर तथा रंगनायकी[22, 23] के अनुसार उपर्युक्त दशाओं में द्रव्य में द्विगुणन की विशेषता निहित रहती है। बहादुर[24] के अनुसार क्वांटम यांत्रिकी संस्पंदन अन्तःक्रिया का स्थायित्व बल[25] ही द्रव्य के इस गुणधर्म को व्यक्त करता है। सर्वप्रथम जीवित प्रणाली अवश्य ही छोटे छोटे अणुओं से निर्मित रही होगी जिसमें आणविक अन्तःक्रिया बल संस्पंदन अतः क्रिया बलों से काफी लघु रहे होंगे। एक बार प्रतिरूपी आकृति (माडेल) बन जाने पर वह इस बल के द्वारा स्थिर हुई होगी जिससे और भी अनेक आणविक संरचनायें बनी होंगी। जब आणविक अन्तः क्रिया बल क्वांटम यांत्रिकी संस्पंदन अंतःक्रिया बलों से बलशाली होंगें तो दीर्घतर अणुओं से निर्मित प्रणाली का विकास लघुतर अणुओं से हुआ होगा और इस संधिकाल में न्यूक्लिक अम्ल द्वारा प्रेरित द्विगुणन क्रिया चालू हुई होगी। यह विचार-धारा बायपोएसिस (biopoesis) के अध्ययन की विकासवादी धारा से मेल खाती है।

गुणन तथा अनुकूलन के गुणधर्मों से युक्त द्रव्य द्वारा ऐसी प्रणालियों का जन्म होगा जो यदि सूक्ष्मतर अणुओं से बनी हों तथा खुली प्रणाली प्रकार के गतिशील संतुलन में हों तो वे वृद्धि, गुणन तथा उपापचयी सक्रियता प्रदर्शित करेंगी, उनमें अनुकूल का गुणधर्म होगा और उनमें विकास होगा। इस प्रकाश में आणविक या रासायनिक विकास जीवन तथा जीवित प्रणाली संश्लेषण में एक अनिवार्य अवस्था के रूप में पाई जावेगी। जहाँ कहीं भी आवश्यक दशायें प्राप्त हुई होंगी, वहीं आणविक समूह बनने के पूर्व भी द्रव्य का विकास होता

रहा होगा। बर्नाल[5] ने ऐसी उपापचयी इकाइयों के अस्तित्व की सम्भावना व्यक्त की है जो प्रथम जीवित प्रणाली के निर्माण के पूर्व रही होगी।

अन्ततः द्रव्य के द्विगुणन तथा अनुकूलन इन निहित गुणधर्मों के कारण सूक्ष्म आकार वाली वस्तुओं की उत्पति हुई जिनमें वृद्धि, पुनर्जनन तथा सक्रियता थी और वे अनुकूलन में समर्थ थे जिससे विकास हुआ। ऐसी इकाइयाँ का कृत्रिम संश्लेषण किया जा चुका है और इनका नाम "जीवाणु" रखा गया है। यह संस्कृत शब्द है जिसका अर्थ है जीव के कण[23]। इन इकाइयों को संवर्द्धित किया जा सकता है[27,23]। इनकी विशिष्ट आकारिकी होती है[27,29]। जीवाणु के प्रकाशरासायनिक उत्पति सम्बन्धी प्रयोगों को ब्रिग्स[30] ने स्वतन्त्र रूप से पुष्टि करते हुये उन्हें आगे बढ़ाया है।

निर्देश

1. ऐंगेल्स, एफ०। *Dialectics of Nature. Partizdat*, 1933।
2. मिचेल, पी०। **सिम्पो० सोसा० एक्सपे० बायो०,** 1954, **8,** 254।
3. ओपैरिन, ए० आई०। *The Origin of Life* **डोबर प्रकाशन, न्यूयार्क** 1953।
4. कैल्विन, एम०। **प्रोसी० 10वाँ इंटरने० बाट० काँग्रेस,** 1964, 41-56।
5. बर्नाल, जे० डी०। **ओसनिओ० अमे० एसोशि० एडवांसमेंट साइं०,** 1961, 95-118।
6. विनोग्रैडोव, ए० पी०। **चौथा इंटरने० सिम्पो०,** *Origin of Life on Earth*, **मास्को,** 1957, 23-3।
7. लेविन, बी० यू०। **प्रिरोडा, लेनिनग्राड,** 1949, **10,** 3।
8. वही। **इज्वे० एके० नाउक०, रूस,** 1953, **4,** 289।
9. वही। **इंटरने० सिम्पो०** *"Origin of Lif on Earth"* **मास्को** 1957, **परगैमन प्रेस,**1959, 67-75।
10. ब्लम, एच० एफ०। **अमे० साइंटिस्ट,** 1961, **49,** 474-501।
11. क्रिक, एफ० एच० सी०। **सिम्पो० सोसा० एक्सपे० बायोला०** *"On Protein Synthesis"* **गेट ब्रिटेन,** 1958, **12,** 138।

12. गैमो, जी०, रिच, ए०, यकुआस, एम०। *Advances in Biological and Medical Physics* एकेडमिक प्रेस, न्यूयार्क, 1956, 23।

13. क्रिक, ग्रिफिथ, तथा आर्गेल। प्रोसी० नेश० एके० साइं० (अमरीका), 1959, **43,** 416।

14. गोलोम्ब, एस० डब्लू०, वेल्च, एल० आर० तथा डल्ब्रेक, एम० के०। *Danske Vidensk, Selsk (Biol. Medd).* 1958, **23,** 9।

15. यकुआस, एम०। *Information Theory of Biology* परगैमन प्रेस, न्यूयार्क, 1958, 70।

16. वोसे, सी० आर०। बायोकेमि० तथा बायोफिजिक्स रिसर्च कम्यूनिकेशन, 1961, **5**, 88।

17. ब्रेनर, एस०। *The Mechanism of Gene action* जे०ए० चर्चिल लि०, लंदन, 1959।

18. मुलर, एच० जे०। बुले० अमे० मैथ० सोसा०, 1958, **64,** 137।

19. वैलेस, बी० तथा एड्रियन, एम०। *Adaptation.* प्रेंटिस हाल, नई दिल्ली, 1963

20. बहादुर, के० तथा सक्सेना, आई०। बायोलाजिया प्लैन्टारम, 1965, **7,** 86।

21. कैल्विन, एम० तथा कैल्विन, सी० जे०। अमे० साइंटिस्ट, 1964, **52,** 163-183।

22. जाबिन, आई०। *Proteins in Lectose System.* 1964।

23. बहादुर, के०, रंगनायकी, एस०। *Zbl. Bakt,* 1964, **117,** 567-74।

24. वही। विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका, 1963, **6,** 63।

25. बहादुर, के०। *Zbl. Bakt,* 1964, **118,** 671-94।

26. जार्डन, पी०। फिजिक्स जर्न०, 1938, **39,** 711।

27. पालिंग, एल० तथा डेल्ब्रक, एम०। साइंस, 1940, **92,** 77।

28. बहादुर, के०। *Zbl. Bakt*, 1964, **117**, 585-602।

29. बहादुर, के०। *Synthesis of Jeewanu, the Protocell.* रामनारायण लाल बेनी प्रसाद, इलाहाबाद, 1966।

30. कुमार, ए०। इलाहाबाद विश्वविद्यालय, डी० फिल० थीसिस, 1966।

31. ब्रिग्स, एम० एच०। स्पेस फ्लाइट, 1965, **7**, 129-31।

आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी नवीन धारणा

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी

रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

1966, भाग 9, संख्या III, पृ० 117-126 से पुनर्मुद्रित

New approach to molecular or chemical evolution

By

K. Bahadur and S. Ranganayaki

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1966, Vol. 9, Part III, Pages 117-126

विज्ञान परिषद् अनुसंधान पत्रिका
1966, **9**, 117-126

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1966, **9**, 117-126

आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी नवीन धारणा

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी
रसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

[प्राप्त—अप्रैल 2, 1966]

सारांश

जीवित प्रणाली के सर्वप्रथम उदय होने के पूर्व आणविक अथवा रासायनिक विकास सम्बन्धी धारणा के सम्बन्ध में कुछ कारण प्रस्तुत किये गये हैं। विकासवाद की यह धारणा बिना प्राकृतिक वरण अथवा अनुकूलन के भ्रामक है। प्राकृतिक वरण न तो पुराने और न नये माडलों के निर्माण सम्बन्धी नियमों को लाद ही सकता है वह स्वतः पुनरावृतिकारी प्रणाली का निर्माण कर ही नहीं सकता। यह तभी प्रभावशाली हो सकता है। जब कुछ विचलन एवं अनुकूलन के गुणधर्मों से सम्पन्न स्वतः प्रतिकृतिकारी प्रणालियाँ उपस्थित हों। अनुकूलन एवं गुणन पदार्थ के मूलभूत गुणधर्म हैं जिनका प्रेक्षण उपयुक्त अवस्थाओं के अन्तर्गत किया जा सकता है। गत्यात्मक सन्तुलन पर सूक्ष्म अणुओं से बनी हुई रसायनों की प्रणाली उपयुक्त दशाओं में ऐसी वस्तुयें निर्मित कर सकती है जिनमें वृद्धि, गुणन तथा उपापचयन सक्रियता के गुणधर्म प्रदर्शित होते हों। ऐसे पदार्थों में अनुकूलन का गुण विद्यमान रह सकता है। इनमें आकारीय लक्षण हो सकता है और ये संवर्द्ध में संवर्द्धित किये जा सकते हैं। जीवाणु ऐसे ही पदार्थ हैं।

आणविक अथवा रासायनिक विकास पहले तो आणविक समुदायों के रूप में प्रकाशीय सूक्ष्मदर्शी के परास से परे और बाद में माइक्रानों के आकार में प्रगतिशील रहा।

ऐमीनो अम्ल तथा पेप्टाइडों से निर्मित जीवाणुओं ने विकास के फलस्वरूप कोशीय जीवित प्रणाली का रूप ग्रहण किया और इस प्रकार जीवित प्राणालियों के निकटतम पूर्व-उत्पादक बने।

Abstract

New approach to molecular or chemical evolution. *By* K. Bahadur and S. Ranganayaki, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

The reasons for the concept of molecular or chemical evolution preceding the appearance of the earliest living system have been discussed. This concept of evolution without natural selection or adaptability is misleading. Natural selection can neither impose rules for the formation of an old or new models, least the formation of a self-replicating system and it can be effective only when self-replicating systems with

slight variations and with properties of adaptability are present. Adaptability and multiplication are the inherent properties of matter and these can be observed under suitable conditions. A system of chemicals at dynamic equilibrium and made of smaller molecules could under appropriate condition form objects which showed the properties of growth, multiplication and metabolic activity in biological sense. These objects have property of adaptability so could evolve. These have morphological look and can be subcultured in appropriate environmental medium. Jeewanu are such objects.

The molecular or chemical evolution was in progress first in molecular associations beyond the range of optical microscope and later in the size of microns.

Jeewanu which were made of amino acid and peptides on evolution formed cellular living system and were thus the immediate precursors of our living systems.

बीसवीं शती में पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति की समस्या ने नवीन प्रकार की शोधों को जन्म दिया है और प्रथम कोशों की उत्पत्ति के पहले आणविक या रासायनिक विकास की धारणा एंगेल्स[1], मिचेल[2], ओपैरिन[3], कैल्विन[4] तथा अन्य अनेक वैज्ञानिकों के सोचने के फलस्वरूप बनी है। सर्वप्रथम 1926 ई० में रूस की वनस्पति परिषद् की एक बैठक में ओपैरिन ने वास्तविक जीवित प्रणालियों की उत्पत्ति के पूर्व ही पृथ्वी पर आणविक विकास के विचार को स्पष्ट कर दिया था। तब से उन्होंने इस विचार को काफी विकसित किया और उसे अपनी पुस्तक "जीवन का उदय" में बराबर स्थान देते आये हैं। ठीक इसी प्रकार का विचार करने के पश्चात् कैल्विन[4] ने प्रथम जीवित प्रणाली के पूर्व रासायनिक विकास सम्बन्धी विचार विस्तुत किया है। बर्नाल[5] का सुझाव है कि प्रथम जीवित प्रणाली के अस्तित्व में आने के बहुत पूर्व ही रासायनिक उपापचयन अग्रसर होकर पूर्णता प्राप्त कर रहा था।

ऐसे विचारों के लिये जो प्रमुख कारण उत्तरदायी थे उनमें प्रथम यह था कि कोश में जो अणु विद्यमान हैं वे आकृति में बड़े एवं संरचना में जटिल हैं। प्रकृति में ऐसे अणुओं की उत्पत्ति ऐसे ही नहीं हो सकती। सरल अणुओं से ऐसे अणुओं के बनने के लिये किसी न किसी प्रकार की पूर्ण प्रक्रिया की आवश्यकता होगी। दूसरे यह कि जब से पृथ्वी जीवित प्रक्रमों को धारण करने के लिये अनुकूल हुई उस काल से लेकर उस काल के बीच जबकि जीवित प्रणालियों के चिन्ह ढूँढ़ निकाले गये हैं काफी अवकाश है अतः इस अवकाश में जीवित प्रणालियों के न पाये जाने का कारण यही हो सकता है कि इस अवधि में कोई पूर्ण प्रक्रिया क्रियाशील रही हो जो अन्त में जीवित प्रणाली में परिणत हो गई हो और इसके पूर्व पूर्णता को प्राप्त न हुई हो। सामान्यतः जीवन की उत्पत्ति सम्बन्धी मान्य काल प्रायः $2{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्ष पूर्व है किन्तु पृथ्वी पर जल तथा वायुमण्डल का अस्तित्व प्रायः 4×10^{12} वर्षों से है। इस प्रकार से आणविक विकास के अग्रसर होने के लिये काफी समय मिला होगा जिसके कारण प्रायः $1{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्षों तक पृथ्वी में जीवित प्रणालियों का अभाव रहा होगा।

फिर भी इन दोनों तर्कों में दोष हैं। सर्वप्रथम तो यह कि हमें यह पता ही नहीं है कि कोशा में पाये जाने वाले यौगिक जिनसे हम परिचित हैं वे पहले पहल प्रकृति में निर्मित होकर प्रारम्भिक कोशाओं

में सम्मिलित हो गये अथवा वैकल्पिक रूप में यह कि विकास की अवधि में ये यौगिक कोशाओं के ही भीतर निर्मित हुये और प्रारम्भिक कोशाओं को निर्मित करने वाले यौगिकों से ये सर्वथा भिन्न हैं। ये दोनों ही तर्क समान रूप से सम्भव हैं। पृथ्वी की प्रारम्भिक अवस्था में जैसी परिस्थितियाँ थीं उनके अन्तर्गत इन पदार्थों के बन जाने की सम्भावना से इस बात की पुष्टि नहीं मानी जा सकती है ये उत्पन्न हुये ही होंगे और ऐसे यौगिक जो इन अवस्थाओं में प्रकृति में उत्पन्न हो सकते हैं किन्तु कोशा के भीतर उपस्थित नहीं हैं उनकी संख्या अधिक होगी। दूसरे यह कि वह काल जब कि सर्वप्रथम जीवित प्रणालियों का उदय हुआ पूर्वअनुमानित काल से काफी पहले सरक सकता है। बर्नाल[5] तो इस काल को $3{\cdot}5 \times 10^{12}$ वर्ष पूर्व तक पछेल देने के पक्ष में हैं जिस काल में भूपर्पटी पिघली भर थी[6]—चाहे वह उस समय गरम पिंड के रूप में थी अथवा ठंडे पदार्थ कणों के संघनन अवशेष के रूप में रही हो[7–8–9]।

किन्तु आणविक या रासायनिक विकास पद का व्यवहार बारम्बार होता रहा है। जब तक पूर्ण स्व-प्रतिकृतिक मशीन तैयार न हो ले प्राकृतिक वरण द्वारा विकास की ऐसी कल्पना कर पाना कठिन है जिसे हम व्यवहार में लाये जाने वाले विकास पद का सच्चा रूप कह सकें। जैसा कि ब्लम[10] ने प्रस्तावित किया है कि यह आवश्यक निर्देश है क्योंकि जीवित प्रणालियों की उत्पत्ति के सम्बन्ध में विचार करते समय त्रुटि हो सकती है क्योंकि प्रत्यक्ष या अप्रत्यक्ष रूप से कभी-कभी प्राकृतिक वरण पद का व्यवहार त्रुटि-वश ऐसी वस्तुओं की उत्पत्ति के लिये किया जाता है जो प्राकृतिक वरण द्वारा विकास के पूर्व भी विद्यमान थीं।

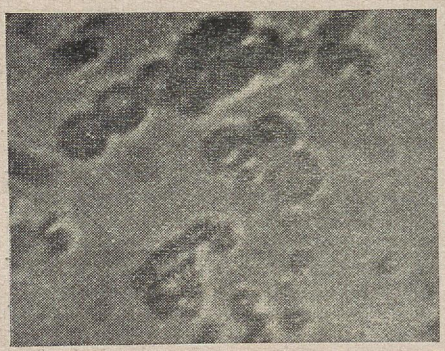
यदि कतिपय अणुओं के निर्माण सम्बन्धी विचारों के लिये कुछ हद तक रासायनिक रूपान्तरों की आवश्यकता पड़े तो रासायनिक विकास के स्थान पर रासायनिक रूपान्तर पद का व्यवहार किया जा सकता है। ऐसे रासायनिक रूपान्तर ऊष्मागतिकीय तथा गतिज मान्यताओं के अनुसार अग्रसर हो सकते हैं और इनके साथ विकास सम्बन्धी किसी भी प्रकार की विचारधारा को, यहाँ तक कि दूरतम प्रसंग में भी, सम्मि-लित नहीं किया जा सकता। ऐसे रासायनिक रूपान्तरों के लिये केवल ऊष्मागतिकीय एवं गतिज विचार ही आवश्यक होंगे, प्रतिकृतिक प्रकार के सूचक किसी भी त्रिविमीय अवयव की आवश्यकता नहीं है। इससे निर्जीव प्रणालियों के सामान्य रासायनिक रूपान्तर एवं जीवित प्रणाली के विकासमान अनुकूलनों में स्पष्ट अन्तर हो जाता है।

ऊष्मागतिकी मान्यताओं के अनुसार समय के बढ़ने के साथ ही ऐसे निर्जीव रासायनिक रूपान्तरों के ऐन्ट्रापी में वृद्धि होगी जिससे सुसंयोजित ढाँचा बनने के बजाय अनिश्चितता की दशा प्राप्त होगी। यदि जीवन की उत्पत्ति होनी ही हो तो कोई न कोई व्यवस्थित प्रक्रम अवश्य रहता किन्तु ऐसे प्रक्रम का होना आणविक या रासायनिक विकास सम्बन्धी आधुनिक विचारधारा द्वारा तब तक विवेचित नहीं हो पाता जब तक कि द्रव्य में कुछ ऐसी अतिरिक्त विशिष्टतायें न हों जिनका उल्लेख आगे किया जा रहा है। अप्रत्यक्ष रूप से ऐसा विचार किया जाता है कि एक बार अवयवी अणुओं का मिश्रण उपस्थित हो जाय तो जीवन का स्वतः उदय एवं विकास होने लगेगा।

आज की कोशाओं के कई अंग हैं—यथा क्लोरोप्लास्ट जो प्रकाश संश्लेषण में सहायता करते हैं; माइटोकोण्ड्रिया जो उपापचयन को नियन्त्रित करने वाले ऐंजाइमी-परिवर्तनों को लाते हैं, माइक्रोसोम जो

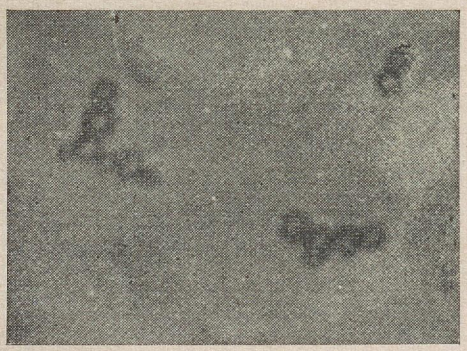
प्रोटीन तथा कतिपय राइबोन्यूक्लिक अम्लों का संश्लेषण करते हैं एवं डेसाक्सीराइबोज न्यूक्लिक अम्ल युत क्रोमोसोम आदि। किन्तु ये सभी उस विशिष्ट स्थिति के ही सूचक हैं जो प्रारम्भ में आणविक संयोजन के फलस्वरूप सर्वसत्ता-जीवित प्रणाली के रूप में थी न कि किसी एक न्यूक्लिक अम्ल के अणु को जो अपने में कुछ भी नहीं है[5]।

प्रकाश रासायनिक विधि से संश्लिष्ट जीवाणु का माइक्रोग्राफ। आवर्धन × 1500



Micrograph of Jeewanu synthesised photochemically, mag. × 1500

जीवाणु का माइक्रोग्राफ जिसमें कलिकायें प्रदर्शित हैं। आवर्धन × 1000



Micrograph of Jeewanu showing buddings, mag. × 1000.

जीवाणु का माइक्रोग्राफ जिसमें सीमा-भित्ति तथा आन्तरिक संरचनायें प्रदर्शित हैं। आवर्धन × 2000



Micrograph of Jeewanu showing the boundary wall and internal structures mag. × 2000.

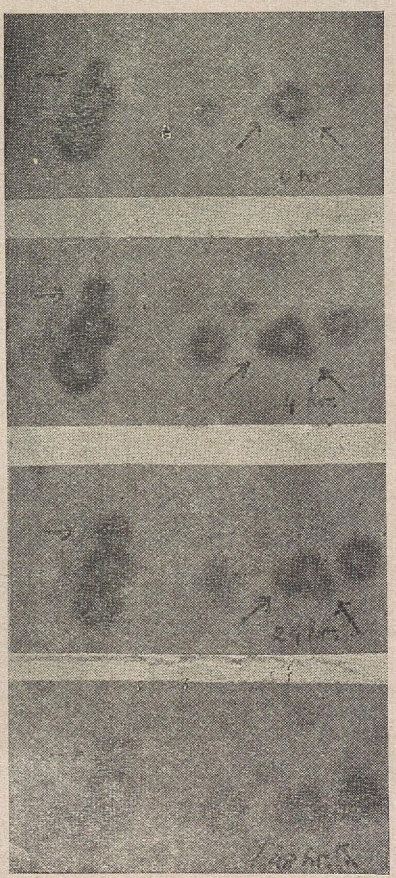
कलिका-यत जीवाणु का माइक्रोग्राफ़ 1500 गुना आवर्धित



Micrograph of a Jeewanu with a bud (photographed at 1500 mag. and highly magnified).

वर्तमान जीवित प्रणालियों में आनुवंशिक पितृ से सन्तानों तक न्यूक्लिक अम्ल द्वारा स्थानान्तरित होता है । अनुक्रम परिकल्पना (sequence hypothesis) से यह अनुमोदन होता है कि न्यूक्लिक अम्ल अणुओं में आनुवंशिक (genetic) सूचनायें संग्रह रहती हैं और ये रैखिक रूप में प्रेषित होती हैं। इसे प्रोटीन में पाये जाने वाले ऐमीनो अम्लों के अवशेषों के रैखिक क्रम द्वारा व्यक्त किया जाता है। यह सूचना केवल एक दिशा में प्रेषित की जाती है अर्थात् न्यूक्लिक अम्ल के आधार अनुक्रम (base sequence(से प्रोटीन अणुओं के ऐमीनो अम्ल तक। क्रिक[11] ने प्रमाण प्रस्तुत किये हैं कि प्रोटीन की त्रिविमीय संरचना, प्रोटीन अणुओं के भीतर एंव परिवेश के अणुओं की प्रति क्रियायें (interaction) तथा प्रोटीन के समूहन की क्रियायें अवयवी ऐमीनों अम्लों की विशिष्ट व्यवस्था के कारण हैं। ऐसे काल निरपेक्ष शब्दकोश के संग्रह का कार्य चालू है जो न्यूक्लिक अम्ल आधारों के अनुक्रम को व्यक्त कर सके जो प्रोटीन में विशिष्ट ऐमीनो अम्लों में प्रेषित होते हैं [12–16]।

जीवाणु में कालिकाओं का निर्माण एवं वृद्धि को दिखाने वाले माइक्रोग्राफ, आवर्धन × 1500



Time-lapse micrograph showing formation of buds and their growth in Jeewanu, mag. × 1500.

किन्तु किसी भी पुनरावृत्ति एवं प्रोटीन संश्लेषण के आधुनिक सिद्धान्त द्वारा आनुवंशिक पाठ की उत्पत्ति प्रस्तावित नहीं होती जो क्रियात्मक प्रोटीनों में प्रतिकृति, अनूदित तथा व्यक्त होती हो। अनुकृत, कोडिंग (संकेतन) तथा प्रोटीन संश्लेषण की अनुकृति के अधिकांश सिद्धांत जैविक वृहद अणुओं की उप-इकाई के अनुक्रम में किसी प्रकार के नियम, नियन्त्रण या सम्भवन का अभाव देखते हैं जब तक कि आनु-वंशिक अनुक्रम में कोई ऐसा क्रम पहले से विद्यमान न हो[17]।

सामान्यतः आनुवंशिकीविदों का विश्वास है कि इस आनुवंशिक क्रम की उत्पति, जो न्यूक्लिक अम्ल में आधारों के रेखीय अनुक्रमों के रूप में पाया जाता है यादृच्छिक, कल्पित त्रुटियों की स्मृति में प्राकृतिक वरण के विकासमान प्रक्रम के रूप में अथवा किसी पहले से विद्यमान अनुक्रम की पुनरावृति के रूप में अथवा पुनर्जनन के प्रक्रम में अनुक्रमों के मिश्रण के फलस्वरूप हुई होगी। आनुवंशिक क्रम का प्रारम्भिक उदय उप-इकाइयों के संयोजन के फवस्वरूप हुआ माना जाता है जो आज्ञात कारणों से स्वतः आवृति करने में समर्थ

हो सका। यह प्राकृतिक वरण की विचार-धारा का गलत प्रयोग है। प्राकृतिक वरण का सिद्धान्त ऐसी इकाइयों से जो अनुकृति में समर्थ हैं उनमें से अन्ततः चुनाव करने को दर्शाता है। यह संश्लेषण के समय किसी विशिष्ट क्रम के होने के सम्बन्ध में किसी नियम को निर्धारित नहीं करता और पुनर्जनन की क्षमता के सम्बन्ध में तो बिल्कुल ही नहीं।

मुलर के अनुसार[18] गुणन, परिवर्तन, वरण तथा अनुकूलन के प्रक्रमों द्वारा आनुवंशिक सूचना उत्पन्न होती है जिससे किसी एक अनुक्रम का चुनाव होता है। किन्तु इनसे ऐसी आनुवंशिक सूचनायें ही संग्रहीत होती हैं जिससे विशिष्ट दशा का बोध होता है किन्तु प्रारम्भिक दशाओं में इस अवस्था को उत्पन्न करने के सम्बन्ध में किसी प्रकार की सूचना प्रदान नहीं करता।

विकास में अनुकूलन की घटना महत्वपूर्ण है और जीवित प्रणाली के लिए आवश्यक गुणधर्म मानी जाती है। जहाँ तक किसी प्रजाति के लक्षणों के परिवर्तन का प्रश्न है यह अनुकूलन विकास का महत्वपुर्ण पक्ष है और जितने भी परम्परागत अनुकूली विभिन्नता हैं वे विकासीय परिवर्तन हैं। किन्तु इसका विलोम कथन कि सभी विकासीय परिवर्तन अनुकूली हैं सत्य नहीं है।

विकास के दो प्रमुख पक्ष हैं। प्रथम तो वह जो परिवर्तनों द्वारा व्यक्त होता है और दूसरा वह जिससे नवीन प्रजातियों का जन्म होता है। अधिकांश विकासीय परिवर्तन प्रथम कोटि में आते है और ये वे परिवर्तन हैं जो किसी प्रजाति या प्रजाति के सदस्य में परिवेश के अनुसार होते हैं। इन्हीं परिवर्तनों से जनसंख्या का अस्तित्व बना रहता है। तब केवल प्राकृतिक वरण का क्रम चालू होता है। इसके द्वारा पितृ एंव शेष जन-संख्या में कोई असमानता नहीं आने पाती। असमानता के कारण ही प्राकृतिक वरण होता है। यदि क्रमिक मन्द परिवेशात्मक परिवर्तन होता है तो प्राकृतिक वरण के द्वारा जनसंख्या में अनुकूलन के परिवर्तन परिलक्षित हो सकते हैं।

इस प्रकार विकास को अनुकूलनों का सार-संकलन कहा गया है। इसे और सरल शब्दों में इस प्रकार कहा जा सकता है कि "अनुकूलन ही विकास है"।[19]

विभिन्न सदस्यों से बनी हुई जनसंख्या उसके द्वारा वहन की जाने वाली विभिन्न जीनों (genes) की आवृतियों में क्रमानुसार परिवर्तन के माध्यम से नये पिरविेश के अनुसार अपने को ढालती है। जीवाणवीय जनसंख्या जिसमें एकाकी जीन परिवर्तनों के द्वारा कतिपय परिवेशीय प्रतिबंध पूर्ण होते हैं तथा जहाँ संततियाँ पितृ के ही समान होती हैं वहाँ जनसंख्या का अनुकूलन एक ही पीढ़ी में पूरा हो जाता है। द्विगुणित संकर निषेचित सदस्यों में जीन पुनःसंयोजन के फलस्वरूप समलक्षणी पितृ एवं उसकी संततियों में जीवाणुओं की अपेक्षा कही न्यून सम्बन्ध देखा जाता है।

अनुकूलन की घटना को इस प्रकार व्यक्त किया जा सकता है: "यदि किसी जीवित प्रणाली पर प्रतिबन्ध लगाया जाय तो यदि सम्भव हुआ तो प्रणाली में ऐसा परिवर्तन घटित होगा जिससे वह प्रतिबन्ध समाप्त हो जाय।" कोई भी जीवित प्रणाली संतुलन में रहने वाली प्रणाली है। अतः अनुकूलन की उपर्युक्त परिभाषा को इस प्रकार संशोधित किया जा सकता है कि "यदि किसी संतुलन को प्राप्त प्रणाली पर प्रति-

बन्ध लगाया जाय तो प्रणाली के भीतर ऐसा परिवर्तन होगा जिससे यह प्रतिबन्ध दूर हो जाय'' किन्तु यह तो ल शतालिए का सिद्धान्त है जिसे उन्होंने रासायनिक संतुलन के लिये 1888 ई० में प्रस्तावित किया था।

इस प्रकार अनुकूलन न केवल रासायनिक सन्तुलन में पाया जाता है वरन् यह सन्तुलन को प्राप्त किसी भी प्रणाली में, जिसमें जीवित प्रणाली सम्मिलित है, पाया जाता है। बहादुर तथा सक्सेना[19] ने ऐंजाइम-माध्यमों में अनुकूलन की घटना का अवलोकन किया है। एंजाइमों में ऐसे भी अनुकूलन देखे गये हैं[20] जहाँ उबालने या विप्रकृतीकरण के द्वारा प्रोटीन अणुओं में अव्यवस्था आ जाती है किन्तु इस प्रभाव का शीघ्र ही निराकरण हो जाता है जिसमे नवीन अणुओं की सृष्टि न होकर अकुंडलित दशा से व्यवस्थित दशा प्राप्त हो जाती है। यह सूचित किया गया है कि ऐजाइम को निष्क्रिय बना कर यह दिखाया जा सकता है कि निष्क्रियता का कारण उन तृतीयक तथा चतुर्थक संरचनाओं का विनष्टीकरण है जो परस्पर संकुलित हैं किन्तु प्राथमिक संयोजकता द्वारा जुड़ी नहीं हैं। इस निष्क्रिय पदार्थ को उपयुक्त ताप पर रखने पर 95% ऐंजाइमी-सक्रियता पुनः प्राप्त की जा सकती है और तृतीयक तथा चतुर्थक संरचनायें पुनरुत्पादित हो सकती हैं[21]। इस प्रकार के विनष्टीकरण द्वारा प्राथमिक संरचना प्राप्त की जा सकती है और विपरीत दिशा में चलकर तृतीयक तथा चतुर्थक संयोजन तक पहुँचा जा सकता है। ऐल्डोलेक्स में इस दशा को पूर्णरूप से प्राप्त किया जा सकता है।[21]

इनमें से अनेक परिवर्तनों की विवेचना ऊष्मागतिकी स्थायित्व के द्वारा की जा सकती है। बहादुर तथा रंगनायकी[22,23] का अभिमत है कि किसी भी संतुलन प्राप्त प्रणाली में अनुकूलन का गुणधर्म निहित रहता है जिसकी अभिव्यक्ति ल शतालिए का सिद्धान्त है। किन्तु कोरे अनुकूलन के कारण विकास सम्भव नहीं। विकास के पूर्व प्रणाली में प्रतिकृति करने की क्षमता होनी अनिवार्य है। बहादुर तथा रंगनायकी[22, 23] के अनुसार उपर्युक्त दशाओं में द्रव्य में द्विगुणन की विशेषता निहित रहती है। बहादुर[24] के अनुसार क्वांटम यांत्रिकी संस्पंदन अन्तःक्रिया का स्थायित्व बल[25] ही द्रव्य के इस गुणधर्म को व्यक्त करता है। सर्वप्रथम जीवित प्रणाली अवश्य ही छोटे छोटे अणुओं से निर्मित रही होगी जिममें आणविक अन्तः क्रिया बल संस्पंदन अतः क्रिया बलों से काफी लघु रहे होंगे। एक बार प्रतिरूपी आकृति (माडेल) बन जाने पर वह इस बल के द्वारा स्थिर हुई होगी जिससे और भी अनेक आणविक संरचनायें बनी होंगी। जब आणविक अन्तः क्रिया बल क्वांटम यांत्रिकी संस्पंदन अंतःक्रिया बलों से बलशाली होंगें तो दीर्घतर अणुओं से निर्मित प्रणाली का विकास लघुतर अणुओं से हुआ होगा और इस संधिकाल में न्यूक्लिक अम्ल द्वारा प्रेरित द्विगुणन क्रिया चालू हुई होगी। यह विचार-धारा बायपोएसिस (biopoesis) के अध्ययन की विकासवादी धारा से मेल खाती है।

गुणन तथा अनुकूलन के गुणधर्मों से युक्त द्रव्य द्वारा ऐसी प्रणालियों का जन्म होगा जो यदि सूक्ष्मतर अणुओं से बनी हों तथा खुली प्रणाली प्रकार के गतिशील संतुलन में हों तो वे वृद्धि, गुणन तथा उपापचयी सक्रियता प्रदर्शित करेंगी, उनमें अनुकूल का गुणधर्म होगा और उनमें विकास होगा। इस प्रकाश में आणविक या रासायनिक विकास जीवन तथा जीवित प्रणाली संश्लेषण में एक अनिवार्य अवस्था के रूप में पाई जावेगी। जहाँ कहीं भी आवश्यक दशायें प्राप्त हुई होंगी, वहीं आणविक समूह बनने के पूर्व भी द्रव्य का विकास होता

रहा होगा। बर्नाल[5] ने ऐसी उपापचयी इकाइयों के अस्तित्व की सम्भावना व्यक्त की है जो प्रथम जीवित प्रणाली के निर्माण के पूर्व रही होगी।

अन्ततः द्रव्य के द्विगुणन तथा अनुकूलन इन निहित गुणधर्मों के कारण सूक्ष्म आकार वाली वस्तुओं की उत्पति हुई जिनमें वृद्धि, पुनर्जनन तथा सक्रियता थी और वे अनुकूलन में समर्थ थे जिससे विकास हुआ। ऐसी इकाइयाँ का कृत्रिम संश्लेषण किया जा चुका है और इनका नाम "जीवाणु" रखा गया है। यह संस्कृत शब्द है जिसका अर्थ है जीव के कण[23]। इन इकाइयों को संवर्द्धित किया जा सकता है[27,23]। इनकी विशिष्ट आकारिकी होती है[27,29]। जीवाणु के प्रकाशरासायनिक उत्पति सम्बन्धी प्रयोगों को ब्रिग्स[30] ने स्वतन्त्र रूप से पुष्टि करते हुये उन्हें आगे बढ़ाया है।

निर्देश

1. ऐंगेल्स, एफ०। *Dialectics of Nature. Partizdat*, 1933।
2. मिचेल, पी०। **सिम्पो० सोसा० एक्सपे० बायो०,** 1954, **8,** 254।
3. ओपैरिन, ए० आई०। *The Origin of Life* **डोबर प्रकाशन, न्यूयार्क** 1953।
4. कैल्विन, एम०। **प्रोसी० 10वाँ इंटरने० बाट० काँग्रेस,** 1964, 41-56।
5. बर्नाल, जे० डी०। **ओसनिओ० अमे० एसोशि० एडवांसमेंट साइं०,** 1961, 95-118।
6. विनोग्रैडोव, ए० पी०। **चोथा इंटरने० सिम्पो०,** *Origin of Life on Earth,* **मास्को,** 1957, 23-3।
7. लेविन, बी० यू०। **प्रिरोडा, लेनिनग्राड,** 1949, **10,** 3।
8. वही। **इज्वे० एके० नाउक०, रूस,** 1953, **4,** 289।
9. वही। **इंटरने० सिम्पो०** *"Origin of Lif on Earth"* **मास्को** 1957, **परगैमन प्रेस,**1959, 67-75।
10. ब्लम, एच० एफ०। **अमे० साइंटिस्ट,** 1961, **49,** 474-501।
11. क्रिक, एफ० एच० सी०। **सिम्पो० सोसा० एक्सपे० बायोला०** *"On Protein Synthesis"* **गेट ब्रिटेन,** 1958, **12,** 138।

12. गैमो, जी०, रिच, ए०, यकुआस, एम०। — *Advances in Biological and Medical Physics* एकेडमिक प्रेस, न्यूयार्क, 1956, 23।

13. क्रिक, ग्रिफिथ, तथा आर्गेल। — प्रोसी० नेश० एके० साइं० (अमरीका), 1959, **43**, 416।

14. गोलोम्ब, एस० डब्लू०, वेल्च, एल० आर० तथा डेल्ब्रेक, एम० के०। — *Danske Vidensk, Selsk (Biol. Medd).* 1958, **23**, 9।

15. यकुआस, एम०। — *Information Theory of Biology* परगैमन प्रेस, न्यूयार्क, 1958, 70।

16. वोसे, सी० आर०। — बायोकेमि० तथा बायोफिजिक्स रिसर्च कम्यूनिकेशन, 1961, **5**, 88।

17. ब्रेनर, एस०। — *The Mechanism of Gene action* जे०ए० चर्चिल लि०, लंदन, 1959।

18. मुलर, एच० जे०। — बुले० अमे० मैथ० सोसा०, 1958, **64**, 137।

19. वैलेस, बी० तथा एड्रियन, एम०। — *Adaptation.* प्रेंटिस हाल, नई दिल्ली, 1963

20. बहादुर, के० तथा सक्सेना, आई०। — बायोलाजिया प्लैन्टारम, 1965, **7**, 86।

21. कैल्विन, एम० तथा कैल्विन, सी० जे०। — अमे० साइंटिस्ट, 1964, **52**, 163-183।

22. जाबिन, आई०। — *Proteins in Lectose System.* 1964।

23. बहादुर, के०, रंगनायकी, एस०। — *Zbl. Bakt*, 1964, **117**, 567-74।

24. वही। — विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका, 1963, **6**, 63।

25. बहादुर, के०। — *Zbl. Bakt*, 1964, **118**, 671-94।

26. जार्डन, पी०। — फिजिक्स जर्न०, 1938, **39**, 711।

27. पालिंग, एल० तथा डेल्ब्रक, एम०। — साइंस, 1940, **92**, 77।

28. बहादुर, के०। *Zbl. Bakt*, 1964, **117**, 585-602।

29. बहादुर, के०। *Synthesis of Jeewanu, the Protocell.* रामनारायण लाल बेनी प्रसाद, इलाहाबाद, 1966।

30. कुमार, ए०। इलाहाबाद विश्वविद्यालय, डी० फिल० थीसिस, 1966।

31. ब्रिग्स, एम० एच०। स्पेस फ्लाइट, 1965, **7**, 129-31।

टेकनिकल प्रेस प्रा० लि०, प्रयाग

जीवाणु (जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूह) का निर्माण

लेखक

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

1966, भाग 9, संख्या IV, पृ० 171-182 से पुनर्मुद्रित

Formation of Jeewanu, the molecular association with properties of biological order

By

K. Bahadur and S. Ranganayaki

Department of Chemistry, University of Allahabad

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1966, Vol. 9, Part IV, Pages 171-182

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका
1966, 9, 171-182

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1966, 9, 171-182

जीवाणु (जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूह) का निर्माण

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—सितम्बर 24, 1966]

सारांश

जीवन की उत्पत्ति के विषय में अजैविक उत्पत्ति सिद्धान्त की विवेचना की गई है तथा जलीय मिश्रणों में कोलाइडी अवस्था में अधिक पृष्ठीय क्षेत्रफल से युक्त अकार्बनिक उत्प्रेरकों की उपस्थिति में होने वाली प्रकाश-रासायनिक अभिक्रियाओं के महत्त्व पर बल दिया गया है। इन मिश्रणों में ऐमीनो अम्ल और पेप्टाइड बनते हैं। यह सुझाव दिया गया है कि द्रव्य में द्विगुणित होने तथा परिस्थिति के अनुसार अपने को ढाल लेने के जन्मजात गुण होते हैं और उचित दशाओं में ये ऐसे आणविक समूहों के निर्माण में सहायक होते हैं जिनमें वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण होते हैं। ऐसे आणविक समूह विभिन्न प्रक्रमों के द्वारा संश्लेषित किये गये हैं। इन्हें "जीवाणु" की संज्ञा दी गई है। जीवाणु अपने परिवेशी माध्यम से भोज्य पदार्थ का उपयोग करके बढ़ते हैं तथा एक विशिष्ट आकार को प्राप्त करने के बाद **कली बना बना कर** (Budding) अपनी संख्या में वृद्धि करते हैं। उनमें आकस्मिक तथा परिस्थिति के अनुसार परिवर्तन भी दिखाई पड़ते हैं तथा उनमें विकास की भी क्षमता पाई जाती है। जीवाणुओं को उनके विशिष्ट माध्यम (कल्चर) में उत्पन्न भी किया जा सकता है। इसी प्रकार जीवाणु में एक जीवित पदार्थ के सभी आवश्यक गुण पाये जाते हैं, परन्तु इसका संश्लेषण अजीवित पदार्थ से किया गया है। जीवाणु का संश्लेषण प्राकृतिक दशाओं में हो सकता है, और संभवतः कोशीय जीवन के पूर्व जीवाणुओं हो का निर्माण हुआ होगा। अभी हाल में फाक्स ने माइक्रोस्फियर में एक एक करके वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुणों के प्रमाण दिये है।

Abstract

Formation of Jeewanu, the molecular association wih properties of biological order. *By* K. Bahadur and S. Ranganayaki, Department of Chemistry, University of Allahabad.

The abiogenic approach to the problem of origin of life has been discussed and the importance of the photochemical reactions taking place in aqueous mixtures, having inorganic catalysts with large surface areas as in colloidal conditions is stressed. Amino acids and peptides are formed in these mixtures. It has been suggested that matter has

inherent properties of duplication and adaptability and under suitable conditions these help in the formation of molecular associations with properties of growth, multiplication and metabolic activity. Such molecular associations have been synthesised by several processes. These have been named as JEEWANU. Jeewanu grow by utilising the nutrition from the environmental medium, after reaching a specific size they multiply by budding, they show mutational and adaptive changes and are capable of evolution. Jeewanu can be subcultured in their specific media. Jeewanu satisfy all the essentials for a living system but have been synthesised from non-living materials. Jeewanu can be synthesised under natural conditions and were thus, in all probability, the immediate precursors of cellular life. Recently Fox has produced the evidence of growth, multiplication and metabolic activity singly in microspheres.

जीवन की उत्पत्ति के विषय में आणविक विकास के प्रक्रम के द्वारा जीवोत्पति के आधुनिक सिद्धान्त का इतिहास बड़ा प्रभावशाली रहा है। जैविक कोटि के यौगिकों के अजैवी पद्धति द्वारा निर्माण, स्वयं द्विगुणित होती कलाओं के अध्ययन, तथा जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों की खोज में पर्याप्त संतोषजनक प्रगति हुई है। अजीवित पदार्थों से जीवोत्पत्ति का प्रथम चरण उन प्राकृतिक प्रक्रमों की खोज था, जिनके द्वारा जीवशास्त्र सम्बन्धी यौगिकों-जैसे ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड, प्यूरीन और पिरीमिडीन आदि का निर्माण हो सके। इन यौगिकों की अजैवी पद्धति द्वारा संश्लेषण के विभिन्न प्रक्रमों की खोज की गई। इन सभी प्रक्रमों ने जिनका उपयोग इन संश्लेषणों के हेतु किया गया है, संभवतः पूर्व जैविक युग में इन यौगिकों के निर्माण में कुछ न कुछ अंश तक अपना योगदान दिया होगा। परन्तु यदि अजैवी पद्धति द्वारा जीवोत्पत्ति के विभिन्न कारकों का, जिनके द्वारा प्रथम जीव उत्पन्न हुआ, एक स्पष्ट चित्र प्राप्त करना है तो यह नितांत आवश्यक है कि विभिन्न कारकों के अन्तर को समझा जाये; वे दशायें जो पृथ्वी पर बहुत अधिक काल तक बनी रहीं तथा वे दशाएं जो एकाएक थोड़े काल के लिये उत्पन्न हुईं—इन दोनों के महत्त्व का अन्तर समझा जाये। बहिर्जैविक अध्ययनों में विश्व में जीवन के ब्रह्मांडोत्पत्ति सम्बन्धी अनुमानों का विशेष महत्त्व है।

इन अध्ययनों में विशेष कठिनाई समय की पुरातनता के कारण है, जबकि संभवतः ऐसी अभिक्रियाओं के द्वारा ऐसे पदार्थों का निर्माण हो रहा था, जिनसे पूर्वतम जीवित पदार्थ बने। अभी भी उस समय में उपस्थित भौतिक—रासायनिक दशाओं के विषय में सही अनुमान लगाना बड़ा कठिन है। पृथ्वी तथा उसके परिवेश की उत्पत्ति के समय से लेकर उस काल तक के लिये जबकि पहले पहले जीवित पदार्थ उत्पन्न हुये, कोई भी बात निश्चित रूप से ऐसी नहीं कही जा सकती, जिसका कोई न कोई वैकल्पिक सुझाव न हो। ऐसी दशा में विज्ञान के एक मौलिक ल्येल-नियम का पालन ही सर्वोत्तम है, जिसका सुझाव उन्होंने अपने भूगर्भीय खोज के सम्बन्ध में दिया था। इस नियम के अनुसार भूकाल को वर्तमान का ही पश्च विस्तार समझना चाहिए, जब तक इसके विरुद्ध विश्वास करने के प्रबल कारण न हों।

अजैवी रीति द्वारा ऐमीनो अम्लों की उत्पत्ति के विषय में सर्वप्रथम प्रेक्षण 1913 में लोएब[1] का मिलता है जिन्होंने फार्मऐल्डीहाइड, अमोनिया तथा जल के मिश्रण में निःशब्द विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ग्लाइ-

सीन तथा एलानीन ऐमीनो अम्लों के निर्माण की सूचना प्रकाशित की। ऐमीनो अम्लों का संश्लेषण, गैसों के मिश्रण में विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके[2] तथा कार्बनिक यौगिक, आकार्बनिक उत्प्रेरक से युक्त निर्बीजीकृत जलीय मिश्रणों को प्रकाश में रख कर[3] किया गया है। हैसेलस्ट्राम ने अमोनियम ऐसीटेट के जलीय विलयनों को प्रकाश में रखा तथा गलाइसीन और ऐस्पार्टिक अम्ल[4] के निर्माण का प्रेक्षण किया। ऐमीनो अम्लों तथा जीवविज्ञान सम्बन्धी अन्य यौगिकों का संश्लेषण आइसोसायनेट[5] के उपयोग द्वारा किया गया है; और इसके हेतु अल्ट्रावायलेट किरणों[6] से लेकर एक्स-रे किरणों[7] तक तथा ऊर्जा के अन्य सभी स्रोतों का उपयोग किया गया है।

यदि पूर्वजैविक युग में ऊर्जा के इन विभिन्न स्रोतों की प्राप्ति की संभावना का मूल्यांकन किया जाय, तो जल की उपस्थिति के कारण अल्ट्रावायलेट या अन्य उच्च ऊर्जा युक्त विकिरणों द्वारा पर्याप्त रूप में अजैवी पद्धति द्वारा जैविक यौगिकों के उत्पत्ति की संभावना नहीं रह जाती, क्योंकि पृथ्वी की ओजोन पृष्ठ ने ही उन्हें पृथ्वी के तल तक पहुँचने से रोक दिया होता। पृथ्वी पर जल आदि-काल में ही उत्पन्न हो गया था, अतः इसकी उपस्थिति से उच्च ताप वाले प्रक्रमों की भी संभावना नहीं रहती। जल की उपस्थिति में ऐसे प्रक्रमों की संभावना ज्वालामुखियों के निकट बहुत सीमित क्षेत्र में ही हो सकती है। ऊर्जा के शेष अन्य स्रोत यथा विद्युत विसर्ग आदि आकस्मिक रूप में ही हो सकते हैं। पुरातन पृथ्वी के महासागरों में कार्बनिक अणु तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक प्रचुर मात्रा में विद्यमान थे तथा सूर्य का प्रकाश भी पृथ्वी के जन्म काल से ही प्राप्य था। अतः प्रकाश-रासायनिक प्रक्रम ने न केवल ऐमीनो अम्ल वरन पेप्टाइड तथा जीवविज्ञान सम्बन्धी सभी महत्त्वपूर्ण अणुओं के निर्माण में एक प्रमुख योग दिया होगा।

अजैवी पद्धति द्वारा जीवोत्पत्ति में दूसरा महत्त्वपूर्ण चरण पेप्टाइड शृंखला के निर्माण का था। फाक्स[8] ने पेप्टाइड का संश्लेषण ऐमीनो अम्ल के मिश्रण को 180° पर कुछ घंटों तक गरम करके किया। एकाबोरी[9] ने ऐमीनो के जलीय मिश्रणों को अल्ट्रावायलेट प्रकाश में रखकर पेप्टाइडों का संश्लेषण किया। टेरेनिन[10] ने सुझाव दिया कि यदि ठोस वस्तुओं पर अभिकारी अणुओं को अधिशोषित कर लिया जाये, तो कम ऊर्जा द्वारा ही अभिक्रिया सम्पन्न हो जाने की संभावना है। बर्नाल[11] ने पृथ्वी पर कीचड़ में प्राप्त विकिरणों द्वारा पेप्टाइड के निर्माण की सूचना दी।

1958 में बहादुर और रंगनायकी ने[12] उत्प्रेरक के रूप में लौह तथा मालिब्डनम आक्साइड के कोलाइडीय विलयनों में युक्त एमीनो अम्लों के जलीय मिश्रणों में सूर्य के प्रकाश अथवा एक विद्युत बल्ब के कृत्रिम प्रकाश के प्रभाव के द्वारा पेप्टाइडों के निर्माण का प्रेक्षण किया। जलीय मिश्रणों में पेप्टाइडों के प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा निर्माण पर विस्तार से अनुसंधान कार्य किया गया है[12]। पर्ती तथा पाठक ने[13] अकार्बनिक उत्प्रेरकों की उपस्थिति में जलीय मिश्रणों में दृश्य प्रकाश तथा अल्ट्रावायलेट प्रकाश के उपयोग द्वारा पेप्टाइडों का निर्माण का प्रेक्षण किया है। ब्रिग्स[16] ने पेप्टाइड के प्रकाश-रासायनिक उत्पादन के प्रेक्षण की पुष्टि की है। लोव[14] ने जलीय मिश्रणों में, निर्जलीकारक के रूप में हाइड्रोजन सायनाइड के उपयोग के द्वारा पेप्टाइडों के संश्लेषण का प्रेक्षण किया है।

जलीय मिश्रणों में पेप्टाइडों का प्रकाश-रासायनिक उत्पादन बड़ा रोचक है और ऐमीनो अम्ल के प्रकाश-रासायनिक उत्पादन को ध्यान में रखते हुये इसका महत्त्व बहुत बढ़ जाता है, क्योंकि ऐसा संभव है

कि पुरातन काल में महासागरों में पहले ऐमीनो अम्लों का निर्माण हुआ हो और फिर पेप्टाइडों के निर्माण में उनका उपयोग किया गया हो।

अजैवी पद्धति द्वारा प्यूरीन, पिरीमिडीन, एडेनोसिन तथा न्यूक्लियोटाइड के निर्माण का अध्ययन विभिन्न वैज्ञानिकों ने किया है।

इसके बाद का महत्वपूर्ण पद जीवित प्रक्रम के संलक्षणों से युक्त आणविक समूहों के निर्माण का था। यद्यपि एक जीवित प्रणाली की परिभाषाओं में पर्याप्त अन्तर मिलता है, परन्तु यदि एक प्रणाली में वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण उपस्थित हों; जहाँ पर वृद्धि से तात्पर्य प्रणाली के अन्दर से उसी पदार्थ के संश्लेषण द्वारा, जिससे उस प्रणाली का निर्माण हुआ हो, उसके आकार की वृद्धि से है; गुणन का तात्पर्य प्रणाली की संख्या में वृद्धि से है, जिसमें पितृ प्रणाली से नवीन प्रणाली का निर्माण हो; तथा चयोपचय सक्रियता का अर्थ एक सीमा के भीतर घटित अनेकों रासायनिक अभिक्रियाओं से है, जिनके फलस्वरूप प्रणाली में [illegible] करने वाले परिवेशी अणुओं का कम से कम एक अंश उस पदार्थ में परिणत हो जाये, जिसके द्वारा उन इकाइयों का निर्माण हुआ हो और यदि प्रणाली में आकस्मिक तथा परिस्थिति के अनुकूल परिवर्तन करने के भी गुण हों, तो ऐसी प्रणाली को जीवित प्रणाली के अन्तर्गत रखा जा सकता है। यद्यपि उपर्युक्त गुण जीवित तथा अजीवित प्रणालियों के मध्य कोई विभाजन रेखा नहीं खींचते, परन्तु इनमें वे सभी गुण सम्मिलित हैं जो जीवित प्रणालियों के अधिक सन्निकट हैं, तथा इनसे कम गुणों से भी युक्त जीवित प्रणाली संभव है अतः यह निश्चित रूप से कहा जा सकता है कि यदि कोई प्रणाली इन सभी गुणों से युक्त हो तो उसे एक जीवित प्रणाली माना जायेगा।

जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों के संश्लेषण के कुछ आरम्भिक प्रयत्न सर्वविदित हैं। ओपेरिन[15] ने इस कार्य पर पुनः दृष्टि डाली है। इन प्रयोगों में सरल अकार्बनिक तथा कार्बनिक पदार्थों की अन्योन्य क्रिया द्वारा कोशों की रचना (morphology) को द्विगुणित करने के प्रयत्न किये गये। इन कणों के संदर्भ में ब्रिग्स महोदय[16] लिखते हैं, "इसमें कोई सन्देह नहीं कि इन बहुत से कार्यकर्त्ताओं द्वारा प्राप्त कणों की रचना जीवित कोशों के समरूप है, परन्तु इनमें केवल एक यही सादृश्य है, अन्यथा ये उत्पाद रासायनिक संघटन की दृष्टि से विभिन्न हैं; चयोपचय सक्रियता में अक्रिय हैं; और न बढ़ते हैं, न पुर्नजनन करते हैं। इसके अतिरिक्त इनका निर्माण ऐसे पदार्थों द्वारा तथा ऐसी दशाओं में हुआ है जो संभवतः प्रारम्भिक दशा में पथ्वी पर उपस्थित न थीं।"

कोसर्वेट में एक सीमारेखा दिखाई पड़ती है, और उनका विभाजन विखण्डन के द्वारा होता है। परन्तु अपकेन्द्रण पर उनका आकार नष्ट हो जाता है और उनका कोई निश्चित आकार भी नहीं होता। माइक्रोस्फियर ठोस पदार्थों के बने होते हैं और दबाने पर त्रिज्यानुसार टूट जाते हैं। उनका आकार कुछ घंटों तक ही रहता है, इसके पश्चात् वे मिलकर मिश्रण के तल पर ढेर बना लेते हैं। 1963 तक जबकि "जीवाणु" का कार्य सर्वप्रथम प्रकाशित हुआ, ऐसे प्रेक्षण किये गये कि माइक्रोस्फियर में एक सीमारेखा हो[illegible] है, उनके परिवेशी माध्यम के हाइड्रोजन आयन सान्द्रता में परिवर्तन करने से उनके अवयवी पदार्थ घुल जाते हैं तथा वे द्विअंगी विखण्डन द्वारा विभाजित होते हैं।

इन प्रयोगों में एक कठिनाई यह थी कि यह स्पष्ट न था कि न्यूक्लिइक अम्ल ने, जिसमें द्विगुणन के गुण होते हैं और जो प्रोटीन के अणुओं में ऐमीनो अम्लों के क्रम को नियन्त्रित रखता है, और इस प्रकार सभी जैविक प्रणालियों का एक अनिवार्य यौगिक है, किस प्रकार सर्वप्रथम अपना कार्य प्रारम्भ किया होगा, क्योंकि इसकी सक्रियता के लिये अपेक्षित एन्जाइमों का निर्माण केवल इसकी सक्रियता द्वारा ही संभव हो सका होगा।

इस प्रकार अजैवी पद्धति द्वारा उत्पन्न जैविक आणविक समूहों में द्विगुणन तथा परिस्थिति के अनुकूल अपने को ढालने के गुणों के प्रादुर्भाव का जीवोत्पत्ति के अध्ययन में एक विशेष महत्त्व है। इस पक्ष में कुछ प्रारम्भिक सिद्धान्तों की विवेचना रोचक होगी।

हेन्डरसन अपनी पुस्तक "Fitness of Environment" में लिखता है "बाद में निर्मित सेल प्रणाली पहले से उपस्थित सरल प्रणालियों के जन्मजात गुण प्रदर्शित करती हैं।" वाल्ड[17] लिखता है कि सेल का निर्माण उसके अवयवी पदार्थों के जन्मजात गुणों के कारण हुआ है। 1963 में बहादुर तथा रंगनायकी[18] ने सुझाव रखा कि द्रव्य में द्विगुणन तथा परिस्थिति के अनुकूल परिवर्तन के जन्मजात गुण होते हैं और उपयुक्त दशाओं में द्रव्य की किसी भी प्रणाली में ये गुण दिख सकते हैं। साम्यावास्था में द्रव्य की किसी भी प्रणाली में परिस्थिति के अनुसार ऐसे परिवर्तन करने के जन्मजात गुण होते हैं जिनके द्वारा वह प्रणाली में उत्पन्न विकारों के प्रभाव को नष्ट कर दे। बहादुर[19] के अनुसार क्वाण्टम-यांत्रिकी संस्पन्दन के विशेष स्थायित्व बल तथा ला शतालिये के नियम क्रमशः द्रव्य के द्विगुणन तथा परिस्थितिअनुकूल परिवर्तन के जन्मजात गुणों को ही प्रकट करते हैं। इस प्रकार क्वाण्टम-यांत्रिकी संस्पन्दन के विचार से एक प्रणाली AA एक दूसरी प्रणाली AB की अपेक्षा अधिक स्थायी है जहाँ पर A और A एक ही हैं, और A व B समान हैं परन्तु वही नहीं हैं। इस प्रकार एक प्रणाली में गतिशील साम्यावस्था में जब कि n आणविक संरचनाओं बनने की संभावना हो, जो कि सभी समान ऊष्मागतिकीय स्थिति में हों, जिन्हें समान सक्रियता की ऊर्जा की आवश्यकता हो, यदि उन विभिन्न n सम्भाव्य संश्लेषणीय आणविक संरचनाओं में से एक संरचना A को डाल दिया जाये, तो अन्य सम्भाव्य संरचनाओं की अपेक्षा प्रणाली में A की मात्रा अधिक बनेगी। एक जीवित प्रणाली साम्यावस्था प्राप्त प्रणाली है। यदि "**साम्यावस्था में स्थित प्रणाली**" को "**जीवित प्रणाली**" से प्रतिस्थापित किया जाये तो ल शतालिये के नियम का रूप होगा—"यदि किसी जीवित प्रणाली में कोई विकार उत्पन्न किया जाये तो जीवित प्रणाली में यथासंभव ऐसा परिवर्तन होगा कि उस विकार का प्रभाव अंशतः नष्ट हो जाये।" परन्तु जीवित प्रणालियों में परिस्थितिअनुकूल परिवर्तन की भी ऐसी ही व्याख्या की जा सकती है।

यदि द्रव्य में द्विगुणन और परिस्थितिअनुकूल परिवर्तन के जन्मजात गुण हैं तो फिर यह प्रश्न केवल उपयुक्त दशायें उत्पन्न करने का रह जाता है जब कि द्रव्य की एक प्रणाली में वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण दृष्टिगोचर होंगे। ऐसी प्रणालियाँ बना ली गई हैं; और इनका नाम "जीवाणु" रखा गया है[20]। प्रकाश-रासायनिक क्रम में अवयवी पदार्थों का संश्लेषण प्रकाश-रासायनिक विधि से किया गया है, और फिर उनसे वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त जीवाणु प्रकाश के प्रभाव[21] द्वारा निर्मित किये गये हैं। जीवाणु के निर्माण के हेतु ऊष्मा विधि द्वारा निर्मित पेप्टाइड का भी व्यवहार किया गया है[22]।

जीवाणुओं का निर्माण प्रोटीन रहित द्रव्यों से भी किया गया है[22]। इनमें ताम्र, मालिब्डेनम, कार्बन, हाइड्रोजन, आक्सीजन, नाइट्रोजन और जैविक खनिज होते हैं, परन्तु प्रोटीन नहीं होता। संघटन में यह मुख्यतः अकार्बनिक होते हैं; और इनमें लगभग 8% राख का अंश होता है[23,19]। जीवाणुओं की आंतरिक संरचना के फोटोमाइक्रोग्राफ भी लिये गये प्रकार हैं।[23]

ब्रिग्स[16] ने प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा जीवाणुओं के निर्माण की पुष्टि की है। हाल में फाक्स ने ऊष्मीय पेप्टाइड से बने अपने माइक्रोस्फियर कणों में वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण पाये हैं जिसकी सूचना 1965 में आणविक विकास इन्स्टीच्यूट, मियामी यूनिवर्सिटी, मियामी, यू० एस० ए० के विज्ञप्ति संख्या 050 में छपी है, और जिनका निर्माण ऊष्मीय पेप्टाइड से जीवाणु बनाने की विधि से विभिन्न विधियों द्वारा किया गया है। ऊष्मीय पेप्टाइड से 1963 में निर्मित जीवाणु तथा 1965 में प्रकाशित माइक्रोस्फियर का तुलनात्मक अध्ययन निम्न है:

सारणी 1

ऊष्मीय पेप्टाइड -अमोनियम मालिब्डेट संकर से 1963 में निर्मित जीवाणु[18,22] और 1963-65 के मध्य अनुसंधानित तथा 1965[24] में प्रकाशित ऊष्मीय पेप्टाइड से निर्मित माइक्रोस्फियर के गुणों की समानतायें:

ऊष्मीय पेप्टाइड-अमोनियम माल्बिडेट संकर से निर्मित और 1963 में प्रकाशित जीवाणुओं पर प्रेक्षण[18]	1963 और उससे आगे ऊष्मीय पेप्टाइड से निर्मित, 1965 में प्रकाशित[24] माइक्रोस्फियर पर प्रेक्षण
(1) वृद्धि, तथा बडिंग (Budding) के द्वारा गुणन के प्रयोगों की सूचना प्रकाशित की गई। जीवाणु बडिंग प्रक्रिया के द्वारा संख्या में वृद्धि करते हैं, और वृद्धि प्रदर्शित करते हैं।	उपर्युक्त रिपोर्ट की साइक्लोस्टाइल प्रतिलिपि के पृष्ठ 10 पर थोड़े-थोड़े समय के अन्तर से लिये फोटो-माइक्रोग्राफ में नई कलियों का निकलना प्रदर्शित है। पृष्ठ 12 पर एक नई फूटती हुई कली, तथा उसके आकार में वृद्धि के थोड़े थोड़े समय के अन्तर पर लिये फोटोमाइक्रोग्राफ प्रदर्शित हैं। उपर्युक्त पत्र के पृष्ठ 13-14 पर गतिशीलता प्रदर्शित करते हुए फोटो-माइक्रोग्राफ हैं।
(2) इस बात की सूचना दी गई है कि जीवाणु में लाक्षणिक गतिशीलता होती है।	.....
(3) जीवाणु के शरीर तथा जीवाणु के परिवेशी माध्यम में उपस्थित पेप्टाइड के ऐमीनो अम्ल का सांख्यिकी विवरण दिया गया है।	उपर्युक्त पत्र के पृष्ठ 8 पर माइक्रोस्फियर तथा उनकी सीमारेखा के पेप्टाइडों के ऐमीनो अम्ल का अन्तर अंकित है।
(4) जीवाणु में चक्रीय गति होने की सूचना दी गई है।	कणों के घूमने की सूचना दी गई है।

ऊष्मीय पेप्टाइड-अमोनियम मालिब्डेट संकर से निर्मित और 1963 में प्रकाशित जीवाणुओं पर प्रेक्षण	1963 और उससे आगे ऊष्मीय पेप्टाइड से निर्मित, 1965 में प्रकाशित[24] माइक्रोस्फियर पर प्रेक्षण
(5) द्रव्य में द्विगुणन तथा परिस्थितिनुकूल परिवर्तन के जन्मजात गुणों के होने का सुझाव दिया गया। अतः वृद्धि, गुणन और चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त कणों का निर्माण संभव है।	पृष्ठ 15 पर यह अंकित है "ऐसी घटनाएँ 1954 में जार्ज वोल्ड की भविष्यवाणी के अनुसार हैं कि सेल की उत्पत्ति का कारण उसके अवयवी द्रव्य के आन्तरिक गुणों को माना जा सकता है।"
(6) रचना की दृष्टि से जीवाणु "संगठित इकाइयों" के समरूप हैं।	पृष्ठ 3 पर माइक्रोस्फियर तथा "संगठित इकाइयों" की रचना की समानता का सुझाव दिया गया है।

जीवाणु तथा माइक्रोस्फियर में कुछ मौलिक भेद भी हैं। ये अन्तर निम्नांकित सारणी में अंकित हैं :—

सारणी 2

जीवाणु तथा माइक्रोस्फियर में अन्तर

जीवाणु	माइक्रोस्फियर
(1) जीवाणु विभिन्न प्रकार के कार्बनिक तथा अकार्बनिक पदार्थों से बनाये गये हैं। जीवाणु का निर्माण ऊष्मीय पेप्टाइड अमोनियम मालिब्डेट संकर से भी किया गया है।	(1) माइक्रोस्फियर केवल ऊष्मीय पेप्टाइड से बनाये गये हैं।
(2) वृद्धि, गुणन, तथा चयोपचय सक्रियता, ये सभी गुण उसी परिवेशी माध्यम में बिना किसी अन्य रसायन के प्रयोग के जिससे कि उसके विशिष्ट गुणों में अन्तर पड़े, देखे गये हैं।	(2) पृथकीकरण मैग्नीशियम क्लोराइड मिलाने पर, तथा गतिशीलता *TAP* मिलाने पर दिखाई पड़ती है।
(3) अन्तरिक पदार्थ श्यान रहता है।	(3) आन्तरिक पदार्थ ठोस एवं भंगुर है।
(4) ये अपने आकार को सर्वदा बनाये रखते हैं।	(4) 24 से 48 घंटों के पश्चात् सब एक में मिल जाते हैं।
(5) जीवाणु में आकस्मिक तथा परिस्थिति के अनुकूल परिवर्तन करने के गुण होते हैं और वे विकास में समर्थ हैं। इस प्रकार इनमें जीवित प्रणाली के अन्तर्गत वर्गीकृत किये जाने के सभी आवश्यक गुण पाये जाते हैं।	(5) माइक्रोस्फियर कृत्रिम, अजीवित पदार्थ हैं।

इस प्रकार सिवा इसके कि जीवाणु के एक प्रकार तथा माइक्रोस्फियर दोनों के निर्माण के लिए उन्हीं ऊष्मीय पेप्टाइडों का उपयोग किया गया है, दोनों प्रकार के कणों में कई मौलिक भेद हैं।

बहादुर के अनुसार जीवाणु जिनमें वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण बिना किसी बाहरी रसायन की सहायता के होते हैं, और सूक्ष्म जीवों के अनुसार जिनका कल्चर बनाया जा सकता है, तथा जिनमें आकस्मिक परिवर्तनशीलता के गुण होते हैं, संभवतः पहली जीवित प्रणाली थी, और कोशीय जीवों के पूर्वज थे। माइक्रोस्फियर के सम्बन्ध में टिप्पणी देते हुये उपर्युक्त रिपोर्ट के पृष्ठ 15 पर फाक्स महोदय लिखते हैं :

"स्वभावतः जीवन की परिभाषा प्रस्तुत करने की कठिनाई को अधिक विस्तार से इस आधार पर समझा जा सकता है कि जीवन के विभिन्न गुणों को क्रमशः एक एक करके प्रस्तावित प्रतिरूप के अनुसार एक सरल निर्जीव प्रणाली में सफलता से उत्पन्न किया जा सकता है।

"मेरी प्रयोगशाला की अन्य खोजों से, जिनका वर्णन यहाँ नहीं किया गया है, ऐसी घटनाओं पर प्रकाश पड़ता है जिनसे जीवित प्रक्रमों वाले गुण उत्पन्न हो जाते हैं। यह देखने में जटिल इकाइयाँ तथा प्रक्रम प्राकृतिक प्रयोगों के समान सरलता से सम्पन्न हो जाते हैं। उत्पाद मुख्यतः कृत्रिम रूप के ही हैं; यद्यपि वे मनुष्य के हाथों निर्मित हैं; परन्तु उनके उत्पादन का ढंग भूगर्भशास्त्रीय ढंग के अनुसार है।"

माइक्रोस्फियर के सम्बन्ध में यह एक ठीक कथन प्रतीत होता है क्यों कि जीवित प्रणालियों में दिखाई पड़ने वाले विभिन्न गुण इन कृत्रिम कणों में भी उपयुक्त भौतिक-रासायनिक दशायें उत्पन्न करके देखे जा सकते हैं। इस प्रकार वर्षा के पानी की एक बूंद आकाश से गिरते समय असंख्य सूक्ष्म बिन्दुओं में विभाजित हो जाती है, परन्तु इसे जैविक अर्थ में गुणन नहीं कहा जा सकता। जेल का कण जलयोजन के द्वारा फूल जाता है, परन्तु यह जैविक वृद्धि नहीं है; एक सीमा के भीतर अनेक रासायनिक अभिक्रियाएँ हो सकती हैं, परन्तु इन्हें चयोपचय सक्रियता नहीं कहा जा सकता। जहाँ तक इस प्रकार के जैविक गुण किसी प्रणाली में इक्का-दुक्का दिखाई पड़ते हैं, और वह भी जब प्रणाली के परिवेशी माध्यम में कोई भौतिक रासायनिक परिवर्तन कृत्रिम रूप से कर दिया जाता है; इन गुणों का जैविक गुणों से कोई सम्बन्ध नहीं है। बहुत से कृत्रिम कणों में एक रचना भी दिखाई पड़ती है।

परन्तु यदि (*i*) कोई पलिघ एक परिवेशी माध्यम में, माध्यम के अणुओं से उस पदार्थ का संश्लेषण करके बढ़ता है, जिससे वह स्वयं निर्मित है, (*ii*) और एक विशिष्ट आकार को प्राप्त करने के बाद गुणन करता है, जिससे प्रणालियों की संख्या में वृद्धि एक ऐसे प्रक्रम के द्वारा होती है, जिसमें पितृ प्रणाली से ही बिना किसी बाह्य रसायन की सहायता से नवीन प्रणालियों का निर्माण होता है, (*iii*) यदि प्रणाली के अन्दर एक क्रम से ऐसे अनेक रासायनिक अभिक्रियाएँ होती हैं जिनके फलस्वरूप वातावरण के अणु प्रणाली में प्रवेश करके प्रणाली के अवयवी पदार्थ का संश्लेषण करते हैं, और ऊर्जा की आवश्यकताओं की पूर्ति करते हैं, (*iv*) यदि सूक्ष्म जीवाणुओं के समान विशिष्ट परिवेशी माध्यम में उनके कल्चर उगाये जा सकते हैं, (*v*) यदि इन प्रणालियों में आकस्मिक और परिस्थितिअनुकूल परिवर्तन दिखाई पड़े, और इस प्रकार विकास की क्षमता हो, तो ऐसी प्रणाली को एक जीवित प्रणाली मानना पड़ेगा, चाहे जीवन की कोई भी परिभाषा दी जाये या एक जीवित प्रणाली में कुछ भी मौलिक गुण माने जायें। जीवाणु में यह सभी गुण पाये जाते हैं। अन्ततः जैसा मौरिसन[25]

ने बल दिया था, जीवन किसी न किसी प्रकार के कृत्रिम कण से उत्पन्न हुआ होगा, और इस सम्बन्ध में यह महत्वपूर्ण प्रश्न केवल यह है कि वह कौन सा कृत्रिम कण था और वह किस प्रकार उत्पन्न हुआ। जीवाणु का संश्लेषण इस प्रश्न का उत्तर देता है। प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा जीवाणु के निर्माण के कार्य की पुष्टि अभी हाल में ब्रिग्स[16] ने की है।

ऐसा प्रतीत होता है कि वृद्धि, गुणन, चयोपचय सक्रियता के गुण कई कणों में दिखाई पड़ सकते हैं। गुम्पर्ट[26] ने चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त इकाइयों में वृद्धि तथा गुणन के गुण एक नितान्त भिन्न वातावरण में देखे हैं। वे लिखते हैं,

"मैं एक सूक्ष्मजैविकी वैज्ञानिक हूँ और बैक्टीरिया के *L* रूपों, तथा *PPLO* पर कार्य करता हूँ, जो कि ऐसे सूक्ष्मजीव हैं जिनमें कोई कोशीय दीवार नहीं होती, और संरचना बहुत सरल होती है।

मुझे आपके कार्यक्षेत्र में बड़ी रुचि है, प्रथमतः केवल सैद्धांतिक रूप से, क्योंकि जीवन के उत्पत्ति की समस्या का सूक्ष्म जैविकी वैज्ञानिकों के लिये भी बहुत महत्व है। प्रथम जीव बैक्टीरिया के ही समान रहे होंगे। इसके विपरीत हम लोगों ने एक ऐसी समस्या का अध्ययन किया है जो बहुत समान प्रतीत होती है। सरिम के साथ जीवाणुओं के माध्यम में, जैसा कि उनका उपयोग *PPLO* और *L*-प्रकार के जीवाणु के कल्चर उगाने में किया जाता है, तथा औषधि में प्रयुक्त सरिम के संचय में, गोलाकार इकाइयाँ बन जाती हैं जिन्हें फेज-कन्ट्रैक्ट सूक्ष्मदर्शी के द्वारा *L*-प्रकार तथा *PPLO* जीवाणुओं से अलग नहीं पहचाना जा सकता। ये इकाइयाँ कली बनाकर बढ़ती हैं, इनमें चयोपचय सक्रियता के गुण भी होते हैं, परन्तु ये पृथ्वी पर पाये जाने वाले जीव नहीं हैं। इस संदर्भ में आपके प्रयोगफलों में मुझे बड़ी रुचि हो गई है।"

जैविक प्रकार की वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता उत्पन्न करने वाली आणविक क्रियाविधि का सुझाव दिया गया है[19]। अभी हाल में गैबेल[27] ने वृद्धि तथा गुणन के लिये बहुलक अणुओं के समान पालीफास्फेट ढाँचे पर एक संभाव्य क्रियाविधि का सुझाव दिया है। क्या इस प्रकार की वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता की तुलना जैविक प्रणालियों में पाये जाने वाले इन गुणों से की जा सकती है, इस बात की चर्चा ऊपर की गई है, और बहादुर[19] ने इस पर विस्तार से विवेचना की है। आवश्यक गुणों के इस वर्णन में, जिनके आधार पर किसी प्रणाली को जीवित पदार्थों में वर्गीकृत किया जा सकता है, परिवर्तनशीलता का उल्लेख नहीं किया गया है, क्योंकि परिवर्तनशीलता को साम्यावस्था में स्थित सभी प्रणालियों का जन्मजात गुण माना जाता है, और एक जीवित प्रणाली गतिशील साम्यावस्था में स्थित प्रणाली है। जीवाणु में आकस्मिक परिवर्तन, वे शीघ्र परिवर्तन जिनसे उनकी रचना तथा रूप में विशेष अन्तर आ जाता है, तथा परिस्थितिनुकूल परिवर्तन, जो वातावरण में थोड़े थोड़े परिवर्तन के साथ धीरे धीरे होते हैं, दोनों दिखाई पड़ते हैं। इस प्रकार जीवाणु को अपने कार्बन के भोजन के लिये उन कार्बनिक पदार्थों का उपयोग करना सिखा दिया गया है, जिन्हें कि वह प्रारम्भ में प्रयोग करते थे[23]। उनके विशिष्ट माध्यम में कल्चर भी उगाये जा सकते हैं[21,22]। इस प्रकार यद्यपि जीवों और अजीवों के मध्य कोई विभाजन रेखा खींचने का प्रयत्न नहीं किया गया है, परन्तु जीवणु में जैविक प्रणालियों के मान्य गुण प्रदर्शित किये गये हैं, अर्थात् वे बढ़ते हैं, कली बन कर गुणन करते हैं, उनमें चयोपचय सक्रियता होती है, वे आकस्मिक तथा परिस्थितिनुकूल परिवर्तन दिखाते हैं, उनके कल्चर बनाये जा सकते हैं और इस प्रकार विकास करने में समर्थ हैं।

निर्देश

1. लोएब, डब्लू० । — बरडश० केमि० गेस, 1913, **46,** 690 ।

2. मिलर, एस० । — साइन्स, 1953, **117,** 528 ।

3. बहादुर, के० । — नेचर, 1954, **173,** 1114 ।

बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । — कैम्प० रेन्ड० पेरिस, 1955, **240**, 246-8; प्रोसी० नेश० एकैड० साइं० इंडिया, 1954, **23A,** 21; जर्न० एकैड० साइं० यू० एस० एस० आर०, 1957, **6,** 754; जर्न० जन० केमि० यू० एस० एस० आर०,1963, **33** ।

बहादुर, के०, रंगनायकी, एस०, तथा सांतामेरिया, एल० । — नेचर, 1958, **182,** 1668 ।

बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । — जर्न० एकैड० साइं० यू० एस० एस० आर०, 1962, **9,** 1608-11;

इज्व०, एन० एन० । यु० एस० एस० आर० । आप्ट किमि० एन०, 1963, **6,** 1070-74 ।

जुर्न० आब्जर्व० किमी०, 1961, **31,**(XCIII) 317-20

विज्ञान परि० अनु० पत्रिका, 1962, **5,** 57-59 ।

बहादुर के० तथा अग्रवाल के० एम० एल० । — प्रोसी० नेश० एकै० साइं० इंडिया, 1962, **32A,** 83; जर्न० इण्ड० रिस० इंडिया, 1962, **21B,** (**7**), 335-37 ।

4. हैसेलस्ट्राम, टी०, हेनरी, एम० सी०, तथा मुर, बी० । — साइंस, 1957, **125,** 350 ।

5. ओरो, जे० । — एन्न० न्यूयार्क एके० साइं०, 1963, **108,** 464; आर्क० बायोकेमि० बायोफिज०, 1961, **94,** 217-227; 1962, **96,** 292-313 ।

6. ग्राथ, डब्लू० तथा वेसेन्ट्राफ, एच० वी० । — नेचरविशेनशाफटेन, 1957, 510 ।

7. डोस, के० तथा बैजेस्की, बी० । **बायोकेम० ए बायोफिज० एक्टा,** 1957, **25,** 225 ।

8. फाक्स, एस० डब्लू०, हर्डी के०, तथा वेगास्की, ए० । **एक्सपीरिन्शिया,** 1959, **15,** 81 ।

9. एकाबोरी, एस० । **प्रोसी० फर्स्ट इन्टरनेशनल सिम्पोजियम,** "The Origin of Life on the Earth", **मास्को,** 1957, **पर्गमान प्रेस,** 1959, 169-195 ।

10. टेरेनिन, ए० एन० । **माइक्रोकेमि० ऐक्टा,** 1955, **2-3,** 467; Symposium, Problem of Kinetics and Catalysis, XIII, Ed., **एकैड० साइं० यू० एस० ए० आर०,** 1955, 27-30 ।

11. बर्नाल, जे० डी० । **ओसेनोग्राफी, अमे० एसो० आफ एडवान्स० साइं०'** 1961, 95-118 ।

12. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **इज्वेस्तिया एकै० नाउक यू० एस० एस० आर०,** 1958, **11,** 1361-69 ।
प्रोसी० नेश० एकै० साइ० इंडिया, 1958, **27A,** 292-95 ।

बहादुर के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । **इंड० जर्न० एप्ला० केमि०,** 1960, **23** (3), 131-34 ।

बहादुर, के० तथा पांडे, आर० एस० । **जर्न० इंड० केमि० सोसा०,** 1950, **42** (2), 75-85 ।

13. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के०, तथा पाठक, एच० डी० । **प्रोसी० नेश० एकै० साइं० इंडिया,** 1961, 30A, 206-20 ; **इंडि० जर्न० एप्ला० केमि०,** 1961, **25,** 90-96; **बायो० केमि० जर्न० यू० एस० एस० आर०** 1962, **27,** 708-714 ।

14. लोव, सी० वी०, रीज़, एम० डब्लू०, तथा मार्खम, आर० । **नेचर,** 1963, **199,** 219-222 ।

15. ओपेरिन, ए० आई० । "Origin of Life on the Eearth" **एकैडमिक प्रेस,** 1957 ।

16. ब्रिग्स, एम० एच०। — **स्पेस फ्लाइट**, 1965, **7**(4), 129-131।

17. वाल्ड, जी०। — **साइंटिफिक अमैरिकन**, 1954, 44-53; **एन्न० न्यूयार्क एकैं० साइं०**, 1957, **69**, 352-368।

18. बहादुर, के० एवं अन्य। — **विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका**, 1963, **6**, 63।

19. बहादुर, के०। — **जेन्ट० बैक्ट०**, 1964, **118** (2), 671-694।

20. जार्डन, पी०। — **फिज० जर्न०** 1938, **39**, 711; **जर्न० फिज०**, 1939, **113**, 431; **फन्डा० रेडियोला०** 1939, **5**, 43; **जर्न० इम्यून० फार्ख०**, 1940, **97**, 380।

21. बहादुर, के० एवं अन्य। — **जेन्ट० बैक्ट०**, 1964, **117**, 567-584।

22. बहादुर, के०। — **वही**, 1964, **117**, 585-602।

23. बहादुर, के०। — "Synthesis of Jeewanu, the Proto cells", **राम नारायण लाल बेनी प्रसाद पब्लिशर्स, इलाहाबाद, इंडिया**, 1966।

24. फाक्स, एस० डब्लू० एवं अन्य। — Contribution No. 050 of the Institute of Molecular Evolution, **मियामी यूनि०, यू० एस०, ए०** 1965।

25. मैरीसन, पी०। — **साइंस**, 1962, **135**, 663-64।

26. गुम्पर्ट, जे०। — **व्यक्तिगत पत्र व्यवहार**, 1965।

27. गेबेल, एन० डब्लू०। — Life Sciences, **पर्गमान प्रेस लि०**, Vol. 4, 1965, 2085-2095।

विज्ञान परिषद् अनुसन्धान पत्रिका
1966, 9, 171-182

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1966, 9, 171-182

जीवाणु (जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूह) का निर्माण

कृष्ण बहादुर तथा एस० रंगनायकी

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—सितम्बर 24, 1966]

सारांश

जीवन की उत्पत्ति के विषय में अजैविक उत्पत्ति सिद्धान्त की विवेचना की गई है तथा जलीय मिश्रणों में कोलाइडी अवस्था में अधिक पृष्ठीय क्षेत्रफल से युक्त अकार्बनिक उत्प्रेरकों की उपस्थिति में होने वाली प्रकाश-रासायनिक अभिक्रियाओं के महत्त्व पर बल दिया गया है। इन मिश्रणों में ऐमीनो अम्ल और पेप्टाइड बनते हैं। यह सुझाव दिया गया है कि द्रव्य में द्विगुणित होने तथा परिस्थिति के अनुसार अपने को ढाल लेने के जन्मजात गुण होते हैं और उचित दशाओं में ये ऐसे आणविक समूहों के निर्माण में सहायक होते हैं जिनमें वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण होते हैं। ऐसे आणविक समूह विभिन्न प्रक्रमों के द्वारा संश्लेषित किये गये हैं। इन्हें "जीवाणु" की संज्ञा दी गई है। जीवाणु अपने परिवेशी माध्यम से भोज्य पदार्थ का उपयोग करके बढ़ते हैं तथा एक विशिष्ट आकार को प्राप्त करने के बाद **कली बना बना कर** (Budding) अपनी संख्या में वृद्धि करते हैं। उनमें आकस्मिक तथा परिस्थिति के अनुसार परिवर्तन भी दिखाई पड़ते हैं तथा उनमें विकास की भी क्षमता पाई जाती है। जीवाणुओं को उनके विशिष्ट माध्यम (कल्चर) में उत्पन्न भी किया जा सकता है। इसी प्रकार जीवाणु में एक जीवित पदार्थ के सभी आवश्यक गुण पाये जाते हैं, परन्तु इसका संश्लेषण अजीवित पदार्थ से किया गया है। जीवाणु का संश्लेषण प्राकृतिक दशाओं में हो सकता है, और संभवतः कोशीय जीवन के पूर्व जीवाणुओं हो का निर्माण हुआ होगा। अभी हाल में फाक्स ने माइक्रोस्फियर में एक एक करके वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुणों के प्रमाण दिये है।

Abstract

Formation of Jeewanu, the molecular association wih properties of biological order. *By* K. Bahadur and S. Ranganayaki, Department of Chemistry, University of Allahabad.

The abiogenic approach to the problem of origin of life has been discussed and the importance of the photochemical reactions taking place in aqueous mixtures, having inorganic catalysts with large surface areas as in colloidal conditions is stressed. Amino acids and peptides are formed in these mixtures. It has been suggested that matter has

inherent properties of duplication and adaptability and under suitable conditions these help in the formation of molecular associations with properties of growth, multiplication and metabolic activity. Such molecular associations have been synthesised by several processes. These have been named as JEEWANU. Jeewanu grow by utilising the nutrition from the environmental medium, after reaching a specific size they multiply by budding, they show mutational and adaptive changes and are capable of evolution. Jeewanu can be subcultured in their specific media. Jeewanu satisfy all the essentials for a living system but have been synthesised from non-living materials. Jeewanu can be synthesised under natural conditions and were thus, in all probability, the immediate precursors of cellular life. Recently Fox has produced the evidence of growth, multiplication and metabolic activity singly in microspheres.

जीवन की उत्पत्ति के विषय में आणविक विकास के प्रक्रम के द्वारा जीवोत्पति के आधुनिक सिद्धान्त का इतिहास बड़ा प्रभावशाली रहा है। जैविक कोटि के यौगिकों के अजैवी पद्धति द्वारा निर्माण, स्वयं द्विगुणित होती कलाओं के अध्ययन, तथा जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों की खोज में पर्याप्त संतोषजनक प्रगति हुई है। अजीवित पदार्थों से जीवोत्पत्ति का प्रथम चरण उन प्राकृतिक प्रक्रमों की खोज था, जिनके द्वारा जीवशास्त्र सम्बन्धी यौगिकों-जैसे ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड, प्यूरीन और पिरीमिडीन आदि का निर्माण हो सके। इन यौगिकों की अजैवी पद्धति द्वारा संश्लेषण के विभिन्न प्रक्रमों की खोज की गई। इन सभी प्रक्रमों ने जिनका उपयोग इन संश्लेषणों के हेतु किया गया है, संभवतः पूर्व जैविक युग में इन यौगिकों के निर्माण में कुछ न कुछ अंश तक अपना योगदान दिया होगा। परन्तु यदि अजैवी पद्धति द्वारा जीवोत्पत्ति के विभिन्न कारकों का, जिनके द्वारा प्रथम जीव उत्पन्न हुआ, एक स्पष्ट चित्र प्राप्त करना है तो यह नितांत आवश्यक है कि विभिन्न कारकों के अन्तर को समझा जाये; वे दशायें जो पृथ्वी पर बहुत अधिक काल तक बनी रहीं तथा वे दशाएं जो एकाएक थोड़े काल के लिये उत्पन्न हुईं—इन दोनों के महत्त्व का अन्तर समझा जाये। बहिर्जैविक अध्ययनों में विश्व में जीवन के ब्रह्मांडोत्पत्ति सम्बन्धी अनुमानों का विशेष महत्त्व है।

इन अध्ययनों में विशेष कठिनाई समय की पुरातनता के कारण है, जबकि संभवतः ऐसी अभिक्रियाओं के द्वारा ऐसे पदार्थों का निर्माण हो रहा था, जिनसे पूर्वतम जीवित पदार्थ बने। अभी भी उस समय में उपस्थित भौतिक—रासायनिक दशाओं के विषय में सही अनुमान लगाना बड़ा कठिन है। पृथ्वी तथा उसके परिवेश की उत्पत्ति के समय से लेकर उस काल तक के लिये जबकि पहले पहले जीवित पदार्थ उत्पन्न हुये, कोई भी बात निश्चित रूप से ऐसी नहीं कही जा सकती, जिसका कोई न कोई वैकल्पिक सुझाव न हो। ऐसी दशा में विज्ञान के एक मौलिक ल्येल-नियम का पालन ही सर्वोत्तम है, जिसका सुझाव उन्होंने अपने भूगर्भीय खोज के सम्बन्ध में दिया था। इस नियम के अनुसार भूकाल को वर्तमान का ही पश्च विस्तार समझना चाहिए, जब तक इसके विरुद्ध विश्वास करने के प्रबल कारण न हों।

अजैवी रीति द्वारा ऐमीनो अम्लों की उत्पत्ति के विषय में सर्वप्रथम प्रेक्षण 1913 में लोएब[1] का मिलता है जिन्होंने फार्मऐल्डीहाइड, अमोनिया तथा जल के मिश्रण में निःशब्द विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ग्लाइ-

सीन तथा एलानीन ऐमीनो अम्लों के निर्माण की सूचना प्रकाशित की। ऐमीनो अम्लों का संश्लेषण, गैसों के मिश्रण में विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके[2] तथा कार्बनिक यौगिक, आकार्बनिक उत्प्रेरक से युक्त निर्बीजीकृत जलीय मिश्रणों को प्रकाश में रख कर[3] किया गया है। हैसेलस्ट्राम ने अमोनियम ऐसीटेट के जलीय विलयनों को प्रकाश में रखा तथा गलाइसीन और ऐस्पार्टिक अम्ल[4] के निर्माण का प्रेक्षण किया। ऐमीनो अम्लों तथा जीवविज्ञान सम्बन्धी अन्य यौगिकों का संश्लेषण आइसोसायनेट[5] के उपयोग द्वारा किया गया है; और इसके हेतु अल्ट्रावायलेट किरणों[6] से लेकर एक्स-रे किरणों[7] तक तथा ऊर्जा के अन्य सभी स्रोतों का उपयोग किया गया है।

यदि पूर्वजैविक युग में ऊर्जा के इन विभिन्न स्रोतों की प्राप्ति की संभावना का मूल्यांकन किया जाय, तो जल की उपस्थिति के कारण अल्ट्रावायलेट या अन्य उच्च ऊर्जा युक्त विकिरणों द्वारा पर्याप्त रूप में अजैवी पद्धति द्वारा जैविक यौगिकों के उत्पत्ति की संभावना नहीं रह जाती, क्योंकि पृथ्वी की ओजोन पृष्ठ ने शीघ्र ही उन्हें पृथ्वी के तल तक पहुँचने से रोक दिया होता। पृथ्वी पर जल आदि-काल में ही उत्पन्न हो गया था, अतः इसकी उपस्थिति से उच्च ताप वाले प्रक्रमों की भी संभावना नहीं रहती। जल की उपस्थिति में ऐसे प्रक्रमों की संभावना ज्वालामुखियों के निकट बहुत सीमित क्षेत्र में ही हो सकती है। ऊर्जा के शेष अन्य स्रोत यथा विद्युत विसर्ग आदि आकस्मिक रूप में ही हो सकते हैं। पुरातन पृथ्वी के महासागरों में कार्बनिक अणु तथा अकार्बनिक उत्प्रेरक प्रचुर मात्रा में विद्यमान थे तथा सूर्य का प्रकाश भी पृथ्वी के जन्म काल से ही प्राप्य था। अतः प्रकाश-रासायनिक प्रक्रम ने न केवल ऐमीनो अम्ल वरन पेप्टाइड तथा जीवविज्ञान सम्बन्धी सभी महत्त्वपूर्ण अणुओं के निर्माण में एक प्रमुख योग दिया होगा।

अजैवी पद्धति द्वारा जीवोत्पत्ति में दूसरा महत्त्वपूर्ण चरण पेप्टाइड शृंखला के निर्माण का था। फाक्स[8] ने पेप्टाइड का संश्लेषण ऐमीनो अम्ल के मिश्रण को 180° पर कुछ घंटों तक गरम करके किया। एकाबोरी[9] ने ऐमीनो के जलीय मिश्रणों को अल्ट्रावायलेट प्रकाश में रखकर पेप्टाइडों का संश्लेषण किया। टेरेनिन[10] ने सुझाव दिया कि यदि ठोस वस्तुओं पर अभिकारी अणुओं को अधिशोषित कर लिया जाये, तो कम ऊर्जा द्वारा ही अभिक्रिया सम्पन्न हो जाने की संभावना है। बर्नाल[11] ने पृथ्वी पर कीचड़ में प्राप्त विकिरणों द्वारा पेप्टाइड के निर्माण की सूचना दी।

1958 में बहादुर और रंगनायकी ने[12] उत्प्रेरक के रूप में लौह तथा मालिब्डनम आक्साइड के कोलाइडीय विलयनों में युक्त एमीनो अम्लों के जलीय मिश्रणों में सूर्य के प्रकाश अथवा एक विद्युत बल्ब के कृत्रिम प्रकाश के प्रभाव के द्वारा पेप्टाइडों के निर्माण का प्रेक्षण किया। जलीय मिश्रणों में पेप्टाइडों के प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा निर्माण पर विस्तार से अनुसंधान कार्य किया गया है[12]। पर्ती तथा पाठक ने[13] अकार्बनिक उत्प्रेरकों की उपस्थिति में जलीय मिश्रणों में दृश्य प्रकाश तथा अल्ट्रावायलेट प्रकाश के उपयोग द्वारा पेप्टाइडों का निर्माण का प्रेक्षण किया है। ब्रिग्स[16] ने पेप्टाइड के प्रकाश-रासायनिक उत्पादन के प्रेक्षण की पुष्टि की है। लोव[14] ने जलीय मिश्रणों में, निर्जलीकारक के रूप में हाइड्रोजन सायनाइड के उपयोग के द्वारा पेप्टाइडों के संश्लेषण का प्रेक्षण किया है।

जलीय मिश्रणों में पेप्टाइडों का प्रकाश-रासायनिक उत्पादन बड़ा रोचक है और ऐमीनो अम्ल के प्रकाश-रासायनिक उत्पादन को ध्यान में रखते हुये इसका महत्त्व बहुत बढ़ जाता है, क्योंकि ऐसा संभव है

कि पुरातन काल में महासागरों में पहले ऐमीनो अम्लों का निर्माण हुआ हो और फिर पेप्टाइडों के निर्माण में उनका उपयोग किया गया हो।

अजैवी पद्धति द्वारा प्यूरीन, पिरीमिडीन, एडेनोसिन तथा न्यूक्लियोटाइड के निर्माण का अध्ययन विभिन्न वैज्ञानिकों ने किया है।

इसके बाद का महत्त्वपूर्ण पद जीवित प्रक्रम के संलक्षणों से युक्त आणविक समूहों के निर्माण का था। यद्यपि एक जीवित प्रणाली की परिभाषाओं में पर्याप्त अन्तर मिलता है, परन्तु यदि एक प्रणाली में वृद्धि, गुणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुण उपस्थित हों; जहाँ पर वृद्धि से तात्पर्य प्रणाली के अन्दर से उसी पदार्थ के संश्लेषण द्वारा, जिससे उस प्रणाली का निर्माण हुआ हो, उसके आकारकी वृद्धि से है; गुणन का तात्पर्य प्रणाली की संख्या में वृद्धि से है, जिसमें पितृ प्रणाली से नवीन प्रणाली का निर्माण हो; तथा चयोपचय सक्रियता का अर्थ एक सीमा के भीतर घटित अनेकों रासायनिक अभिक्रियाओं से है, जिनके फलस्वरूप प्रणाली में प्रवेश करने वाले परिवेशी अणुओं का कम से कम एक अंश उस पदार्थ में परिणत हो जाये, जिसके द्वारा उन इकाइयों का निर्माण हुआ हो और यदि प्रणाली में आकस्मिक तथा परिस्थिति के अनुकूल परिवर्तन करने के भी गुण हों, तो ऐसी प्रणाली को जीवित प्रणाली के अन्तर्गत रखा जा सकता है। यद्यपि उपर्युक्त गुण जीवित तथा अजीवित प्रणालियों के मध्य कोई विभाजन रेखा नहीं खींचते, परन्तु इनमें वे सभी गुण सम्मिलित हैं जो जीवित प्रणालियों के अधिक सन्निकट हैं, तथा इनसे कम गुणों से भी युक्त जीवित प्रणाली संभव है अतः यह निश्चित रूप से कहा जा सकता है कि यदि कोई प्रणाली इन सभी गुणों से युक्त हो तो उसे एक जीवित प्रणाली माना जायेगा।

जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों के संश्लेषण के कुछ आरम्भिक प्रयत्न सर्वविदित हैं। ओपेरिन[15] ने इस कार्य पर पुनः दृष्टि डाली है। इन प्रयोगों में सरल अकार्बनिक तथा कार्बनिक पदार्थों की अन्योन्य क्रिया द्वारा कोशों की रचना (morphology) को द्विगुणित करने के प्रयत्न किये गये। इन कणों के संदर्भ में ब्रिग्स महोदय[16] लिखते हैं, "इसमें कोई सन्देह नहीं कि इन बहुत से कार्यकर्त्ताओं द्वारा प्राप्त कणों की रचना जीवित कोशों के समरूप है, परन्तु इनमें केवल एक यही सादृश्य है, अन्यथा ये उत्पाद रासायनिक संघटन की दृष्टि से विभिन्न हैं; चयोपचय सक्रियता में अक्रिय हैं; और न बढ़ते हैं, न पुर्नजनन करते हैं। इसके अतिरिक्त इनका निर्माण ऐसे पदार्थों द्वारा तथा ऐसी दशाओं में हुआ है जो संभवतः प्रारम्भिक दशा में पथ्वी पर उपस्थित न थीं।"

कोसर्वेट में एक सीमारेखा दिखाई पड़ती है, और उनका विभाजन विखण्डन के द्वारा होता है। परन्तु अपकेन्द्रण पर उनका आकार नष्ट हो जाता है और उनका कोई निश्चित आकार भी नहीं होता। माइक्रोस्फियर ठोस पदार्थों के बने होते हैं और दबाने पर त्रिज्यानुसार टूट जाते हैं। उनका आकार कुछ घंटों तक ही रहता है, इसके पश्चात् वे मिलकर मिश्रण के तल पर ढेर बना लेते हैं। 1963 तक जबकि "जीवाणु" का कार्य सर्वप्रथम प्रकाशित हुआ, ऐसे प्रेक्षण किये गये कि माइक्रोस्फियर में एक सीमारेखा होती है, उनके परिवेशी माध्यम के हाइड्रोजन आयन सान्द्रता में परिवर्तन करने से उनके अवयवी पदार्थ घुल जाते हैं तथा वे द्विअंगी विखण्डन द्वारा विभाजित होते हैं।

सौर विकिरण एवं जीवन की उत्पत्ति

लेखक

कृष्ण बहादुर, एस० रंगनायकी तथा प्रतिभा श्रीवास्तव

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

1967, भाग 10, संख्या I, पृ० 51-61 से पुनर्मुद्रित

Solar radiations and origin of life

By

Krishna Bahadur, S. Ranganayaki and Pratibha Srivastava

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1967, Vol. 10, Part I, Pages 51-61

विज्ञान परिषद् अनुसंधान पत्रिका
1967, **10,** 51-61

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1967, **10,** 51-61

सौर विकिरण एवं जीवन की उत्पत्ति

कृष्ण बहादुर, एस० रंगनायकी तथा प्रतिभा श्रीवास्तव

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—जनवरी 8, 1967]

सारांश

जैसा कि हमारे ऋषियों का विश्वास था, सूर्य पृथ्वी का जीवनदाता है। सृष्टि के प्रारम्भ में पृथ्वी पर कार्बनिक पदार्थों तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त समुद्रों पर सूर्य के विकिरणों के प्रभाव से ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड, तथा जैविक कोटि के गुणों से युक्त सूक्ष्म कोशीय 'जीवाणुओं' का निर्माण हुआ। इन जीवाणुओं के भीतर जीव विज्ञान सम्बन्धी कार्बनिक पदार्थ बने, और धीरे धीरे विकास के साथ साथ जीवाणु अपनी आन्तरिक संरचना में अधिक जटिल होते गये, और इस प्रकार अंत में वर्तमान युग के कोशों की उत्पत्ति हुई।

Abstract

Solar radiations and origin of life. *By* Krishna Bahadur, S. Ranganayaki and Pratibha Srivastava, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

Thus as the sages believed, Sun is the life giver of our earth, and amino acids, peptides, and Jeewanu, the protocells, showing the properties of biological order were formed when the oceans of the primitive earth containing organic substances and inorganic catalysts were exposed to the solar radiations. Inside these Jeewanu, organic substances of biological interest were formed and in due course of evolution, Jeewanu became more and more complicated in internal structures, finally resulting in the cell of the present age.

पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति के क्षेत्र में कार्य करने वाले सभी वैज्ञानिक इस बात से सहमत हैं कि पूर्वतम कोशों के निर्माण के पूर्व उन कार्बनिक यौगिकों का संश्लेषण हुआ, जिनसे फिर बाद में इन कोशो का निर्माण हुआ। उन दशाओं पर विचार करते हुए, जिनमें कि इन पदार्थों का संश्लेषण प्राकृतिक वातावरण में हो सकता है, हमें पहले उन दशाओं पर विचार करना चाहिए, जो पृथ्वी पर इस समय भी उपस्थित हैं केवल उन अन्तरों को छोड़कर जो कि पृथ्वी और उसके वातावरण से जीवित पदार्थों की अन्तःक्रिया के कारण जैविक कोटि के गुणों तथा भौतिक-रासायनिक दशाओं में हुई हैं। यह बहुत आवश्यक है क्योंकि प्राप्त प्रमाणों के

आधार पर जीवन का उत्पति काल आज से लगभग 2-2·5 बिलियन वर्ष पूर्व प्रतीत होता है, और उस काल में उपस्थित दशाओं के सम्बन्ध में केवल अप्रत्यक्ष प्रमाण प्राप्त होता है, और बहुधा वे विभिन्न वैज्ञानिकों की कल्पना की उपज मात्र हैं। इसके अतिरिक्त अभी तक इस दिशा में खोज पूर्ण नहीं हुई है, जिनसे कि पृथ्वी की भौतिक-रासायनिक दशाओं का एक असंदिग्ध चित्र प्राप्त किया जा सके।

हाल में ऊर्जा के ऐसे स्रोतों की सहायता से जो कि सम्भवतः आकस्मिक थीं, और सामान्य नहीं हैं, जीवविज्ञान सम्बन्धी पदार्थों के संश्लेषण करने की एक विशेष प्रकृति रही है। इस प्रकार के संश्लेषण तभी संभव हुये होंगे, जबकि एकाएक कोई विशेष घटना हुई हो। अतः इस प्रकार के संश्लेषण का तभी महत्त्व हो सकता है जबकि यह निश्चित हो जाये कि ऐसे पदार्थों का निर्माण प्रकृति की सामान्य दशाओं में नहीं हो सकता।

यह निश्चित है कि पथ्वी के अस्तित्व के प्रारम्भ से ही सौर ऊर्जा प्राप्य रही है और इस प्रकार की ऊर्जा के उपयोग की सम्पन्न अभिक्रियाओं का पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति सम्बन्धी खोजों में विशेष महत्त्व है।

जीवन की उत्पत्ति के पूर्व अजैवी पद्धति द्वारा जैविक कोटि के निर्मित महत्त्वपूर्ण यौगिकों में ऐमीनो अम्लों का सर्वाधिक महत्त्व है, क्योंकि पृथ्वी पर ज्ञात जीवित पदार्थों का निर्माण मुख्यतः प्रोटीन से ही हुआ है।

सर्वप्रथम 1913 में लोएब[1] ने फार्मएल्डीहाइड, अमोनिया तथा जल के मिश्रण में निःशब्द विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ऐमीनो अम्ल का संश्लेषण किया। विद्युतीय विधि का प्रयोग करते हुये 1953 में मिलर ने उन गैसों में, जो सम्भवतः पृथ्वी के वातावरण में प्रारम्भिक दशा में उपस्थित थीं, विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ऐमीनो अम्लों का संश्लेषण किया। 1954 में बहादुर ने[2,3] प्रदर्शित किया कि एमीनो अम्लों का संश्लेषण प्रकाश-रासायनिक विधि के द्वारा, कार्बनिक कार्बन के स्रोत, तथा मिट्टी में सामान्यतः प्राप्त कार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त निर्बीजित जलीय मिश्रणों में किया जा सकता है। इस विषय पर अनेक वैज्ञानिकों ने अनेक शोध पत्र प्रकाशित किये हैं।[3–16] 1958 में सेंट मेरी औषधालय लंदन के प्रो० ए० न्यूबर्गर, एफ० आर० एस०, ने ऐमीनो अम्लो के संश्लेषण की इस सरल विधि की खोज के लिये बहादुर की सराहना की है।

पूर्वजैविक यग में ऐमीनो अम्लों के निर्माण की इस सरल विधि के द्वारा, जो कि सम्भवतः पुरातन पृथ्वी के तालाबों एवं समुद्रों में हुई होगी, पर्याप्त मात्रा में ऐमीनों अम्लों का निर्माण हुआ होगा। अभी हाल में कुछ लेखकों ने ऐमीनो अम्लों के निर्माण के हेतु विद्युत विसर्ग तथा अन्य तीव्र विकिरणों को सहायक मानने पर विशेष बल दिया है, यहाँ तक कि उन्होंने इन तीव्र विकिरणों के प्रभाव में उत्पन्न उत्पादों के स्थायित्व के सम्बन्ध में हल[17] के ऊष्मागतिकीय विचारों की भी पूर्णतः उपेक्षा कर दी है। यह सर्वविदित है कि पृथ्वी पर जल के आविर्भाव के साथ ही तीव्र पराबैंगनी विकिरणों का आना रुक गया और पृथ्वी पर उसकी उत्पत्ति के बाद शीघ्र ही जल उत्पन्न हो गया।

जैविक कोटि के यौगिकों में पेप्टाइड का निर्माण एक दूसरा महत्त्वपूर्ण चरण है। निर्बीजित जलीय मिश्रणों में प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड के निर्माण की सूचना सर्वप्रथम 1958 में[18,19]

प्रकाशित हुई। तब से भारत एवं विदेशों की अनेक प्रयोगशालाओं में इस दिशा में निरन्तर कार्य हो रहा है और इस विषय पर अनेक शोधपत्र प्रकाशित हुये हैं, जिनका संक्षेपन भी हो चुका है[20,21,22,23,24,25,26]। ऐसा देखा गया है कि यदि ऐमीनों अम्लों तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों के निर्बीजित जलीय विलयन को प्रकाश में रखा जाये, तो मिश्रण में अनेक पेप्टाइड बन जाते हैं। पूर्वजैविक युग में पेप्टाइड का निर्माण सरल था, इस प्रक्रम के लिये और सौर विकिरणों से आवश्यक ऊर्जा प्राप्त हुई।

26 से 28 फरवरी 1963, तक जेट प्रोपल्सन प्रयोगशाला, पैसाडेना में इंग्लैंड के डा० एम० एच० ब्रिग्स के तत्वधान में बहिःजीवविज्ञान के आधुनिक अनुसंधान कार्य पर एक गोष्ठी आयोजित हुई। उसमें प्रोफेसर जे० ओरो के शोधपत्र "The experimental investigation of chemical evolution" की विवेचना के समय, जिसमें ई० ऐन्डरस, जी० क्लास, एफ० फिच, एन० होरोविट्ज, एल० जाफे, बी० मैसन, बी० नैगी, जे० ओरो०, एफ० क्विम्बी, ओ० रेनोल्डस, सी० सागन, के० बहादुर, तथा बहिःजीवविज्ञान में महत्त्वपूर्ण कार्य करते हुये अन्य वैज्ञानिक उपस्थित थे, नोबल पुरस्कार विजेता प्रो० यूरे ने अपना मत प्रगट किया कि ज्वालामुखियों के निकट पेप्टाइड के निर्माण की खोज करने का प्रयत्न नितान्त हास्यापद है, तथा पेप्टाइड के निर्माण की खोज जलीय मिश्रणों में कीलेट बनाने वाले धात्विक आयनों की उपस्थिति में प्रकाश की सहायता के द्वारा किया जाना चाहिये। डा० एम० एच० ब्रिग्स प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड के निर्माण में उत्सुक हो गये तथा 17 मार्च, 1963 को उन्होंने जेट प्रोपल्सन प्रयोगशाला, कैलीफोर्निया इन्स्टीट्यूट आव टेक्नालाजी, पैसाडेना से बहादुर को एक पत्र में लिखा :—

"प्रकाश द्वारा पेप्टाइड के संश्लेषण की आप की विधि मुझे इस क्षेत्र में बहुत वर्षों के लिये सबसे महत्त्वपूर्ण प्रगति प्रतीत होती है, और मैं बड़ा कृतज्ञ हूँगा, यदि आप अपनी प्रयोगात्मक विधि के पूर्ण विवरण भेज दें, जिससे कि मैं भी इस कार्य को दुहरा सकूँ।"

ये पूरे विवरण डा० एम० एच० ब्रिग्स को भेजे गये, और 8 मई, 1963 को एक पत्र में उन्होंने लिखा :—

"हम लोगों ने सभी विलयनों को कृत्रिम प्रकाश में लगभग तीन सौ घंटों तक रखा, और सभी ने पेप्टाइड का निर्माण प्रदर्शित किया।"

पेप्टाइड निर्माण के इस कार्य की पुष्टि अनेक प्रयोगशालाओं में हो चुकी है, और इस विषय पर अनेक शोधपत्र प्रकाशित हो चुके हैं। इन शोध पत्रों में से अधिकांश का निर्देश बहिःजीवविज्ञान की विषयावली में हो चुका है जिसका संकलन, डा० एम० एच० ब्रिग्स के प्रधान सम्पादकत्व में जे० पी० एल० पैसाडेना के बहिःजीव विज्ञान विभाग ने एन० ए० एस० ए० के अर्न्तगत किया है।

वर्तमान काल में जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों के निर्माण की समस्या प्रमुख है। इस क्षेत्र में 1963 में उद्घोषित जीवाणु का कार्य प्रकाशित हो चुका है[27,28,29,30,31,32,33,34], और डा० एम० एच० ब्रिग्स ने[35,36] अपनी प्रयोगशाला में स्वतन्त्र रूप से इसकी दो बार पुष्टि भी की है। अन्तरिक्ष विज्ञान में प्रकाशित अपने शोध-पत्र "Experiments on origin of cells"[35] में डा० ब्रिग्स लिखते हैं :—

'अनेक लेखकों ने (ओपेरिन का रिव्यू देखिये[37]) सरल अकार्बनिक तथा कार्बनिक मिश्रणों की अन्तःक्रिया से कोशों की रचना को द्विगुणित करने के प्रयोग किये हैं। इसमें कोई सन्देह नहीं कि इन कार्यकर्ताओं द्वारा प्राप्त उत्पाद रचना में जीवित कोशों के समरूप हैं, परन्तु उनमें यही समानता है, अन्यथा वे रासायनिक संगठन में भिन्न हैं, चयोपचय सक्रियता की दृष्टि से अक्रिय हैं, न वृद्धि करते हैं, और न प्रजनन ही करते हैं। इसके अतिरिक्त ये कृत्रिम कोश ऐसे पदार्थों से तथा ऐसी दशाओं में बनाये गये हैं जो कि संभवतः पृथ्वी पर उसकी आरम्भिक अवस्था में उपस्थित न थे। इन उत्पादों में से केवल फाक्स[38] की रचनाएँ रोचक हैं, जिन्होंने यह प्रदर्शित किया है कि ऊष्मीय विधि द्वारा संश्लेषित प्रोटीनयुक्त पदार्थ जल में माइक्रोस्फियर उत्पन्न करते हैं।'

'अभी हाल में बहादुर[27] तथा पर्ती[31] ने सिट्रिक अम्ल तथा मालिब्डनम या आयरन के कोलाइडी लवणों से युक्त निर्बीजित विलयन पर सूर्य के प्रकाश अथवा पराबैंगनी लैम्प के प्रकाश के प्रभाव से कोशों के समान सूक्ष्म रचनाओं के एक श्रेणी (जिसका नामकरण उन्होंने एक संस्कृत शब्द "जीवाणु" जिसका अर्थ "जीवन के कण" है, किया है) का वर्णन किया है। **इस शोधपत्र का उद्देश्य इस कार्य की पुष्टि तथा विस्तार की सूचना देना है।**'

इन आणविक समूहों के रासायनिक संगठन का वर्णन करते हुए डा० ब्रिग्स[36] लिखते हैं:

'पुरातन जलमण्डल का छद्मरूप प्राप्त करने के लिये पहले एक किलोग्राम संपीड़ित यीस्ट को 500° सेन्डीग्रेड पर 12 घंटे तक गरम करके राख में परिणत किया गया। इस राख की कार्बनिक पदार्थों, तथा कोशीय अवशेषों के लिये परीक्षा की गई, तो उसमें ये नहीं पाये गये। फिर इस राख को तीन बार आसवित किये एक लीटर जल में विलयित किया गया।'

विभिन्न प्रकार के कार्बनिक मिश्रणों, यथा फार्मएल्डीहाइड+अमोनियम नाइट्रेट, ऐसेटएल्डीहाइड +अमोनियम नाइट्रेट, पैरा फार्मएल्डीहाइड + अमोनियम फास्फेट, टाइरोसीन अकेले, सिट्रिक अम्ल+ अमोनियम फास्फेट, तथा केवल कैसीन-हाइड्रोलिसेट की परीक्षा की गई। कुछ प्रयोगों में अकार्बनिक निलम्ब (फेरिक आक्साइड विलय, मालिब्डिक आक्साइड विलय, एलूमिना) मिलाकर उनके प्रभावों का भी अध्ययन किया गया।

विलयनों को क्वार्ट्ज के फ्लास्कों में लिया गया, और उन्हें सील करके आटोक्लेव में निर्बीजित किया गया। प्रत्येक प्रयोग में प्रत्येक प्रकार के विलयन के लिये चार-चार फ्लास्क लगाये गये। प्रत्येक विलयन के दो फ्लास्कों को तुरन्त मोटे काले कपड़े से ढक दिया गया, और अन्धेरे में एक बन्द दराज में रख दिया गया, और अन्य दो फ्लास्कों को 500 वाट के एक बल्ब के प्रकाश में चार से छः मास तक रखा गया। इसी प्रकार के दूसरे प्रयोगों में फ्लास्कों को, 300 मिली माइक्रान से कम वाली विकिरणों को हटाने वाले फिल्टर से युक्त एक उच्च दाब के पारद पराबैंगनी लैम्प के प्रकाश से अनुप्रभावित किया गया। फ्लास्कों को खोल कर उनके द्रव्यों की परीक्षा फौरन माइक्रोस्कोप से की गई। प्रत्येक फ्लास्क के द्रव्यों के इन्जेक्शन सूक्ष्मजीवाणुओं की निर्बीजित माध्यमों की श्रेणी तथा ऐगर के ढेरों में लगाये गये। इन्हें फिर सीलबन्द करके 37°सें० पर इन्क्यूबेटर में दो सप्ताह तक रखा गया। किसी भी माध्यम अथवा ऐगर पुंजों में सूक्ष्मजीवाणुओं की कोई वृद्धि नहीं दिखाई पड़ी, जिससे प्रगट हुआ कि फ्लास्क इन सूक्ष्म जीवाणुओं से मुक्त थे।

अंधेरे में रखे गये फ्लास्कों की माइक्रोस्पीय परीक्षा से उनमें कोई सूक्ष्म-रचनायें नहीं पाई गईं, परन्तु प्रकाश से अनुप्रभावित सभी फ्लास्कों में 0·5 माइक्रान से 15 माइक्रान तक की आकार वाली अनेक गोलाकार सूक्ष्म रचनायें दिखाई पड़ीं। इन रचनाओं में से अधिकांश एकाकी थीं, परन्तु कुछ में कलियाँ फूट रही थीं, और कुछ 3 से 15 तक के समूहों में उपस्थित थीं। सभी फ्लास्कों में, विभिन्न मात्राओं में, समान रचनायें दिखाई दीं।

प्रकाश से अनुप्रभावित विलयनों के बड़े नमूनों को फिर 5000 चक्र प्रति मिनट की गति से 30 मिनट तक अपकेन्द्रित किया गया, जिससे कि वे एक अवक्षेप तथा स्वच्छ विलयन में पृथक हो गये।

ऊपरी स्वच्छ विलयन, तथा घुले हुय अवक्षेपों के नमूनों में उच्च वोल्ट पर पत्रीय वैद्युत अपोहन (paper-electrophoresis) द्वारा ऐमीनो अम्लों का विश्लेषण किया गया। अंधेरे में रखे गये विलयनों की भी उसी प्रकार परीक्षा की गई। अंधकार में रखे किसी भी विलयन में (जिनमें प्रयोग के आरम्भ में एमीनो अम्ल नहीं मिलाये गये थे) कोई भी ऐमीनो अम्ल नहीं मिला। परन्तु प्रकाश से अनुप्रभावित सभी फ्लास्कों में, जिनमें प्रयोग के प्रारम्भ में एल्डीहाइड तथा अमोनियम लवण लिये गये थे, अब मुक्त ऐमीनो अम्ल उपस्थित थे, ग्लाइसीन, ग्लूटैमेट, एस्पर्टेट, तथा एलानीन सभी में पाये गये। लिये हुय एल्डीहाइडों की लगभग 0·1% मात्रा 4 मास के अनुप्रभावन के पश्चात् मुक्त एमीनो अम्लों के रूप में उपस्थित थी।

सभी फ्लास्कों के अवक्षेपों की परीक्षा से उन्हीं चार मुक्त एमीनो अम्लों की उपस्थिति का भान हुआ। अवक्षेपों से पत्र पर कई पेप्टाइड के धब्बे भी दिखाई पड़े, जो ब्रोमोफीनाल ब्लू से रंग देते थे। 5*N* हाइड्रोक्लोरिक अम्ल के द्वारा अवक्षेपों के जलअपघटन से अनेक ऐमीनो अम्ल मुक्त हुये, जिनकी पहचान वैद्युत अपोहन आरेख पत्र पर की गई। विभिन्न विलायकों में *Rf* मानों से निम्न ऐमीनो अम्लों की पहचान की गई :—

ग्लाइसीन, एलानीन, ग्लूटैमेट, ऐस्पर्टेट, हिस्टीडीन, लाइसीन, आर्जीनीन, सेरीन, थ्रियोनीन, फेनिल-एलानीन, ल्यूसीन, वैलीन।

जलअपघटित पदार्थों की भी परीक्षा पत्र क्रोमैटोग्राफीय विधि द्वारा विभिन्न वर्गों के कार्बनिक यौगिकों के लिये उपयुक्त विशिष्ट अभिकर्मकों को फुहार द्वारा छिड़क कर की गई। सिल्वर क्रोमेट और मरक्यूरिक नाइट्रेट-अमोनियम सल्फाइड विधियों से क्रोमेटोग्राम में ऐसे धब्बे स्पष्ट हुये जिनके *Rf* मान एडेनीन, और गुआनीन के समान थे। अमोनियामय सिल्वर नाइट्रेट, और एनीलीन-डाइफेनिलएमीन का प्रयोग ग्लूकोस, फ्रक्टोस, राइबोस, और 2-डिआक्सी राइबोस की पहचान के लिये किया गया। फीनाल हाइपोक्लोराइट ने सभी क्रोमैटोग्रामों में यूरिया के *Rf* मान वाले यौगिक से अभिक्रिया, जबकि डायजोकरण अभिक्रियाओं से बहुत से धब्बे दिखाई पड़े, जिनमें से तीन की पहचान वैनिलिक अम्ल, 3- हाइड्राक्सी बेन्जोइक अम्ल, और 4- हाइड्राक्सीफेनिल ऐसीटिक अम्ल के रूप में की गई।

विभिन्न अनुप्रभावन कालों के अनुसार प्रयोग में लिये गये कार्बनिक यौगिकों का लगभग 1% से 9% तक अन्य पदार्थों में परिणत हो गया।

अवक्षेपों की परीक्षा एन्जाइम-सक्रियता के लिये भी की गई है। अवक्षेपों में एस्टरेस, पेप्टीडेस और फास्फोटेस की परीक्षा सामान्य सूक्ष्म-औषधीय विश्लेषण विधियों द्वारा की गई । कुछ अवक्षेपों में पर्याप्त परिमाण में एस्टरेस सक्रियता, और कुछ अन्य अवक्षेपों में फास्फोटेस सक्रियता पाई गई। सक्रियता की मात्रा बहुत कम थी, परन्तु प्रयोगों को दोहराया जा सकता था, यद्यपि 5 मिनट तक 100° सेन्टीग्रेड पर गरम किये हुये अवक्षेपों में कोई सक्रियता नहीं दिखाई पड़ी। किसी भी अवक्षेप में पेप्टीडेस सक्रियता नहीं दिखाई पड़ी।

उपर्युक्त विधियों द्वारा संश्लेषित सूक्ष्म रचनाओं के माइक्रोस्कोप द्वारा विस्तृत अध्ययन से उनमें एक विशेष आन्तरिक संरचना भी दिखाई पड़ी। बहुतों में वैकुओल (vacuoles), गोलाकार ठोस पदार्थ तथा कोश की दीवार के समान रचनायें दिखाई दीं। कुछ रचनाओं में परावैंगनी प्रकाश में प्रकाशदीप्ति का गुण दिखाई पड़ा, जब कि कुछ को जीवविज्ञान में प्रयुक्त रंजकों (यथा अम्लीय कार्मीन, एज्यूर II, इयोसीन, हैमेटाक्सिलीन-इयोसीन, जैनस ग्रीन B, मेथिलीन ब्लू, उदासीन रेड निनहाइड्रिन, सैफ़ानीन, और टालुइडीन ब्लू) द्वारा रंजित किया जा सका।

अपने पत्र के अन्त में डा० ब्रिग्स[35] लिखते हैं :—

"0·5 से 15μ आकार की सूक्ष्म रचनायें, पुरातन जलमण्डल के सदृश्य खनिजीय माध्यम में सरल कार्बनिक यौगिकों के विलयन में, अधिक समय तक प्रकाश के प्रभाव से बन सकती हैं। इनमें से कुछ की वाह्य रचनायें सरल कोशों के समान हैं। इनमें प्रोटोप्लाज्म में पाये जाने वाले तमाम कार्बनिक यौगिक भी होते हैं। कुछ में क्षीण एन्जाइम सक्रियता भी दिखाई पड़ती है। यद्यपि जीवन, तथा जीवित पदार्थ की परिभाषा करना बड़ा कठिन है, परन्तु यह निस्सन्देह कहा जा सकता है, कि ये सूक्ष्म रचनायें जीवित कोशों के बहुत से अभिलक्षणों को पूरा करती हैं। यह सम्भव प्रतीत होता है कि वर्तमान प्रयोगों में प्रेक्षित रचनाओं के ही समान रचनायें सर्वप्रथम पृथ्वी के महासागरों में प्रचुरता से बनीं, और कोशीय जीवन का प्रादुर्भाव इन्हीं से हुआ।"

इस प्रकार डा० ब्रिग्स ने निम्नांकित प्रेक्षणों की पुष्टि की :—

1. प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा ऐमीनो अम्लों का निर्माण।

2. प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड का निर्माण।

3. अजैवी पद्धति द्वारा एन्जाइम सक्रिय पदार्थों का निर्माण[39] ।

4. उन दशाओं में जीवाणुओं का निर्माण, जो कि संभवतः आदि काल में पृथ्वी के महासागर में उपस्थित थीं, और इस प्रक्रम में प्रकाश की महत्त्वपूर्ण भूमिका[28,32]।

द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता किसी भी जीवित पदार्थ के मूल गुण हैं। न्यूक्लियक अम्लों के अतिरिक्त अन्य अणुओं का द्विगुणन प्रायः देखा गया है, और भौतिक-रसायनज्ञों के अनुसार यह केवल आत्म-उत्प्रेरण है।

आदियुगीन जीवित पदार्थ संभवतः केवल सरल अणुओं के बने होंगे, और उनमें द्विगुणन का प्रक्रम क्वाण्टम यांत्रिकी संस्पन्दन अभिक्रिया के विशेष स्थायित्व बल के द्वारा हुआ होगा। जब विकास के साथ, आदिकालीन जीवित पदार्थों के रचक अणु आकार में बड़े हो गये, जिसके फलस्वरूप प्रबल आणविक बल उत्पन्न हुये, और क्वाण्टम यांत्रिक संस्पन्दन अभिक्रिया बल के द्वारा प्रेरित द्विगुणन प्रक्रम में बाधा पड़ने लगी, तो न्यूक्लियक अम्लों ने इस कार्य को करना प्रारम्भ किया।

इस प्रकार जैविक परिवर्तनशीलता की परिभाषा इस प्रकार की जा सकती है:—यदि किसी जीवित जैविक फ्लास्क में कोई विकार उत्पन्न किया जाये, तो यथासम्भव उसमें ऐसा परिवर्तन होता है, जिससे कि उस विकार का प्रभाव अंशतः नष्ट हो जाये। प्रोटोप्लाज्म तथा कोश की गतिशील प्रकृति के कारण एक जीवित पदार्थ को साम्यावस्था में स्थित एक फ्लास्क माना जा सकता है। यदि परिवर्तनशीलता के उपर्युक्त वर्णन में "जीवित जैविक फ्लास्क" के स्थान पर 'साम्यावस्था में स्थित फ्लास्क" रखा जाये, तो उसका यह रूप हो जाता है:—यदि साम्यावस्था में स्थित किसी फ्लास्क में कोई विकार उत्पन्न किया जाये, तो यथासम्भव फ्लास्क में ऐसा परिवर्तन होता है, जिससे कि उस विकार का प्रभाव अंशतः नष्ट हो जाय। परन्तु यही ल शतालिये का नियम है। इन तथ्यों के प्रकाश में निम्नांकित सामान्य नियम दिया जा सकता है—द्रव्य में द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता के जन्मजात गुण होते हैं, और यदि उपर्युक्त दशायें उत्पन्न कर दी जायें तो द्रव्य के ये गुण प्रकाश में आ जाते हैं, जिसके फलस्वरूप वृद्धि, गणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त आणविक समूहों का निर्माण संभव हो जाता है।

जेन्ट्राब्लाट फर बैक्टीरियालाजी में प्रकाशित (**117**, 567, 574, 1964) अपने शोधपत्र "Synthesis of Jeewanu, the units capable of growth, multiplicationand metabolic activity" भाग में यह कहा है कि हमारे विचार से द्रव्य में द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता के जन्मजात गुण होते हैं, अर्थात् संक्षेप में **द्रव्य में जन्मजात रूप से जीवन है**, और यह केवल कुछ विशेष दशाओं में, जैविक कोटि के गुणों, यथा वृद्धि गुणन और चयोपचय सक्रियता, से युक्त रचनाओं के रूप में प्रकाश में आ जाता है। उपर्युक्त पत्र के पृष्ठ 572 पर अंतिम पैरा का प्रारम्भ इस प्रकार होता है:—

"इस प्रकार विरोधी प्रकृति के विभिन्न प्रक्रमों में यथा विलेयता और अविलेयता, पदार्थों की विलय और जेल अवस्थायें, प्रवेश्यता तथा अप्रवेश्यता, जलयोजन और निर्जलीकरण, अवशोषण और प्रवेश निषेध विन्दुओं की पदार्थों की परस्पर, तथा वातावरण के पदार्थों के साथ सक्रियता और अक्रियता, इस प्रकार के इन पदार्थों के इन सभी भौतिक-रासायनिक दशाओं पर आश्रित प्रक्रमों में एक ऐसी भी धारा वर्तमान थी, जिसके द्वारा द्रव्य के जन्मजात गुण, द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता भी अपनी भूमिका अदा कर सके, और इसके फलस्वरूप ऐसी इकाइयाँ बनीं जिनमें कि जीवित पदार्थों के गुण यथा वृद्धि, गुणन, और चयोपचय सक्रियता, दिखाई पड़े।,, आगे उसी पत्र के पृष्ठ 573 पर लिखा है:—

"इस प्रकार संक्षेप में, वृद्धि, गुणन और चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त इकाइयों के उत्पादन का प्रश्न केवल द्रव्य को ऐसी अवस्था में ले आना है, जहाँ उसके जन्मजात गणों का प्रकाशन हो सके, और यह एक डाक्टरी चीड़फाड़ के समान है, जिसमें कि आवश्यक परिवर्तनों के द्वारा केवल वस्तुओं को व्यवस्थित कर दिया जाता है, और शेष कार्य शरीर स्वयं कर लेता है।,,

फिर जेन्ट्राब्लाट फर बैक्टीरियालोजी में प्रकाशित शोधपत्र (**118,** 672-694, 1964) "Coversion of lifeless matter into living system" के पृष्ठ 685 पैरा दो में यह लिखा गया है :—

"इस प्रकार द्रव्य के जन्मजात गुणों, द्विगुणन और परिवर्तन-शीलता, को ध्यान में रखते हुए द्रव्य के ऐसे फ्लास्कों का उत्पादन संभव है जो कि उपयुक्त दशाओं तथा वातावरण के मिलने पर द्विगुणन और परिवर्तन-शीलता के गुण प्रदर्शित करें। ऐसे फ्लास्कों का निर्माण अनेक प्रकार के पदार्थों से किया जाता है, और उसकी वाह्य रचनाओं का विस्तारपूर्वक वर्णन किया गया है, और उनके उत्पादन की विधियों का भी वर्णन किया गया है[29,30,31,33]।"

ल्वाफ के कार्य से यह प्रकट है कि विकास के द्वारा अकेले कोष के गुणों में वृद्धि नहीं हुई है, प्रत्युत उसके कुछ गुणों की हानि ही हुई है[40]। परन्तु यह असम्भव लगता है, कि आकस्मिक रूप से उत्पन्न हुआ कोश इस प्रकार अनेक गुणों से युक्त हो जो विकास की प्रगति के साथ केवल घटते गये। इसके स्थान पर एक ऐसे फ्लास्क के निर्माण की कल्पना सरल है, जिसका निर्माण उसके रचक द्रव्य तथा वातावरण के भौतिक-रासायनिक गुणों के कारण हुआ, और फिर उसमें द्रव्य के जन्मजात गुणों, द्विगुणन तथा परिवर्तन-शीलता के कारण वृद्धि, गुणन और चयोपचय सक्रियता के गुण प्रगट हुये।"

उसी शोधपत्र के पृष्ठ 682 पर इकतीसवीं पंक्ति इस प्रकार प्रारम्भ होती है :—

"हमने यह सुझाव दिया है कि एक जीवित फ़्लास्क के रचक अणुओं ने उसका निर्माण उपयुक्त दशाओं में केवल अवसरवादिता के कारण नहीं किया है, प्रत्युत उसका निर्माण द्रव्य के जन्मजात गुणों के कारण हुआ है। हमारा विश्वास है कि द्रव्य में अनेक ज्ञात गुणों के अतिरिक्त परिवर्तनशीलता और द्विगुणन ये दो गुण और होते हैं।"

नवम्बर 1963 में तालाहासी में जीवन की उत्पत्ति, और अजैवी पद्धति द्वारा जैविक कोटि के यौगिकों के निर्माण सम्बन्धी विषयों के विभिन्न पक्षों पर विचार करने के लिये एक वाकुला सभा हुई। सभा का आयोजन एन० ए० एस० ए० की बहिर्जीवविज्ञान शाखा ने डा० फाक्स के तत्वधान में किया था। इस सभा में जीवन की उत्पत्ति के विभिन्न पक्षों पर विवेचना हुई, और इसी सभा में जीवन की उत्पत्ति क्षेत्र में कार्य करने वाले दो महान दिग्गजों, प्रो० ओपेरिन और प्रो० हाल्डेन, की सर्वप्रथम भेंट हुई। प्रो० जे० बी० एस० हाल्डेन इस सभा में भाग लेने के लिये भारत से गये थे। सभा से लौटने पर प्रो० हाल्डेन ने बहादुर को दिनांक 9 अप्रेल 1964 को एक पत्र नं० 64/0019 लिखा :—

"मैं नवम्बर मास के महीने में तालाहासी गया था। मुझे दुख था कि आप वहाँ पर नहीं थे, क्योंकि आपके जीवाणु उनके माइक्रोस्फियर की अपेक्षा कुछ दृष्टियों से जीवन के अधिक निकट हैं"

निर्देश

1. लोएव, डब्लू०। **बर० केम० गेस०,** 1913, **46,** 690.

2. बहादुर, के०। **नेचर,** 1954, **173,** 1141.

3. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **प्रोसी० नेश० एकैड० साइं० इंडिया,** 1954, **23A,** 21-23.

4. वही । **काम्प० रेण्ड० पेरिस,** 1955, **240,** 246-8.

5. वही । **यू० एस० एस० आर० एकैड० सांइ०,** 1957, **6,** 754-55.

6. बहादुर के० । "Origin of life on the earth" **पर मास्को में** 1957, **में हुई अन्तर्राष्ट्रीय गोष्ठी की रिपोर्ट, पर्गमान प्रेस, इंग्लिश संस्करण,** 1959, **पृष्ट** 91-96.

7. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **प्रोसी० नेश० एकैड० सांइ० इंडिया,** 1957, **26A,** 154,162.

8. बहादुर, के० रंगनायकी, एस० तथा सान्तामेरिया, एल० । **नेचर,** 1958, **182,** 1668.

9. बहादुर, के०, तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । **जुर्न० आब्साईकुम्,** 1961, XXXI(XCIII), 317-320.

१०. बहादुर, के०, तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **जर्न० इण्ड० रिसर्च, इण्डिया,** 1962, **21B,** 335-337.

11. बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर०बी० **विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका,** 1962, **5,** 57-59.

12. वही । **जर्न एकैड० साइं, यू० एस० एस० आर०,** 1962, **9,** 1608.

13. वही । **इस्व, ए० न०, य० एस० एस० आर०आट्ड खिम०,** 1963, **6,** 1070.

14. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **जर्न०जेन० केमि०, यू० एस० एस० आर०,** 1963, **33.**

15. बहादुर, के० तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **जर्न० आर्ग० केमि०, यू० एस० एस० आर०,**1963 **6,** III, 248.

16. वही । **विज्ञान परिषद् अनु० पत्रिका,** 1964, **7,** 2,51.

17. हल, डी० ई० । **नेचर,** 1960, **186,** 693.

18. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **इजवेस्तिया एकैडमी नाउक, यू०एस०एस०आर०,** 1958, II, 1361.

19. वही । **प्रोसी० नेश० एकैड० सांइ० इंडिया,** 1958, **27A,** 292.

20. वही । **विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका,** 1958, **1,** 99.

21. बहादुर के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । **इण्डि० जर्न० ऐप्ल० केमि०,** 1960, **23,** 131.

22. पर्ती, ओ० एन० बहादुर, के० तथा पाठक, एच० डी० । **प्रोसी० नेश० एकै० सांइ० इंडिया,** 1961, **30A,** 206.

23. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के०, तथा पाठक, एच० डी० । **इण्डि० जर्न० ऐप्ल० केमि०,** 1961, **25,** 90.

24. वही । **बायोकेमिस्ट्री जर्न०, यू०एस०एस०आर०,बीडी० I4, टी०,** 1962, **27,** 708.

25. बहादुर, के० तथा पांडे, आर० एस० । **जर्न० इण्डि० केमि० सोसा०,** 1965, **42,** 75.

26. वही । **विज्ञान परिषद् अनु० पत्रिका,** 1964, **7,** 57.

27. बहादुर, के० एवं अन्य सहयोगी । **वही,** 1963, **6,** 63.

28. बहादुर, के० और रंगनायकी, एस० । **जब्ल० बैक्ट०,** 1964, **117,** II, 567.

29. बहादुर, के० । **वही,** 1964, **117,** II, 575.

30. वही । **वही,** 1964, 117, II, 585.

31. पर्ती, ओ० एन० । **आगरा यूनि० जर्न० रिसर्च,** 1963, **12,** II, 1.

32. बहादुर, के० । **जब्ल० बैक्ट०,** 1964, 118,II, 671.

33. पर्ती, ओ० एन० एवं अन्य सहयोगी । **आगरा यूनि० रिसर्च जर्न०,** 1964, **13,** II, 1.

34. बहादुर, के० । "Synthesis of Jeewanu, the Protocell", रामनारायन लाल बेनी प्रसाद, पब्लिशर्स, इलाहाबाद, 1965.

35. ब्रिग्स, एम० एच० । "Experiments on the origin of cells" Space Flight, 1965, **7**, (4), 129-131.

36. वही । The formation of cell like structures by the action of light on a possible primitive earth hydrosphere", प्रकाश जीव विज्ञान की चतुर्थ अन्तर्राष्ट्रीय गोष्ठी में प्रस्तुत । सारांश गोष्ठी की रिपोर्ट में प्रकाशित, "Recent Progress in Photobiology" जुलाई, 1964, पृष्ठ 360.

37. ओपेरिन, ए० आई० । "Origin of life on the earth", एकैडेमिक प्रेस, 1957.

38. फाक्स, एस० डब्लू । "The Origin of prebiological systems", एकैडेमिक प्रेस, 1964.

39. बहादुर, के० तथा सक्सेना, इ० । विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका, 1963, **6**, 161.

40. ल्वाफ, ए० । L' evolution physiologique, el les des pertes des fonctions chez les microorganisms, Paris, 1943.

सौर विकिरण एवं जीवन की उत्पत्ति

लेखक

कृष्ण बहादुर, एस० रंगनायकी तथा प्रतिभा श्रीवास्तव

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

1967, भाग 10, संख्या I, पृ० 51-61 से पुनर्मुद्रित

Solar radiations and origin of life

By

Krishna Bahadur, S. Ranganayaki and Pratibha Srivastava

Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad

Reprinted from the *Vijnana Parishad Anusandhan Patrika*
Vijnana Parishad, Allahabad, India

1967, Vol. 10, Part I, Pages 51-61

विज्ञान परिषद् अनुसंधान पत्रिका
1967, **10,** 51-61

VIJNANA PARISHAD
ANUSANDHAN PATRIKA
1967, **10,** 51-61

सौर विकिरण एवं जीवन की उत्पत्ति

कृष्ण बहादुर, एस० रंगनायकी तथा प्रतिभा श्रीवास्तव

रसायन विभाग, प्रयाग विश्वविद्यालय, इलाहाबाद

[प्राप्त—जनवरी 8, 1967]

सारांश

जैसा कि हमारे ऋषियों का विश्वास था, सूर्य पृथ्वी का जीवनदाता है। सृष्टि के प्रारम्भ में पृथ्वी पर कार्बनिक पदार्थों तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त समुद्रों पर सूर्य के विकिरणों के प्रभाव से ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड, तथा जैविक कोटि के गुणों से युक्त सूक्ष्म कोशीय 'जीवाणुओं' का निर्माण हुआ। इन जीवाणुओं के भीतर जीव विज्ञान सम्बन्धी कार्बनिक पदार्थ बने, और धीरे धीरे विकास के साथ साथ जीवाणु अपनी आन्तरिक संरचना में अधिक जटिल होते गये, और इस प्रकार अंत में वर्तमान युग के कोशों की उत्पत्ति हुई।

Abstract

Solar radiations and origin of life. *By* Krishna Bahadur, S. Ranganayaki and Pratibha Srivastava, Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad.

Thus as the sages believed, Sun is the life giver of our earth, and amino acids, peptides, and Jeewanu, the protocells, showing the properties of biological order were formed when the oceans of the primitive earth containing organic substances and inorganic catalysts were exposed to the solar radiations. Inside these Jeewanu, organic substances of biological interest were formed and in due course of evolution, Jeewanu became more and more complicated in internal structures, finally resulting in the cell of the present age.

पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति के क्षेत्र में कार्य करने वाले सभी वैज्ञानिक इस बात से सहमत हैं कि पूर्वतम कोशों के निर्माण के पूर्व उन कार्बनिक यौगिकों का संश्लेषण हुआ, जिनसे फिर बाद में इन कोशो का निर्माण हुआ। उन दशाओं पर विचार करते हुए, जिनमें कि इन पदार्थों का संश्लेषण प्राकृतिक वातावरण में हो सकता है, हमें पहले उन दशाओं पर विचार करना चाहिए, जो पृथ्वी पर इस समय भी उपस्थित हैं केवल उन अन्तरों को छोड़कर जो कि पृथ्वी और उसके वातावरण से जीवित पदार्थों की अन्तःक्रिया के कारण जैविक कोटि के गुणों तथा भौतिक-रासायनिक दशाओं में हुई हैं। यह बहुत आवश्यक है क्योंकि प्राप्त प्रमाणों के

आधार पर जीवन का उत्पति काल आज से लगभग 2-2·5 बिलियन वर्ष पूर्व प्रतीत होता है, और उस काल में उपस्थित दशाओं के सम्बन्ध में केवल अप्रत्यक्ष प्रमाण प्राप्त होता है, और बहुधा वे विभिन्न वैज्ञानिकों की कल्पना की उपज मात्र हैं। इसके अतिरिक्त अभी तक इस दिशा में खोज पूर्ण नहीं हुई है, जिनसे कि पृथ्वी की भौतिक-रासायनिक दशाओं का एक असंदिग्ध चित्र प्राप्त किया जा सके।

हाल में ऊर्जा के ऐसे स्रोतों की सहायता से जो कि सम्भवतः आकस्मिक थीं, और सामान्य नहीं हैं, जीवविज्ञान सम्बन्धी पदार्थों के संश्लेषण करने की एक विशेष प्रकृति रही है। इस प्रकार के संश्लेषण तभी संभव हुये होंगे, जबकि एकाएक कोई विशेष घटना हुई हो। अतः इस प्रकार के संश्लेषण का तभी महत्त्व हो सकता है जबकि यह निश्चित हो जाये कि ऐसे पदार्थों का निर्माण प्रकृति की सामान्य दशाओं में नहीं हो सकता।

यह निश्चित है कि पथ्वी के अस्तित्व के प्रारम्भ से ही सौर ऊर्जा प्राप्य रही है और इस प्रकार की ऊर्जा के उपयोग की सम्पन्न अभिक्रियाओं का पृथ्वी पर जीवन की उत्पत्ति सम्बन्धी खोजों में विशेष महत्त्व है।

जीवन की उत्पत्ति के पूर्व अजैवी पद्धति द्वारा जैविक कोटि के निर्मित महत्त्वपूर्ण यौगिकों में ऐमीनो अम्लों का सर्वाधिक महत्त्व है, क्योंकि पृथ्वी पर ज्ञात जीवित पदार्थों का निर्माण मुख्यतः प्रोटीन से ही हुआ है।

सर्वप्रथम 1913 में लोएब[1] ने फार्मएल्डीहाइड, अमोनिया तथा जल के मिश्रण में निःशब्द विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ऐमीनो अम्ल का संश्लेषण किया। विद्युतीय विधि का प्रयोग करते हुये 1953 में मिलर ने उन गैसों में, जो सम्भवतः पृथ्वी के वातावरण में प्रारम्भिक दशा में उपस्थित थीं, विद्युत विसर्ग प्रवाहित करके ऐमीनो अम्लों का संश्लेषण किया। 1954 में बहादुर ने[2,3] प्रदर्शित किया कि एमीनो अम्लों का संश्लेषण प्रकाश-रासायनिक विधि के द्वारा, कार्बनिक कार्बन के स्रोत, तथा मिट्टी में सामान्यतः प्राप्त कार्बनिक उत्प्रेरकों से युक्त निर्बीजित जलीय मिश्रणों में किया जा सकता है। इस विषय पर अनेक वैज्ञानिकों ने अनेक शोध पत्र प्रकाशित किये हैं।[3–16] 1958 में सेंट मेरी औषधालय लंदन के प्रो० ए० न्यूबर्गर, एफ० आर० एस०, ने ऐमीनो अम्लो के संश्लेषण की इस सरल विधि की खोज के लिये बहादुर की सराहना की है।

पूर्वजैविक यग में ऐमीनो अम्लों के निर्माण की इस सरल विधि के द्वारा, जो कि सम्भवतः पुरातन पृथ्वी के तालाबों एवं समुद्रों में हुई होगी, पर्याप्त मात्रा में ऐमीनों अम्लों का निर्माण हुआ होगा। अभी हाल में कुछ लेखकों ने ऐमीनो अम्लों के निर्माण के हेतु विद्युत विसर्ग तथा अन्य तीव्र विकिरणों को सहायक मानने पर विशेष बल दिया है, यहाँ तक कि उन्होंने इन तीव्र विकिरणों के प्रभाव में उत्पन्न उत्पादों के स्थायित्व के सम्बन्ध में हल[17] के ऊष्मागतिकीय विचारों की भी पूर्णतः उपेक्षा कर दी है। यह सर्वविदित है कि पृथ्वी पर जल के आविर्भाव के साथ ही तीव्र पराबैंगनी विकिरणों का आना रुक गया और पृथ्वी पर उसकी उत्पत्ति के बाद शीघ्र ही जल उत्पन्न हो गया।

जैविक कोटि के यौगिकों में पेप्टाइड का निर्माण एक दूसरा महत्त्वपूर्ण चरण है। निर्बीजित जलीय मिश्रणों में प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड के निर्माण की सूचना सर्वप्रथम 1958 में[18,19]

प्रकाशित हुई । तब से भारत एवं विदेशों की अनेक प्रयोगशालाओं में इस दिशा में निरन्तर कार्य हो रहा है और इस विषय पर अनेक शोधपत्र प्रकाशित हुये हैं, जिनका संक्षेपन भी हो चुका है[20,21,22,23,24,25,26]। ऐसा देखा गया है कि यदि ऐमीनों अम्लों तथा अकार्बनिक उत्प्रेरकों के निर्बीजित जलीय विलयन को प्रकाश में रखा जाये, तो मिश्रण में अनेक पेप्टाइड बन जाते हैं। पूर्वजैविक युग में पेप्टाइड का निर्माण सरल था, इस प्रक्रम के लिये और सौर विकिरणों से आवश्यक ऊर्जा प्राप्त हुई ।

26 से 28 फरवरी 1963, तक जेट प्रोपल्सन प्रयोगशाला, पैसाडेन में इंग्लैंड के डा० एम० एच० ब्रिग्स के तत्वधान में बहिःजीवविज्ञान के आधुनिक अनुसंधान कार्य पर एक गोष्ठी आयोजित हुई। उसमें प्रोफेसर जे० ओरो के शोधपत्र "The experimental investigation of chemical evolution" की विवेचना के समय, जिसमें ई० ऐन्डरस, जी० क्लास, एफ० फिच, एन० होरोविट्ज, एल० जाफे, बी० मैसन, बी० नैगी, जे० ओरो०, एफ० क्विम्बी, ओ० रेनोल्डस, सी० सागन, के० बहादुर, तथा बहिःजीवविज्ञान में महत्त्वपूर्ण कार्य करते हुये अन्य वैज्ञानिक उपस्थित थे, नोबल पुरस्कार विजेता प्रो० यूरे ने अपना मत प्रगट किया कि ज्वालामुखियों के निकट पेप्टाइड के निर्माण की खोज करने का प्रयत्न नितान्त हास्यापद है, तथा पेप्टाइड के निर्माण की खोज जलीय मिश्रणों में कीलेट बनाने वाले धात्विक आयनों की उपस्थिति में प्रकाश की सहायता के द्वारा किया जाना चाहिये। डा० एम० एच० ब्रिग्स प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड के निर्माण में उत्सुक हो गये तथा 17 मार्च, 1963 को उन्होंने जेट प्रोपल्सन प्रयोगशाला, कैलीफोर्निया इन्स्टीट्यूट आव टेक्नालाजी , पैसाडेना से बहादुर को एक पत्र में लिखा :—

"प्रकाश द्वारा पेप्टाइड के संश्लेषण की आप की विधि मुझे इस क्षेत्र में बहुत वर्षों के लिये सबसे महत्त्वपूर्ण प्रगति प्रतीत होती है, और मैं बड़ा कृतज्ञ हूँगा, यदि आप अपनी प्रयोगात्मक विधि के पूर्ण विवरण भेज दें, जिससे कि मैं भी इस कार्य को दुहरा सकूं।"

ये पूरे विवरण डा० एम० एच० ब्रिग्स को भेजे गये, और 8 मई, 1963 को एक पत्र में उन्होंने लिखा :—

"हम लोगों ने सभी विलयनों को कृत्रिम प्रकाश में लगभग तीन सौ घंटों तक रखा, और सभी ने पेप्टाइड का निर्माण प्रदर्शित किया।"

पेप्टाइड निर्माण के इस कार्य की पुष्टि अनेक प्रयोगशालाओं में हो चुकी है, और इस विषय पर अनेक शोधपत्र प्रकाशित हो चुके हैं। इन शोध पत्रों में से अधिकांश का निर्देश बहिःजीवविज्ञान की विषयावली में हो चुका है जिसका संकलन, डा० एम० एच० ब्रिग्स के प्रधान सम्पादकत्व में जे० पी० एल० पैसाडेना के बहिःजीव विज्ञान विभाग ने एन० ए० एस० ए० के अन्तर्गत किया है।

वर्तमान काल में जैविक कोटि के गुणों से युक्त आणविक समूहों के निर्माण की समस्या प्रमुख है। इस क्षेत्र में 1963 में उद्घोषित जीवाणु का कार्य प्रकाशित हो चुका है[27,28,29,30,31,32,33,34], और डा० एम० एच० ब्रिग्स ने[35,36] अपनी प्रयोगशाला में स्वतन्त्र रूप से इसकी दो बार पुष्टि भी की है। अन्तरिक्ष विज्ञान में प्रकाशित अपने शोध-पत्र "Experiments on origin of cells"[35] में डा० ब्रिग्स लिखते हैं :—

'अनेक लेखकों ने (ओपेरिन का रिव्यू देखिये[37]) सरल अकार्बनिक तथा कार्बनिक मिश्रणों की अन्तःक्रिया से कोशों की रचना को द्विगुणित करने के प्रयोग किये हैं। इसमें कोई सन्देह नहीं कि इन कार्यकर्ताओं द्वारा प्राप्त उत्पाद रचना में जीवित कोशों के समरूप हैं, परन्तु उनमें यही समानता है, अन्यथा वे रासायनिक संगठन में भिन्न हैं, चयोपचय सक्रियता की दृष्टि से अक्रिय हैं, न वृद्धि करते हैं, और न प्रजनन ही करते हैं। इसके अतिरिक्त ये कृत्रिम कोश ऐसे पदार्थों से तथा ऐसी दशाओं में बनाये गये हैं जो कि संभवतः पृथ्वी पर उसकी आरम्भिक अवस्था में उपस्थित न थे। इन उत्पादों में से केवल फाक्स[38] की रचनाएँ रोचक हैं, जिन्होंने यह प्रदर्शित किया है कि ऊष्मीय विधि द्वारा संश्लेषित प्रोटीनयुक्त पदार्थ जल में माइक्रोस्फियर उत्पन्न करते हैं।'

'अभी हाल में बहादुर[27] तथा पर्ती[31] ने सिट्रिक अम्ल तथा मालिब्डनम या आयरन के कोलाइडी लवणों से युक्त निर्बीजित विलयन पर सूर्य के प्रकाश अथवा पराबैंगनी लैम्प के प्रकाश के प्रभाव से कोशों के समान सूक्ष्म रचनाओं के एक श्रेणी (जिसका नामकरण उन्होंने एक संस्कृत शब्द "जीवाणु" जिसका अर्थ "जीवन के कण" है, किया है) का वर्णन किया है। **इस शोधपत्र का उद्देश्य इस कार्य की पुष्टि तथा विस्तार की सूचना देना है।**'

इन आणविक समूहों के रासायनिक संगठन का वर्णन करते हुए डा० ब्रिग्स[36] लिखते हैं:

'पुरातन जलमण्डल का छद्मरूप प्राप्त करने के लिये पहले एक किलोग्राम संपीड़ित यीस्ट को 500° सेन्डीग्रेड पर 12 घंटे तक गरम करके राख में परिणत किया गया। इस राख की कार्बनिक पदार्थों, तथा कोशीय अवशेषों के लिये परीक्षा की गई, तो उसमें ये नहीं पाये गये। फिर इस राख को तीन बार आसवित किये एक लीटर जल में विलयित किया गया।'

विभिन्न प्रकार के कार्बनिक मिश्रणों, यथा फार्मएल्डीहाइड+अमोनियम नाइट्रेट, ऐसेटएल्डीहाइड +अमोनियम नाइट्रेट, पैरा फार्मएल्डीहाइड + अमोनियम फास्फेट, टाइरोसीन अकेले, सिट्रिक अम्ल+ अमोनियम फास्फेट, तथा केवल कैसीन-हाइड्रोलिसेट की परीक्षा की गई। कुछ प्रयोगों में अकार्बनिक निलम्ब (फेरिक आक्साइड विलय, मालिब्डिक आक्साइड विलय, एलूमिना) मिलाकर उनके प्रभावों का भी अध्ययन किया गया।

विलयनों को क्वार्ट्ज के फ्लास्कों में लिया गया, और उन्हें सील करके आटोक्लेव में निर्बीजित किया गया। प्रत्येक प्रयोग में प्रत्येक प्रकार के विलयन के लिये चार-चार फ्लास्क लगाये गये। प्रत्येक विलयन के दो फ्लास्कों को तुरन्त मोटे काले कपड़े से ढक दिया गया, और अन्धेरे में एक बन्द दराज में रख दिया गया, और अन्य दो फ्लास्कों को 500 वाट के एक बल्ब के प्रकाश में चार से छः मास तक रखा गया। इसी प्रकार के दूसरे प्रयोगों में फ्लास्कों को, 300 मिली माइक्रान से कम वाली विकिरणों को हटाने वाले फिल्टर से युक्त एक उच्च दाब के पारद पराबैंगनी लैम्प के प्रकाश से अनुप्रभावित किया गया। फ्लास्कों को खोल कर उनके द्रव्यों की परीक्षा फौरन माइक्रोस्कोप से की गई। प्रत्येक फ्लास्क के द्रव्यों के इन्जेक्शन सूक्ष्मजीवाणुओं की निर्बीजित माध्यमों की श्रेणी तथा ऐगर के ढेरों में लगाये गये। इन्हें फिर सीलबन्द करके 37°सें० पर इन्क्यूबेटर में दो सप्ताह तक रखा गया। किसी भी माध्यम अथवा ऐगर पुंजों में सूक्ष्मजीवाणुओं की कोई वृद्धि नहीं दिखाई पड़ी, जिससे प्रगट हुआ कि फ्लास्क इन सूक्ष्म जीवाणुओं से मुक्त थे।

अंधेरे में रखे गये फ्लास्कों की माइक्रोस्पीय परीक्षा से उनमें कोई सूक्ष्म-रचनायें नहीं पाई गईं, परन्तु प्रकाश से अनुप्रभावित सभी फ्लास्कों में 0·5 माइक्रान से 15 माइक्रान तक की आकार वाली अनेक गोलाकार सूक्ष्म रचनायें दिखाई पड़ीं। इन रचनाओं में से अधिकांश एकाकी थीं, परन्तु कुछ में कलियाँ फूट रही थीं, और कुछ 3 से 15 तक के समूहों में उपस्थित थीं। सभी फ्लास्कों में, विभिन्न मात्राओं में, समान रचनायें दिखाई दीं।

प्रकाश से अनुप्रभावित विलयनों के बड़े नमूनों को फिर 5000 चक्र प्रति मिनट की गति से 30 मिनट तक अपकेन्द्रित किया गया, जिससे कि वे एक अवक्षेप तथा स्वच्छ विलयन में पृथक हो गये।

ऊपरी स्वच्छ विलयन, तथा घुले हुय अवक्षेपों के नमूनों में उच्च वोल्ट पर पत्रीय वैद्युत अपोहन (paper-electrophoresis) द्वारा ऐमीनो अम्लों का विश्लेषण किया गया। अंधेरे में रखे गये विलयनों की भी उसी प्रकार परीक्षा की गई। अंधकार में रखे किसी भी विलयन में (जिनमें प्रयोग के आरम्भ में एमीनो अम्ल नहीं मिलाये गये थे) कोई भी ऐमीनो अम्ल नहीं मिला। परन्तु प्रकाश से अनुप्रभावित सभी फ्लास्कों में, जिनमें प्रयोग के प्रारम्भ में एल्डीहाइड तथा अमोनियम लवण लिये गये थे, अब मुक्त ऐमीनो अम्ल उपस्थित थे, ग्लाइसीन, ग्लूटैमेट, एस्पर्टेट, तथा एलानीन सभी में पाये गये। लिये हुय एल्डीहाइडों की लगभग 0·1% मात्रा 4 मास के अनुप्रभावन के पश्चात् मुक्त एमीनो अम्लों के रूप में उपस्थित थी।

सभी फ्लास्कों के अवक्षेपों की परीक्षा से उन्हीं चार मुक्त एमीनो अम्लों की उपस्थिति का भान हुआ। अवक्षेपों से पत्र पर कई पेप्टाइड के धब्बे भी दिखाई पड़े, जो ब्रोमोफीनाल ब्लू से रंग देते थे। $5N$ हाइड्रोक्लोरिक अम्ल के द्वारा अवक्षेपों के जलअपघटन से अनेक ऐमीनो अम्ल मुक्त हुये, जिनकी पहचान वैद्युत अपोहन आरेख पत्र पर की गई। विभिन्न विलायकों में Rf मानों से निम्न ऐमीनो अम्लों की पहचान की गई :—

ग्लाइसीन, एलानीन, ग्लूटैमेट, ऐस्पर्टेट, हिस्टीडीन, लाइसीन, आर्जीनीन, सेरीन, थ्रियोनीन, फेनिल-एलानीन, ल्यूसीन, वैलीन।

जलअपघटित पदार्थों की भी परीक्षा पत्र क्रोमैटोग्राफीय विधि द्वारा विभिन्न वर्गों के कार्बनिक यौगिकों के लिये उपयुक्त विशिष्ट अभिकर्मकों को फुहार द्वारा छिड़क कर की गई। सिल्वर क्रोमेट और मरक्यूरिक नाइट्रेट-अमोनियम सल्फाइड विधियों से क्रोमेटोग्राम में ऐसे धब्बे स्पष्ट हुये जिनके Rf मान एडेनीन, और गुआनीन के समान थे। अमोनियामय सिल्वर नाइट्रेट, और एनीलीन-डाइफेनिलएमीन का प्रयोग ग्लूकोस, फ्रक्टोस, राइबोस, और 2-डिआक्सी राइबोस की पहचान के लिये किया गया। फीनाल हाइपोक्लोराइट ने सभी क्रोमैटोग्रामों में यूरिया के Rf मान वाले यौगिक से अभिक्रिया, जबकि डायजोकरण अभिक्रियाओं से बहुत से धब्बे दिखाई पड़े, जिनमें से तीन को पहचान वैनिलिक अम्ल, 3- हाइड्राक्सी बेन्जोइक अम्ल, और 4- हाइड्राक्सीफेनिल ऐसीटिक अम्ल के रूप में की गई।

विभिन्न अनुप्रभावन कालों के अनुसार प्रयोग में लिये गये कार्बनिक यौगिकों का लगभग 1% से 9% तक अन्य पदार्थों में परिणत हो गया।

अवक्षेपों की परीक्षा एन्जाइम-सक्रियता के लिये भी की गई है। अवक्षेपों में एस्टरेस, पेप्टीडेस और फास्फोटेस की परीक्षा सामान्य सूक्ष्म-औषधीय विश्लेषण विधियों द्वारा की गई। कुछ अवक्षेपों में पर्याप्त परिमाण में एस्टरेस सक्रियता, और कुछ अन्य अवक्षेपों में फास्फोटेस सक्रियता पाई गई। सक्रियता की मात्रा बहुत कम थी, परन्तु प्रयोगों को दोहराया जा सकता था, यद्यपि 5 मिनट तक 100° सेन्टीग्रेड पर गरम किये हुये अवक्षेपों में कोई सक्रियता नहीं दिखाई पड़ी। किसी भी अवक्षेप में पेप्टीडेस सक्रियता नहीं दिखाई पड़ी।

उपर्युक्त विधियों द्वारा संश्लेषित सूक्ष्म रचनाओं के माइक्रोस्कोप द्वारा विस्तृत अध्ययन से उनमें एक विशेष आन्तरिक संरचना भी दिखाई पड़ी। बहुतों में वैकुओल (vacuoles), गोलाकार ठोस पदार्थ तथा कोश की दीवार के समान रचनायें दिखाई दीं। कुछ रचनाओं में परावैंगनी प्रकाश में प्रकाशदीप्ति का गुण दिखाई पड़ा, जब कि कुछ को जीवविज्ञान में प्रयुक्त रंजकों (यथा अम्लीय कार्मीन, एज्यूर II, इयोसीन, हैमेटाक्सिलीन-इयोसीन, जैनस ग्रीन B, मेथिलीन ब्लू, उदासीन रेड निनहाइड्रिन, सैफ़ानीन, और टालुइडीन ब्लू) द्वारा रंजित किया जा सका।

अपने पत्र के अन्त में डा० ब्रिग्स[35] लिखते हैं:—

"0·5 से 15μ आकार की सूक्ष्म रचनायें, पुरातन जलमण्डल के सदृश्य खनिजीय माध्यम में सरल कार्बनिक यौगिकों के विलयन में, अधिक समय तक प्रकाश के प्रभाव से बन सकती हैं। इनमें से कुछ की वाह्य रचनायें सरल कोशों के समान हैं। इनमें प्रोटोप्लाज्म में पाये जाने वाले तमाम कार्बनिक यौगिक भी होते हैं। कुछ में क्षीण एन्जाइम सक्रियता भी दिखाई पड़ती है। यद्यपि जीवन, तथा जीवित पदार्थ की परिभाषा करना बड़ा कठिन है, परन्तु यह निस्सन्देह कहा जा सकता है, कि ये सूक्ष्म रचनायें जीवित कोशों के बहुत से अभिलक्षणों को पूरा करती हैं। यह सम्भव प्रतीत होता है कि वर्तमान प्रयोगों में प्रेक्षित रचनाओं के ही समान रचनायें सर्वप्रथम पृथ्वी के महासागरों में प्रचुरता से बनीं, और कोशीय जीवन का प्रादुर्भाव इन्हीं से हुआ।"

इस प्रकार डा० ब्रिग्स ने निम्नांकित प्रेक्षणों की पुष्टि की :—

1. प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा ऐमीनो अम्लों का निर्माण।

2. प्रकाश-रासायनिक विधि द्वारा पेप्टाइड का निर्माण।

3. अजैवी पद्धति द्वारा एन्जाइम सक्रिय पदार्थों का निर्माण[39]।

4. उन दशाओं में जीवाणुओं का निर्माण, जो कि संभवतः आदि काल में पृथ्वी के महासागर में उपस्थित थीं, और इस प्रक्रम में प्रकाश की महत्त्वपूर्ण भूमिका[28,32]।

द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता किसी भी जीवित पदार्थ के मूल गुण हैं। न्यूक्लियक अम्लों के अतिरिक्त अन्य अणुओं का द्विगुणन प्रायः देखा गया है, और भौतिक-रसायनज्ञों के अनुसार यह केवल आत्म-उत्प्रेरण है।

आदियुगीन जीवित पदार्थ संभवतः केवल सरल अणुओं के बने होंगे, और उनमें द्विगुणन का प्रक्रम क्वाण्टम यांत्रिकी संस्पन्दन अभिक्रिया के विशेष स्थायित्व बल के द्वारा हुआ होगा। जब विकास के साथ, आदिकालीन जीवित पदार्थों के रचक अणु आकार में बड़े हो गये, जिसके फलस्वरूप प्रबल आणविक बल उत्पन्न हुये, और क्वाण्टम यांत्रिक संस्पन्दन अभिक्रिया बल के द्वारा प्रेरित द्विगुणन प्रक्रम में बाधा पड़ने लगी, तो न्यूक्लियक अम्लों ने इस कार्य को करना प्रारम्भ किया।

इस प्रकार जैविक परिवर्तनशीलता की परिभाषा इस प्रकार की जा सकती है:—यदि किसी जीवित जैविक फ्लास्क में कोई विकार उत्पन्न किया जाये, तो यथासम्भव उसमें ऐसा परिवर्तन होता है, जिससे कि उस विकार का प्रभाव अंशतः नष्ट हो जाये। प्रोटोप्लाज्म तथा कोश की गतिशील प्रकृति के कारण एक जीवित पदार्थ को साम्यावस्था में स्थित एक फ्लास्क माना जा सकता है। यदि परिवर्तनशीलता के उपर्युक्त वर्णन में "जीवित जैविक फ्लास्क" के स्थान पर 'साम्यावस्था में स्थित फ्लास्क" रखा जाये, तो उसका यह रूप हो जाता है:—यदि साम्यावस्था में स्थित किसी फ्लास्क में कोई विकार उत्पन्न किया जाये, तो यथासम्भव फ्लास्क में ऐसा परिवर्तन होता है, जिससे कि उस विकार का प्रभाव अंशतः नष्ट हो जाय। परन्तु यही ल शतालिये का नियम है। इन तथ्यों के प्रकाश में निम्नांकित सामान्य नियम दिया जा सकता है—द्रव्य में द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता के जन्मजात गुण होते हैं, और यदि उपर्युक्त दशायें उत्पन्न कर दी जायें तो द्रव्य के ये गुण प्रकाश में आ जाते हैं, जिसके फलस्वरूप वृद्धि, गणन तथा चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त आणविक समूहों का निर्माण संभव हो जाता है।

जेन्ट्राब्लाट फर बैक्टीरियालाजी में प्रकाशित (**117**, 567, 574, 1964) अपने शोधपत्र "Synthesis of Jeewanu, the units capable of growth, multiplicationand metabolic activity" भाग में यह कहा है कि हमारे विचार से द्रव्य में द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता के जन्मजात गुण होते हैं, अर्थात् संक्षेप में **द्रव्य में जन्मजात रूप से जीवन है**, और यह केवल कुछ विशेष दशाओं में, जैविक कोटि के गुणों, यथा वृद्धि गुणन और चयोपचय सक्रियता, से युक्त रचनाओं के रूप में प्रकाश में आ जाता है। उपर्युक्त पत्र के पृष्ठ 572 पर अंतिम पैरा का प्रारम्भ इस प्रकार होता है:—

"इस प्रकार विरोधी प्रकृति के विभिन्न प्रक्रमों में यथा विलेयता और अविलेयता, पदार्थों की विलय और जेल अवस्थायें, प्रवेश्यता तथा अप्रवेश्यता, जलयोजन और निर्जलीकरण, अवशोषण और प्रवेश निषेध विन्दुओं की पदार्थों की परस्पर, तथा वातावरण के पदार्थों के साथ सक्रियता और अक्रियता, इस प्रकार के इन पदार्थों के इन सभी भौतिक-रासायनिक दशाओं पर आश्रित प्रक्रमों में एक ऐसी भी धारा वर्तमान थी, जिसके द्वारा द्रव्य के जन्मजात गुण, द्विगुणन तथा परिवर्तनशीलता भी अपनी भूमिका अदा कर सके, और इसके फलस्वरूप ऐसी इकाइयाँ बनीं जिनमें कि जीवित पदार्थों के गुण यथा वृद्धि, गुणन, और चयोपचय सक्रियता, दिखाई पड़े।,, आगे उसी पत्र के पृष्ठ 573 पर लिखा है:—

"इस प्रकार संक्षेप में, वृद्धि, गुणन और चयोपचय सक्रियता के गुणों से युक्त इकाइयों के उत्पादन का प्रश्न केवल द्रव्य को ऐसी अवस्था में ले आना है, जहाँ उसके जन्मजात गणों का प्रकाशन हो सके, और यह एक डाक्टरी चीड़फाड़ के समान है, जिसमें कि आवश्यक परिवर्तनों के द्वारा केवल वस्तुओं को व्यवस्थित कर दिया जाता है, और शेष कार्य शरीर स्वयं कर लेता है।,,

फिर जेन्ट्राब्लाट फर बैक्टीरियालोजी में प्रकाशित शोधपत्र (**118,** 672-694, 1964) "Coversion of lifeless matter into living system" के पृष्ठ 685 पैरा दो में यह लिखा गया है :—

"इस प्रकार द्रव्य के जन्मजात गुणों, द्विगुणन और परिवर्तन-शीलता, को ध्यान में रखते हुए द्रव्य के ऐसे फ्लास्कों का उत्पादन संभव है जो कि उपयुक्त दशाओं तथा वातावरण के मिलने पर द्विगुणन और परिवर्तन-शीलता के गुण प्रदर्शित करें। ऐसे फ्लास्कों का निर्माण अनेक प्रकार के पदार्थों से किया जाता है, और उसकी वाह्य रचनाओं का विस्तारपूर्वक वर्णन किया गया है, और उनके उत्पादन की विधियों का भी वर्णन किया गया है[29,30,31,33]।"

ल्वाफ के कार्य से यह प्रकट है कि विकास के द्वारा अकेले कोष के गुणों में वृद्धि नहीं हुई है, प्रत्युत उसके कुछ गुणों की हानि ही हुई है[40]। परन्तु यह असम्भव लगता है, कि आकस्मिक रूप से उत्पन्न हुआ कोश इस प्रकार अनेक गुणों से युक्त हो जो विकास की प्रगति के साथ केवल घटते गये। इसके स्थान पर एक ऐसे फ्लास्क के निर्माण की कल्पना सरल है, जिसका निर्माण उसके रचक द्रव्य तथा वातावरण के भौतिक-रासायनिक गुणों के कारण हुआ, और फिर उसमें द्रव्य के जन्मजात गुणों, द्विगुणन तथा परिवर्तन-शीलता के कारण वृद्धि, गुणन और चयोपचय सक्रियता के गुण प्रगट हुये।"

उसी शोधपत्र के पृष्ठ 682 पर इकतीसवीं पंक्ति इस प्रकार प्रारम्भ होती है :—

"हमने यह सुझाव दिया है कि एक जीवित फ़्लास्क के रचक अणुओं ने उसका निर्माण उपयुक्त दशाओं में केवल अवसरवादिता के कारण नहीं किया है, प्रत्युत उसका निर्माण द्रव्य के जन्मजात गुणों के कारण हुआ है। हमारा विश्वास है कि द्रव्य में अनेक ज्ञात गुणों के अतिरिक्त परिवर्तनशीलता और द्विगुणन ये दो गुण और होते हैं।"

नवम्बर 1963 में तालाहासी में जीवन की उत्पत्ति, और अजैवी पद्धति द्वारा जैविक कोटि के यौगिकों के निर्माण सम्बन्धी विषयों के विभिन्न पक्षों पर विचार करने के लिये एक वाकुला सभा हुई। सभा का आयोजन एन० ए० एस० ए० की बहिर्जीवविज्ञान शाखा ने डा० फाक्स के तत्वधान में किया था। इस सभा में जीवन की उत्पत्ति के विभिन्न पक्षों पर विवेचना हुई, और इसी सभा में जीवन की उत्पत्ति क्षेत्र में कार्य करने वाले दो महान दिग्गजों, प्रो० ओपेरिन और प्रो० हाल्डेन, की सर्वप्रथम भेंट हुई। प्रो० जे० बी० एस० हाल्डेन इस सभा में भाग लेने के लिये भारत से गये थे। सभा से लौटने पर प्रो० हाल्डेन ने बहादुर को दिनांक 9 अप्रेल 1964 को एक पत्र नं० 64/0019 लिखा :—

"मैं नवम्बर मास के महीने में तालाहासी गया था। मुझे दुख था कि आप वहाँ पर नहीं थे, क्योंकि आपके जीवाणु उनके माइक्रोस्फियर की अपेक्षा कुछ दृष्टियों से जीवन के अधिक निकट हैं"

निर्देश

1. लोएव, डब्लू०। **बर० केम० गेस०,** 1913, **46,** 690.

2. बहादुर, के०। **नेचर,** 1954, **173,** 1141.

3. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **प्रोसी० नेश० एकैड० साइं० इंडिया,** 1954, **23A,** 21-23.

4. वही । **काम्प० रेण्ड० पेरिस,** 1955, **240,** 246-8.

5. वही । **यू० एस० एस० आर० एकैड० सांइ०,** 1957, **6,** 754-55.

6. बहादुर के० । "Origin of life on the earth" **पर मास्को में** 1957, **में हुई अन्तर्राष्ट्रीय गोष्ठी की रिपोर्ट, पर्गमान प्रेस, इंग्लिश संस्करण,** 1959, **पृष्ट** 91-96.

7. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **प्रोसी० नेश० एकैड० सांइ० इंडिया,** 1957, **26A,** 154,162.

8. बहादुर, के० रंगनायकी, एस० तथा सान्तामेरिया, एल० । **नेचर,** 1958, **182,** 1668.

9. बहादुर, के०, तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । **जुर्न० आब्साईकुम्,** 1961, XXXI(XCIII), 317-320.

१०. बहादुर, के०, तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **जर्न० इण्ड० रिसर्च, इण्डिया,** 1962, **21B,** 335-337.

11. बहादुर, के० तथा श्रीवास्तव, आर०बी० **विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका,** 1962, **5,** 57-59.

12. वही । **जर्न एकैड० साइं, यू० एस० एस० आर०,** 1962, **9,** 1608.

13. वही । **इस्व, ए० न०, य० एस० एस० आर०आट्ड खिम०,** 1963, **6,** 1070.

14. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **जर्न०जेन० केमि०, यू० एस० एस० आर०,** 1963, **33.**

15. बहादुर, के० तथा अग्रवाल, के० एम० एल० । **जर्न० आर्ग० केमि०, यू० एस० एस० आर०,**1963 **6,** III, 248.

16. वही । **विज्ञान परिषद् अनु० पत्रिका,** 1964, **7,** 2,51.

17. हल, डी० ई० । **नेचर,** 1960, **186,** 693.

18. बहादुर, के० तथा रंगनायकी, एस० । **इजवेस्तिया एकैडमी नाउक, यू०एस०एस०आर०,** 1958, II, 1361.

19. वही । **प्रोसी० नेश० एकैड० सांइ० इंडिया,** 1958, **27A,** 292.

20. वही । **विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका,** 1958, **1,** 99.

21. बहादुर के० तथा श्रीवास्तव, आर० बी० । **इण्डि० जर्न० ऐप्ल० केमि०,** 1960, **23,** 131.

22. पर्ती, ओ० एन० बहादुर, के० तथा पाठक, एच० डी० । **प्रोसी० नेश० एकैं० सांइ० इंडिया,** 1961, **30A,** 206.

23. पर्ती, ओ० एन०, बहादुर, के०, तथा पाठक, एच० डी० । **इण्डि० जर्न० ऐप्ल० केमि०,** 1961, **25,** 90.

24. वही । **बायोकेमिस्ट्री जर्न०, यू०एस०एस०आर०,बीडी० I4, टी०,** 1962, **27,** 708.

25. बहादुर, के० तथा पांडे, आर० एस० । **जर्न० इण्डि० केमि० सोसा०,** 1965, **42,** 75.

26. वही । **विज्ञान परिषद् अनु० पत्रिका,** 1964, **7,** 57.

27. बहादुर, के० एवं अन्य सहयोगी । **वही,** 1963, **6,** 63.

28. बहादुर, के० और रंगनायकी, एस० । **जब्ल० बैक्ट०,** 1964, **117,** II, 567.

29. बहादुर, के० । **वही,** 1964, **117, II,** 575.

30. वही । **वही,** 1964, 117, II, 585.

31. पर्ती, ओ० एन० । **आगरा यूनि० जर्न० रिसर्च,** 1963, **12,** II, 1.

32. बहादुर, के० । **जब्ल० बैक्ट०,** 1964, 118,II, 671.

33. पर्ती, ओ० एन० एवं अन्य सहयोगी । **आगरा यूनि० रिसर्च जर्न०,** 1964, **13,** II, 1.

34. बहादुर, के० । "Synthesis of Jeewanu, the Protocell", रामनारायन लाल बेनी प्रसाद, पब्लिशर्स, इलाहाबाद, 1965.

35. ब्रिग्स, एम० एच० । "Experiments on the origin of cells" Space Flight, 1965, **7**, (4), 129-131.

36. वही । The formation of cell like structures by the action of light on a possible primitive earth hydrosphere", प्रकाश जीव विज्ञान की चतुर्थ अन्तर्राष्ट्रीय गोष्ठी में प्रस्तुत । सारांश गोष्ठी की रिपोर्ट में प्रकाशित, "Recent Progress in Photobiology" जुलाई, 1964, पृष्ठ 360.

37. ओपेरिन, ए० आई० । "Origin of life on the earth", एकैडेमिक प्रेस, 1957.

38. फाक्स, एस० डब्लू । "The Origin of prebiological systems", एकैडेमिक प्रेस, 1964.

39. बहादुर, के० तथा सक्सेना, इ० । विज्ञान परिषद अनु० पत्रिका, 1963, **6**, 161.

40. ल्वाफ, ए० । L' evolution physiologique, el les des pertes des fonctions chez les microorganisms, Paris, 1943.

टेकनिकल प्रेस प्रा० लि०, प्रयाग

Journal and Proceedings, Royal Society of New South Wales, Vol. 101, pp. 11-15, 1967

Abiogenesis Leading to Biopoesis

KRISHNA BAHADUR and INDRA SAXENA
Chemistry Department, University of Allahabad, Allahabad

Introduction

As protein is the basic building material of all the living system of our earth, the abiogenesis of protein is one of the most important aspects of biopoesis. However protein formation starts with the search for the process under which the amino acids are formed abiogenically. Several processes have been discovered which form amino acids under abiogenic conditions. The formation of amino acids was observed for the first time by Loeb in 1913[1] who reported the formation of amino acids as glycine and alanine by passing silent electric discharge in a mixture of formaldehyde, ammonia and water. Amino acids have been synthesised by passing electric discharge in a mixture of gases by Miller[2]. The photochemical formation of natural amino acids was observed by Bahadur[3, 4, 5], in sterilised aqueous mixtures containing organic substances and inorganic catalysts. Hasselstrom exposed aqueous solution of ammonium acetate and observed the formation glycine and aspartic acid[6]. The synthesis of amino acids and other compounds of biological interest have been done using isocyanates[7], energy from ultra violet rays[8] to x-rays radiations[9] and other sources of energies have also been used for this abiogenesis.

The next important step in abiogenesis was the formation of peptide linkage. Fox[10] synthesised peptides by heating the mixtures of amino acids to 180°C for a few hours. Akabori[11] synthesised peptide by exposing aqueous mixture of amino acids to ultra-violet light. Terenin[12] suggested the possibility of effecting the reactions needing quanta of large amount of energy by radiations of shorter quanta of energy if the substrate molecules are absorbed on solid substances. Bernal[13] reported the formation of peptides by the radiations available on the earth in the mud. Bahadur and Ranganayaki in 1958 observed the formation of peptides in aqueous mixture of amino acids containing colloids of iron and molybdenum oxides as catalysts on irradiation with sunlight or artificial light from an electric bulb[14]. Perti and Pathak[15] observed the formation of peptides in aqueous mixtures using visible light and ultra-violet light in presence of inorganic catalysts. Briggs confirmed the observation of photochemical formation of peptides[16]. The synthesis of peptides in aqueous mixtures using hydrogen cyanide as the dehydrating agent has been observed by Lowe[17].

The photochemical formation of peptides in aqueous mixtures is interesting and becomes important because, put together with the observation of photochemical formation of amino acids, it is quite probable that amino acids were first formed in the oceans of the primitive earth and then these were subsequently utilized for the formation of peptides in almost the same environment or on prolonged exposure. These photochemically formed peptides have been examined for enzymic activity. The results show enzymic function as phosphatase activity.

Bahadur[18] suggested that the formation of amino acids and peptides took place in aqueous environment in the prebiological era and solar radiation and visible light played an important role in the syntheses. Then on further molecular evolution proteins were formed. This theory regarding the origin of life on the earth has been developed recently[19, 20].

In the present communication an attempt has been made to study the formation of amino acids, peptides, organic acids, sugars and enzyme activity in sterilised aqueous mixture containing glycine, methionine, aspartic acid cystein and anthracene as catalysts by exposing these mixtures to artificial light.

Experimental

A set of two mixtures in sigcol flat bottom flask of 250 ml. capacity was prepared in glass distilled water. The contents of the mixtures were as follows :

Glycine ..	..0·05 gm.
Aspartic acid	..0·05 gm.
Methionine	..0·05 gm.
Cystein HCl	..0·05 gm.

and Anthracene 0·02 gm. as catalyst in 100 ml. of water.

TABLE 1

Mixture of Uncovered Flask (Light)

S.No.	Rf Values in Phenol : Water 80 : 20	Rf Values in Butanol : Acetic acid : Water 120 : 30 : 50	Identification	Remark
Microstructures :				
Hydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·15	0·28	Aspartic acid	Pinkish purple
	0·32	0·26	Serine	Purple
	0·52	0·27	Arginine	Purple
	0·58	0·34	Alanine	Purple
Unhydrolysed	0·51	0·27	Arginine	Purple
	0·61	0·81	Peptide	Purple
	0·31	0·71	Peptide	Purple faint
	0·28	0·69	Peptide	Purple faint
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·75	0·58	Peptide	Purple
	0·52	0·59	Peptide	Purple
Hydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·15	0·28	Aspartic acid	Purple (pinkish)
	0·30	0·35	Glutamic acid	Purple
	0·52	0·27	Arginine	Purple
	0·41	0·31	Glycine	Purple
	0·81	0·70	Methionine	Purple
	0·61	0·52	?	Purple

The flasks containing above mixtures were cotton plugged with surgical cotton, and sterilised at 15 lbs. pressure for 30 minutes in an autoclave. The mouth of the flasks was sealed with cello-adhesive tape after wrapping with polythene paper. One of the two fllasks was covered with thick black cloth and the other remained as such. The covered and uncovered flask was kept for exposure to artificial light under 1000 watt electric bulb. The temperature during the period of exposure varied from 18° to 30°C. After 560 hours of irradiation to artificial light, the mixtures of covered and uncovered flask were examined under the oil immersion microscope (D. R. P. Leitz wetzlar microscope) using aseptic conditions and no bacterial growth was observed. The sterility of the exposed mixtures was also checked by the culture-count method. Few drops of the exposed mixtures to be tested were introduced over the agar nutrient in the petridishes under aseptic conditions and kept at 35° in the incubator for three to four days. The mixtures did not show any bacterial growth during the exposure. These mixtures were analysed for their microstructures and environmental medium after separating them by the help of ultra centrifuge, each was analysed for hydrolysed and non-hydrolysed nitrogenous constituents by two way paper chromatographic technique, employing phenol-water (80 : 20) and butanol—acetic acid-water (120 : 30 : 50) as two running solvents. Hydrolysis was done with 10N—HCl in sealed, hard neutral glass ampules, kept in boiling water for 24 hours. The hydrolysed samples were dried and neutralised simultaneously in vacuum desiccator in presence of fused NaOH. Whatmann No. 1 chromatographic papers were used. Spots of amino acids and peptides were developed by spraying 0·2% ninhydrin solution in acetone over the dried chromatograms, spots of organic acids by 1% bromophenol blue. Spots of sugars were developed by ammoniacal silver nitrate. The Rf values change due to many factors such as change of solvent and also due to the degree of hydration of the same solvent.

TABLE 2

Mixture of Uncovered Flask (Dark)

S.No.	Rf Values in Phenol : Water 80 : 20	Rf Values in Butanol : Acetic acid : Water 120 : 30 : 50	Identification With 0·2% ninhydrin in acetone	Remark
Microstructures :				
Unhydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·18	0·21	Peptide	Purple
	0·43	0·35	Peptide	Purple
Hydrolysed	0·15	0·28	Aspartic acid	Pinkish purple
	0·81	0·70	Methionine	Purple
	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·41	0·31	Glycine	Purple
	0·51	0·27	Arginine	Purple
	0·56	0·73	?	Purple
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·15	0·28	Aspartic acid	Pinkish purple
	0·31	0·39	Aleptide	Purple
Hydrolysed	0·16	0·14	Cystein	Yellow
	0·15	0·28	Aspartic acid	Pinkish purple
	0·81	0·69	Methionine	Purple
	0·41	0·31	Alycine	Purple
	0·51	0·27	Arginine	Purple

Therefore the Rf values of known, amino acids, organic acids and sugars were occasionally determined and the Rf values of unknown amino acids, acids and sugars were compared with those of known ones. The two running solvents were used in all the experiments for identification. This was accompanied by two dimensional chromatography.

TABLE 3
Mixture of Uncovered Flask (Light)

S.No.	Rf Values in: Phenol : Water 80 : 20	Rf Values in: Butanol : Acetic acid : H_2O 120 : 30 : 50	Identification with 0·2% Bromophenol Blue	Remark
Microstructures :				
Unhydrolysed	No spot	No spot	—	—
Hydrolysed	0·51	0·42	?	Yellowish
	0·32	0·21	Benzoic acid	Yellowish
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·32	0·21	Benzoic acid	Yellow
	0·51	0·42	?	Yellow
	0·24	0·21	?	Yellow
Hydrolysed	0·78	0·62	Myristic acid	Yellow
	0·36	0·83	Oxalic acid	Yellow
	0·24	0·24	?	Yellow

Estimation of phosphatase activity :

The phosphatase activity was estimated colorimetrically employing the Klett Summerson photo-electric colorimeter for the measurement of intensity of colour produced using suitable filter. The analysis is based upon the measurement of the quantity of light absorbed by a coloured solution. The dilution of the solution was adjusted so as to hold Beer's Law, i.e. the scale reading was directly proportional to the concentration of phosphate ions in the mixture. To avoid the frequent change in potential of the current supply the voltage stabiliser was used.

The results of the chromatographic analysis of each flask are recorded in tables 1 to 7.

One more identical mixture, as described in the experimental portion of this paper, was prepared. It was sterilised, cooled, covered with four folds of thick black cloth and stored in a lead chamber the walls of which were made

TABLE 4
Mixture of Covered Flask (Dark)

S.No.	Rf Values in: Phenol : Water 80 : 20	Rf Values in: Butanol : Acetic acid : H_2O 120 : 30 : 50	Identification with 0·2% Bromophenol Blue	Remark
Microstructures :				
Unhydrolysed	No spot	No spot	—	—
Hydrolysed	0·32	0·21	Benzoic acid	Yellow
	0·38	0·35	?	Yellow
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·32	0·21	Benzoic acid	Yellow
	0·14	0·40	?	Yellow
Hydrolysed	0·36	0·83	Oxalic acid	Yellow
	0·78	0·62	Myristic acid	Yellow

of 2·54 cm. thick sheets of solid lead. This mixture was analysed at the end of the experiment and was found to contain only the added amino acids. No other spot of amino acids, peptide, sugar or organic acid was detected in this mixture. There was no appearance of any microstructures in this mixture and the mixture had no phosphatase activity. Thus this control remained unchanged during the period of experiment.

TABLE 5
Mixture of Uncovered Flask (Light)

S.No.	Rf Values in: Phenol : H_2O	Rf Values in: Butanol : Acetic acid : H_2O	Identification with Ammoniacal Silver Nitrate	Remark
Microstructures :				
Unhydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·24	0·52	?	White
	0·56	0·22	Sucrose	White
Hydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·52	0·28	Glucose	White
	0·26	0·50	?	White
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·26	0·52	?	White
Hydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·52	0·28	Glucose	White
	0·36	0·56	?	White

Discussion

The chromatographic analysis of irradiated aqueous mixtures containing glycine, aspartic acid, methionine, and cystein and anthracene as catalyst indicated the presence of original amino acids added in the mixture together with a few peptide spots. This mixture on hydrolysis showed the presence of all the original amino acids and also gave newer spots which were identified as, arginine, alanine, and seriene. Similar mixture kept in dark showed the presence of all the originally added amino acids together with a few peptide spots. The mixture on hydrolysis gave the spots of the added amino acids and also of arginine, alanine and seriene as in exposed mixture. In general it has been observed that there were a few spots in unhydrolysed samples, but the same sample on hydrolysis indicated several spots which revealed the constituent amino acid of those peptides which did not appear over the chromatogram of the unhydrolysed sample. The complete identical mixtures kept in dark furnished peptide spots but these were lesser in number than those of the exposed mixture. It has been observed by Bahadur and co-worker[19] in their studies of the photochemical formation of amino acids and peptides that the control identical mixtures kept in dark also show some amino acids and peptide synthesis. They further observed that similar mixtures kept in lead chamber remained unchanged. The fact is that radiations which penetrated through the thick black cloth and reached the mixture kept in dark were also effective in the synthesis of some of these products. In the above lead chamber which had one inch thick wall of solid lead, all the radiations including cosmic radiations were cut off and no change in the mixture was effected. Microstructures were observed in the mixtures after exposure. Similar micro structures but lesser in number were also observed in the identical mixture kept in dark.

TABLE 6

Mixture of Covered Flask (Dark)

S.No.	Rf Values in		Identification	Remark
	Phenol : H_2O	Butanol : Acetic acid : H_2O	With Ammoniacal Silver Nitrate	
Microstructures :				
Unhydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·56	0·22	Sucrose	White
Hydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·52	0·28	Glucose	White
	0·36	0·56	?	White
Environmental Medium :				
Unhydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·32	0·48	?	White
Hydrolysed	0·53	0·31	Mannose	White
	0·36	0·56	?	White

It is interesting to note that the microstructures of the mixtures exposed to light and kept in dark did not show the presence of any organic acid. The micro structures on hydrolysis showed the presence of myristic acid, oxalic acid and benzoic acid. The environmental media of these mixtures also showed the presence of these organic acids after hydrolysis. A few spots of some organic acids were recorded but these could not be identified in both the cases.

The micro structures formed in the exposed and unexposed mixtures showed the presence of sugars as mannose and sucrose. These on hydrolysis gave some more spots of sugars

TABLE 7

Phosphatase Activity in the Mixture Examined by Klett Summerson Photoelectric Colorimeter

S.No.	Boiled				Unboiled			
	0 min.	20 min.	40 min.	80 min.	0 min.	20 min.	40 min.	80 min.
Spontaneous (Control)	12	13	15	15	15	14	13	13
Uncovered (Light)	14	16	20	20	9	12	16	16
Covered (Dark)	30	32	35	35	16	15	15	15

along with those present in unhydrolysed ones. A similar observation was made in the environmental medium of the exposed and unexposed mixtures. More of the sugar was formed in the environmental medium in comparison with that of micro structures synthesised in the exposed mixture. However a larger quantity of sugar was present in the microstructures than in the environmental medium of unexposed mixtures.

The exposed and unexposed mixtures were examined for enzymic activity and more of the phosphatase activity was observed in the unexposed mixtures. This phosphatase activity was found to be destroyed on boiling the exposed and unexposed mixtures at 100°C for five minutes.

The greater enzymic activity in the mixtures kept in dark may be due to the stability of the peptides synthesised in these mixtures because of the mild source of energy affecting these mixtures and there is less of the thermodynamical possibility of the decomposition of these peptides in the mixture than in the similar exposed mixtures.

Summary

The mixtures containing amino acids as, glycine methionine, aspartic acid and cystein hydrochloride and anthracene as catalyst, on exposure to artificial light indicated the presence of some new amino acids other than originally added, organic acids, sugars and enzymic activity. The similar mixture kept in dark also indicated the presence of new amino acids, organic acids and sugars, but lesser in number as compared with exposed (light) mixtures. However enzymic activity was more pronounced in dark (unexposed) mixture than in light one, and in a lead chamber only the added amino acids were present.

References

[1] Loeb, W., 1913. *Ber. dtsch. Chem. Ges.*, **46**, 690.
[2] Miller, S., 1953. *Science*, **117**, 528.
[3] Bahadur, K., 1954. *Nature*, **173**, 1141.
[4] Bahadur, K., and Ranganayaki, S., 1954. *Proc. Natl. Acad. Sci., India*, **23A**, 21–23.
[5] Bahadur, K., and Ranganayaki, S., 1955. *Compt. rend.*, **240**, 246.
[6] Hasselstrom, T., Henry, M. C., and Murr, B., 1957. *Science*, **125**, 350.
[7] Oro, J., 1963. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **108**, 464, 1961, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 217–227, 1962, *ibid.* **96**, 293–313.
[8] Groth, W., and Weyssentroff, H. V., 1957. *Nature wissenschaften*, 510.
[9] Dose, K., and Bajessky, N., 1957. *Biochem. et. Biophys. Acta*, **25**, 225.
[10] Fox, S. W., Harada, K., and Vegossky, A., 1959. *Experimentia*, **15**, 81.
[11] Akabori, S., 1959. Proc., First Intern Symposium, "The origin of life on the Earth", Moscow 1957, Pergamon Press ed., 169–195.
[12] Terenin, A. N., 1955. Microchem. Acta, **H 2-3**, 467, 1955. Symposium. Problem of Kinetics and catalysis, XIII, Ed. Acad. Sci., U.S.S.R., 27–30.
[13] Bernal, J. D., 1961. *Oceanography Am. Association of Advancement of Sci.*, 95–118.
[14] Bahadur, K., and Ranganayaki, S., 1958. *Izyestiya A Kademunauk, U.S.S.R.*, **11**, 1361–1369, 1958, *Proc. Natl. Acad. Sci. India*, **27A**, 6, 292–295, Bahadur, K., and Srivastava, R. B., 1960. *Indian J. Appl. Chem.*, **23** (3), 131–134, Bahadur, K., and Pande, R. S., 1965. *J. Indian Chem. Soc.*, **42** (2), 75–85.
[15] Perti, O. N., Bahadur, K., and Pathak, H. D., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci. India*, **30A**, 206–220, 1961. *Indian J. Appl. Chem.*, **25**, 90–96, 1962. *Biochem. J. U.S.S.R., Bbl.* 4, *T.* **27**, 708–714.
[16] Briggs, M. H., 1965. Space Flight, **7**, (4), 129–131.
[17] Lowe, C. V., Rees, M. W., and Markham, R., 1963. *Nature*, 199–222.
[18] Bahadur, K., 1957. Report, International Symposium on "Origin of life on the Earth". Moscow, 86–96.
[19] Bahadur, K., and Saxena, I., 1963. Vijanana Parishad Anusandhan Patrika, **6**, 161–168.
[20] Agrawal, K. M. L., 1963. D.Phil. Thesis, "Photochemical and Biochemical Fixation of Nitrogen", University of Allahabad.

AUSTRALASIAN MEDICAL PUBLISHING CO. LTD.
SEAMER & ARUNDEL STS., GLEBE, SYDNEY, 2037

Reprinted from MICROCHEMICAL JOURNAL, Volume 14, Number 4, December 1969
Copyright © 1969 by Academic Press Inc. *Printed in U.S.A.*

MICROCHEMICAL JOURNAL **14,** 547–549 (1969)

Microdetermination of L-Arginine Separately and in the Presence of Other Amino Acids

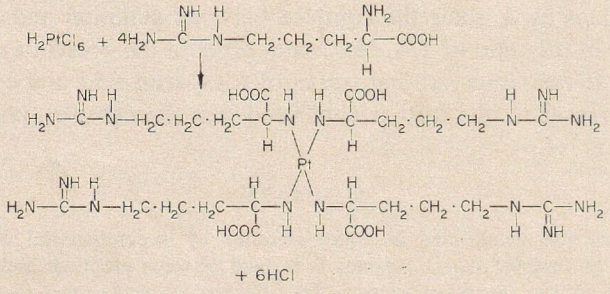
KRISHNA BAHADUR AND M. L. VERMA

Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad-2, India

Received May 5, 1969

Literature concerning the determination of L-arginine is not sufficient from the point of view of direct method. However, the methods, by which it is commonly determined, are Macpherson's method *(1)*; by oxidation with ceric sulfate *(2, 7)*; by boiling with sodium hydroxide, this is a direct method *(3)*; by ion exchange paper chromatography *(4)*; spectrophotometrically by Sakaguchi's reaction *(5)*.

The present method deals with the determination of L-arginine in micro amount by direct titration separately and in the presence of other amino acids. Potentiometric data and results of analysis show that the reaction between platinic chloride and L-arginine takes place in the ratio of 1:4. Probably the following reaction takes place:



EXPERIMENTAL METHODS

Reagents used. L-Arginine (E. Merck grade); platinic chloride (Palmston's Indian grade); xylenol orange (S.D.H., grade).

Apparatus. Semimicro pipette and burette were used with minimum division for measuring up to 0.01-ml volume.

Standard solution L-arginine was prepared by dissolving the exactly weighed amount in distilled water. Platinic chloride solution was standardized *(6)* by adding excess ferrocyanide and then titrating the remaining ferrocyanide against a standard ceric sulfate (in $4NH_2SO_4$) solution using *N*-phenylanthranilic acid as indicator.

PROCEDURE

A known volume of a known standard solution of L-arginine was placed in a beaker through a micro pipette and 30 ml of distilled water were added. A few drops (2–3) of xylenol orange solution was added and the solution in the beaker became a light brown color. Then, a standard solution of platinic chloride was added from a micro burette until a sharp change in color is observed at the end point from light brown to pink.

Determination of L-arginine was also done separately with glycine, DL-alanine, DL-valine, L-leucine, serine, cystine, and histidine. Further, L-arginine was determined in micro amounts when glycine, DL-alanine, DL-valine, L-leucine, and serine were present together in a mixture. Since the results are same, no separate table is given.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Results are given in Table 1. L-Arginine was estimated in a range of 6.89×10^{-4} to 17.24×10^{-4} mg/liter.

Table 1 shows that L-arginine was estimated in micro amounts by titrating directly against a standard solution of platinic chloride in the presence of glycine, DL-alanine, DL-valine, L-leucine, serine, cystine, and histidine separately, and in the presence of all (excepting cystine and histidine) at due time. Calculations were done by multiplying the observed values by 4, since the complex between platinum and L-arginine is formed in the ratio of 1:4. Maximum error in the present experiments was 1%. It was observed that traces of L-aspartic acid and cysteine interfere. Present results further confirmed that the complex is formed in the ratio of 1:4.

SUMMARY

L-Arginine was determined in micro amounts by direct titration with platinic chloride. It is observed that a complex is formed between platinum and L-arginine, in the ratio of 1:4; maximum error is 1%. Further, it is observed that a mixture

TABLE 1

MICRODETERMINATION OF L-ARGININE

L-Arginine, 0.02 *M* (ml)	H_2PtCl_6, 0.0055 *M* (ml)	L-Arginine ($\times 10^4$ mg/liter)		Error (%)
		Taken	Found	
0.2	0.18	6.96	6.89	1.00
0.3	0.27	10.45	10.34	1.05
0.4	0.36	13.93	13.89	0.28
0.5	0.45	17.42	17.24	1.03

of glycine, DL-alanine, DL-valine, L-leucine, and serine do not interfere but aspartic acid and cysteine do. It was estimated in a range of 6.89×10^{-4} to 17.24×10^{-4} mg/liter.

REFERENCES

1. James, J. W., Determination of arginine. *Nature* **177,** 529 (1956).
2. Kimoto, K., Industrial organic analysis with ceric sulphate. *Rept. Inst. Sci. Technol. Univ. Tokyo.* **3,** 20 (1952).
3. Plimmer, R. H. A. A. and Rosedale, J. L., VII. Direct estimation of arginine. *Biochem. J.* **19,** 1020 (1925).
4. Roberts, H. R. and Kolor, M. G., Rapid quantitative determination of arginine, histidine and lysine by ion exchange paper chromatography. *Anal. Chem.* **31,** 565 (1959).
5. Satake, K. and Luck, J. M., The spectrophotometric determination of arginine by the Sakaguchi reaction. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40,** 1743 (1958).
6. Saxena, O. C., New titrimetric method for palladium and platinium. *Talanta.* **13,** 862 (1966).
7. Takshashi, T., Kimoto, K., and Minami, S., Volumetric analysis of amino acids. *J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect.* **56,** 417 (1953).