

Sylwia Łabużek
Ilona Lipka
Agnieszka Mrozik

Katedra Biochemii
Uniwersytet Śląski
Katowice

Rozkład fenolu i cyjanku potasu przez bakterie rodzaju *Pseudomonas* – część 2

1. Wstęp

Niniejsze badania są kolejnym etapem obserwacji nad możliwością rozkładu fenolu i cyjanku przez wybrane szczepy rodzaju *Pseudomonas*. W poprzednich badaniach wykazano (1) zróżnicowane oddziaływanie układu dwuskładnikowego fenol–cyjanek na szczepy bakterii rodzaju *Pseudomonas*. Szczepy te izolowano z mieszanych populacji drobnoustrojów o odmiennych właściwościach biodegradacyjnych. Badania ujawniły, że różne szczepy należące do rodzaju *Pseudomonas* mogą wykazywać ograniczoną zdolność równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku, przy czym w dużym stopniu zależy to od właściwości szczepu i sposobu jego adaptacji (1).

Celem tej części badań było poszukiwanie szczepów bakteryjnych zdolnych do równoczesnego wykorzystania fenolu i cyjanku jako związków biogennych. Podjęto próbę wykazania, że ubytek fenolu i cyjanku z medium hodowlanego może odbywać się w wyniku procesu biodegradacyjnego. Fenol byłby źródłem węgla i energii, cyjanek zaś źródłem azotu. Rozdział białek enzymatycznych izolowanych z wybranego szczepu potwierdził obecność enzymów biorących udział w przemianach metabolicznych fenolu i cyjanku.

2. Metodyka

W badaniach zastosowano szczep *Pseudomonas sp.* FCR izolowany z mieszanej populacji drobnoustrojów przystosowanej do równoczesnej degradacji 6 mM (564 mg/l) fenolu i 6 mM (390 mg/l) cyjanku.

W badaniach degradacyjnych stosowano zmodyfikowaną pożywkę Kojima i in. (2). Modyfikacja polegała na zmniejszeniu ilości ekstraktu drożdżowego do 0,1 g/l. W niektórych badaniach dodatkowo w miejsce chlorku amonu wprowadzano chlorek sodu. Pożywkę wzbogacano wybranymi związkami, stanowiącymi źródło węgla i energii lub azotu (fenol, cyjanek potasu). Bakterie przechowywano na skosach agarowych lub w bulionie odżywczym zgodnie z recepturą DIFCO Laboratories.

Przebieg degradacji fenolu i cyjanku prowadzono metodami analitycznymi (3,4). Biomasa drobnoustrojów oznaczano metodą filtrów membranowych (5), zaś wzrost hodowli przez pomiar jej zmętnienia (6).

Indukcję szczepu *Pseudomonas sp.* FCR do degradacji fenolu i cyjanku prowadzono w warunkach napowietrzania hodowli periodycznych z codziennym zasilaniem substratami (6). Badania dynamiki rozkładu fenolu, cyjanku lub mieszaniny obu substratów oraz obserwacje wzrostu hodowli prowadzono metodami opisanymi przez Łabużek (6).

Izolację białek enzymatycznych prowadzono metodą Hegemana (7). Białka enzymatyczne frakcji 100 000 g z ultrawierwienia rozdzielono metodą chromatografii żelowej z użyciem Sephadexu G-150 w kolumnach o długości 30 cm i średnicy 1 cm. Kolumny upakowywano zgodnie z przepisem Pharmacia LKB Fine Chemicals. Na żel nanoszono 2,5 ml surowej frakcji enzy-

matycznej zagęszczonej przez 24-godziną dializę w 40% roztworze sacharozy. Po wejściu próby w żel przemywano kolumnę 0,05 M buforem fosforanowym o pH 7,5. Zbierano 1 ml frakcje, w których oznaczano stężenie białka metodą Bradforda (8).

3. Wyniki

3.1. Badanie zdolności izolowanych szczepów bakteryjnych do rozkładu fenolu i cyjanku

W celu znalezienia szczepów zdolnych do równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku izolowano je z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego zaadaptowanego do rozkładu 6 mM fenolu i 6 mM cyjanku metodą opisaną przez Pawlikowską (16). W wyniku izolacji wybrano kilka czystych kultur bakterii, które namnażano na skosach z agarom odżywczym, a następnie splukiwano do płynnej zmodyfikowanej pożywki Kojima i in. (2) z ekstraktem drożdżowym w stężeniu 0,1 g/l. Do hodowli dodawano sterylne fenol, zwiększając progresywnie jego dawki w odstępach 24-godzinnych. Pierwsza dawka fenolu wynosiła 0,5 mM. Po zaadaptowaniu szczepów do 4 mM fenolu w cyklu dobowym, rozpoczęto adaptację badanych szczepów do równoczesnej biodegradacji fenolu i cyjanku.

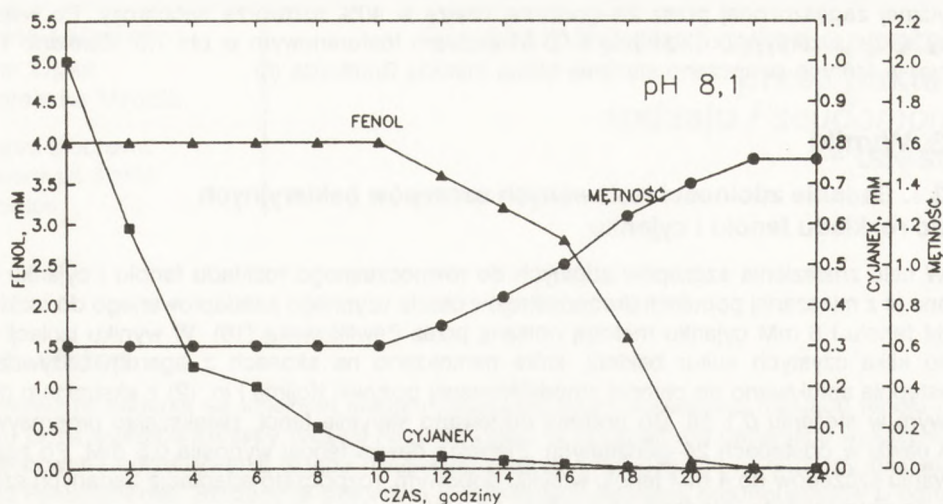
W tym celu przesiewano hodowle szczepów bakteryjnych do zmodyfikowanej pożywki Kojima i in. (2) z 0,1 g/l ekstraktu drożdżowego, w której chlorek amonu zastąpiono chlorkiem sodu, aby cyjanek stanowił jedyne źródło azotu. Do hodowli dodawano 4 mM fenolu oraz progresywnie wzrastające dawki cyjanku potasu. Pierwsza dawka cyjanku wynosiła 0,25 mM. Tylko jeden szczep, oznaczony symbolem FCR, wykazywał zdolność równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku. Szczep ten zaadaptowano do degradacji 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku w cyklu dobowym. Wyższe stężenia wprowadzanego cyjanku niż 1 mM powodowały hamowanie degradacji fenolu w cyklu hodowlanym.

Szczep FCR poddano identyfikacji. Jego charakterystykę przeprowadzono w oparciu o test API 20 NE oraz obserwację morfologiczną, biochemiczną i fizjologiczną (9,10,11). Porównano właściwości identyfikowanego szczepu FCR z właściwościami bakterii rodzaju *Pseudomonas* opisanymi w kluczu Bergeya (10). Na podstawie uzyskanych wyników poddany identyfikacji szczep FCR, rozkładający równocześnie fenol i cyjanek, oznaczono jako należący do rodzaju *Pseudomonas*.

Badano dynamikę rozkładu fenolu i cyjanku przez szczep *Pseudomonas sp.* FCR w celu stwierdzenia przebiegu rozkładu obu związków w cyklu dobowym. Pomiaru zmian mętności hodowli, stopnia rozkładu fenolu i cyjanku wykonywano co 2 godziny przez 24 godziny. Wyniki badań degradacyjnych przedstawiono na rys. 1.

Cyjanek wskutek hydrolizy w roztworach wodnych jest związkiem lotnym. W warunkach napowietrzania może ulegać desorpcji (wydmuchowi) z tych roztworów. Wraz ze wzrostem pH środowiska zmniejsza się ilość wydychywanego cyjanku. Jednak nawet przy podwyższonym pH długotrwałe napowietrzanie może spowodować częściowe usunięcie cyjanku na drodze fizykochemicznej. W procesach oczyszczania wód odpadowych należałoby tak prowadzić procesy biotechnologiczne, by powodować detoksykację lotnych substancji toksycznych (w naszym wypadku cyjanku), a nie ich przejście ze środowiska wodnego do atmosfery. Istotne wydawało się zatem określenie, w jakiej części ubywanie cyjanku z hodowli odbywało się w wyniku jego biologicznej detoksykacji, a w jakiej – na drodze eliminacji fizykochemicznej.

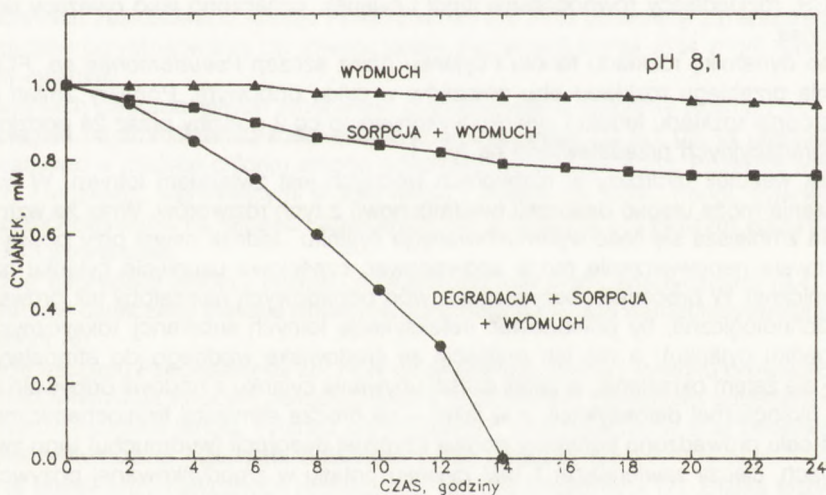
W tym celu prowadzono kontrolny pomiar fizycznej desorpcji (wydmuchu) tego związku po 24 godzinach, cieczy zawierającej 1 mM cyjanku potasu w zmodyfikowanej pożywce Kojima o pH 8,1. Obserwowano też sorpcję cyjanku na powierzchni komórek bakteryjnych hodowli *Pseudomonas sp.* FCR zabitych termicznie przez zagotowanie. Stwierdzono, że w tych warunkach wydmuch był nieznaczny i wynosił około 0,1 mM. Zabite komórki sorbowały około 0,25



Rys. 1. Dynamika równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku przez szczep *Pseudomonas sp.* FCR, pH pożywki 8,1.

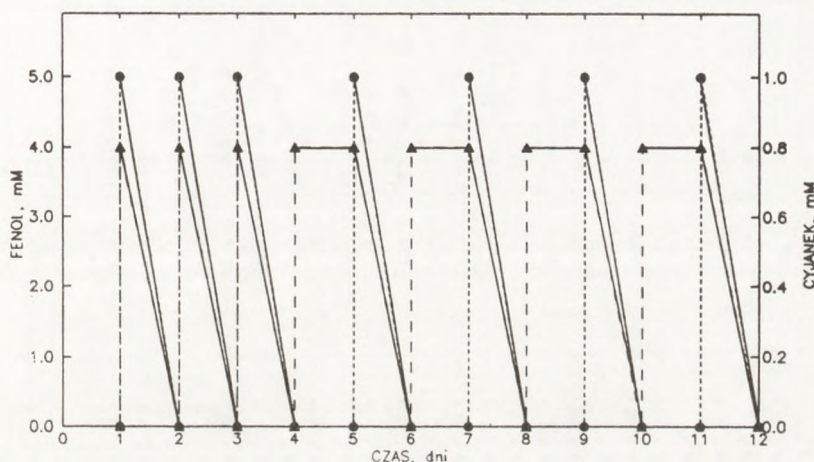
mM cyjanku. Wprowadzony cyjanek ulegał więc głównie biodegradacji. Wyniki tych obserwacji ilustruje rys. 2.

Z przeprowadzonych obserwacji wynikało, że fenol był wykorzystywany jako źródło węgla i energii, bowiem dopiero jego rozkład powodował wzrost szczepu *Pseudomonas sp.* FCR po wyraźnej lag-fazie. Można więc sądzić, że cyjanek wykorzystywany był przez badany szczep jako źródło azotu. Dla potwierdzenia tego przypuszczenia przeprowadzono następującą obser-



Rys. 2. Porównanie dynamiki ubytku cyjanku potasu z hodowli szczepu *Pseudomonas sp.* FCR przebiegającego na drodze biodegradacji, sorpcji powierzchniowej i desorpcji fizycznej (wydmuchu).

wację. Hodowano szczep FCR w zmodyfikowanej pożywce Kojima i in. (2) z chlorkiem sodu zamiast chlorku amonu, do której w odstępach dobowych dodawano 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku. Po 24 godzinach inkubacji oznaczano stężenie fenolu i cyjanku. Po stwierdzeniu całkowitej degradacji obu związków ponownie dodawano 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku. Czwartego dnia tych obserwacji do hodowli dodawano jedynie 4 mM fenolu. Stwierdzono, że po 24 godzinach napowietrzania przez wytrząsanie fenol nie został rozłożony, a jego stężenie w pożywce wynosiło 4 mM (dzień piąty). Tego dnia dodano do hodowli 1 mM cyjanku. Po 24 godzinach (dzień szósty) stężenie fenolu i cyjanku w hodowli było równe zero. Ponownie do hodowli dodano wyłącznie fenol i stwierdzono, że po 24 godzinach nie uległ degradacji. Po dodaniu do hodowli cyjanku następowała degradacja obu związków w cyklu dobowego wytrząsania. Takie postępowanie powtarzano kilkakrotnie. Stwierdzono, że w warunkach braku źródła azotu (cyjanku lub chlorku amonu) hamowaniu ulegała również degradacja fenolu. Wpływ azotu cyjankowego na degradację 4 mM fenolu przez szczep FCR w hodowli periodycznej, w której jedynym źródłem azotu był cyjanek potasu pokazano na rys. 3.



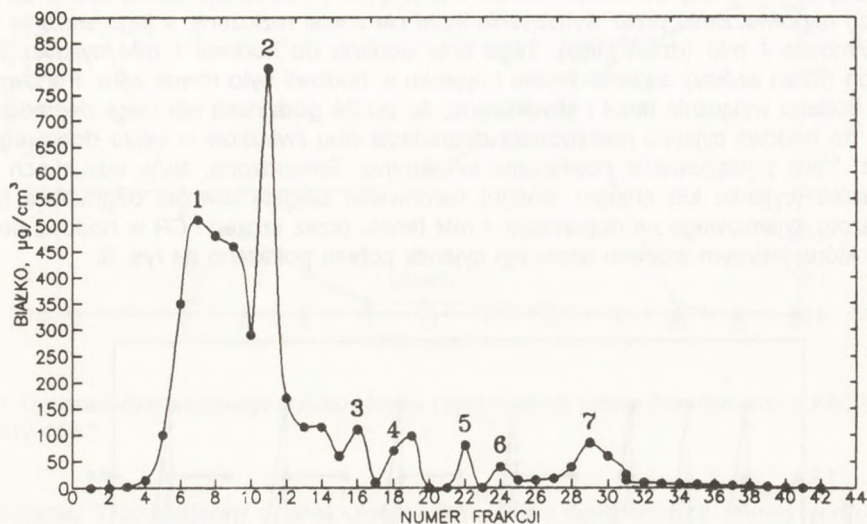
Rys. 3. Wpływ jonu cyjankowego na degradację fenolu w hodowli periodycznej szczepu *Pseudomonas sp.* FCR. Jedynym źródłem azotu był jon cyjankowy, pH pożywki 8.1. Fenol ▲; cyjanek ●.

3.2. Rozdział białek enzymatycznych izolowanych z komórek szczepu *Pseudomonas sp.* FCR

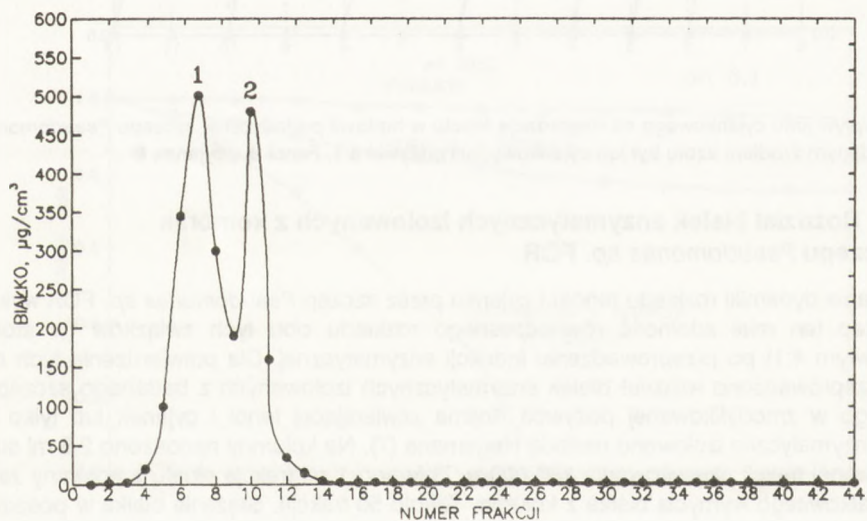
Badania dynamiki rozkładu fenolu i cyjanku przez szczep *Pseudomonas sp.* FCR wykazały, że szczep ten miał zdolność równoczesnego rozkładu obu tych związków (w stosunku stężeniowym 4:1) po przeprowadzeniu indukcji enzymatycznej. Dla potwierdzenia tych obserwacji przeprowadzono rozdział białek enzymatycznych izolowanych z badanego szczepu hodowanego w zmodyfikowanej pożywce Kojima zawierającej fenol i cyjanek lub tylko fenol. Białka enzymatyczne izolowano metodą Hegemana (7). Na kolumny nanoszono 2,5 ml surowej zdializowanej frakcji ultrawierowania 100 000 g. Zbierano 1 ml frakcje eluatu z kolumny żelowej, aż do całkowitego wymycia białka z kolumny (około 50 frakcji). Stężenie białka w poszczególnych frakcjach oznaczano metodą Bradforda (8).

W pierwszej serii badań rozdziałowi poddano białka enzymatyczne surowej frakcji 100 000 g izolowanej z komórek szczepu *Pseudomonas sp.* FCR hodowanego w obecności 4 mM fenolu

i 1 mM cyjanku. W wyniku rozdzielania w kolumnie Sephadex G-150 surowej frakcji enzymatycznej uzyskano 7 pików (frakcje 7,11,16,18,22,24 i 29). Wyniki tego rozdzielania pokazano przykładowo na rys. 4.



Rys. 4. Białka surowej frakcji enzymatycznej 100 000 g izolowane z komórek szczepu *Pseudomonas* sp. FCR hodowanego w obecności 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku, rozdzielane w żelu Sephadex G-150.



Rys. 5. Białka surowej frakcji enzymatycznej 100 000 g izolowane ze szczepu *Pseudomonas* sp. FCR hodowanego w obecności 4 mM fenolu rozdzielane w żelu Sephadex G-150.

W drugiej serii badań rozdzielano białka surowej frakcji enzymatycznej 100 000 g izolowanej z komórek szczepu *Pseudomonas sp.* FCR hodowanego jedynie w obecności 4 mM fenolu w pożywce Kojima i in. (2) z chlorkiem amonu jako źródłem azotu. W wyniku rozdzielu otrzymywano 2 piki (frakcja 7 i 11) na krzywej wymywania jak to przykładowo ilustruje rys. 5.

4. Dyskusja

Fenole i cyjanki występujące w przemysłowych wodach odpadowych są związkami uciążliwymi dla środowiska. W celu ich usunięcia z wód często stosuje się metody biotechnologiczne, najczęściej metodę osadu czynnego (6,12).

Bakterie rodzaju *Pseudomonas* wykazują zdolność wykorzystania fenoli jako źródła węgla i energii (13,14). Również cyjanek może być degradowany przez bakterie tego rodzaju (15,16). Cyjanek jest jednak niewystarczającym źródłem węgla dla wzrostu drobnoustrojów (16). Jego rozkład powinien być zatem prowadzony w obecności dodatkowego źródła węgla. Obserwowany rozkład fenolu i cyjanku potasu przez mieszane populacje (1,17) wskazywał na możliwość rozkładu fenolu i cyjanku. Wcześniejsze badania z wybranymi szczepami bakteryjnymi (1) wykazały ograniczoną zdolność równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku (1). Wraz z wydłużaniem się czasu hodowli wybranych szczepów rodzaju *Pseudomonas* w obecności mieszaniny fenol-cyjanek obserwowano zanikanie zdolności wykorzystania obu tych związków (1). Nasuwało się przypuszczenie, że mogło to być spowodowane dezaktywacją przez cyjanek dioksygenaz katecholowych, enzymów, zawierających żelazo w centrum aktywnym, biorących udział w degradacji fenolu (13,14).

Przeprowadzone obserwacje miały na celu wydzielenie z populacji mieszanej takiego szczepu bakterii, który wzrastałby z wykorzystaniem obu tych związków: fenolu jako źródła węgla i energii, cyjanku jako źródła azotu.

Szczepy bakterii uzyskiwano izolując je z mieszanych populacji drobnoustrojów adaptowanych w różny sposób do biodegradacji fenolu i cyjanku. Degradacja tych związków przebiega z udziałem enzymów indukowanych (6,14,16). W toku izolacji szczepy tracą nabytą zdolność degradowania fenolu i cyjanku w wyniku represji enzymatycznej. Postanowiono więc poddać uzyskiwane szczepy ponownej adaptacji do stopniowo wzrastających stężeń fenolu do 4 mM fenolu, a następnie cyjanku. Tylko jeden z izolowanych szczepów był zdolny do degradowania w sposób trwały 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku w cyklu dobowym. Wprowadzanie wyższych stężeń cyjanku do hodowli powodowało hamowanie degradacji fenolu. Mieszana populacja, z której szczep ten izolowano degradowała 6 mM fenolu i 6 mM cyjanku w cyklu dobowym. Może to wskazywać, że nie jest to prosta indukcja syntezy enzymów dwóch różnych szlaków metabolicznych. Prawdopodobnie cyjanek w jakiś sposób blokuje aktywność enzymów biorących udział w degradacji fenolu, skoro długotrwała adaptacja powoduje jedynie zwiększanie tolerancji na cyjanek. Szczep nieadaptowany do cyjanku już w stężeniu 0,1 mM CN^- powodował hamowanie degradacji fenolu (1).

Obserwacje dynamiki rozkładu fenolu i cyjanku wykazały, że w układzie dwuskładnikowym, zarówno fenol jak i cyjanek ulegały degradacji. Badany szczep *Pseudomonas sp.* FCR rozkładał najpierw cyjanek. W ciągu pierwszych 10 godzin hodowli napowietrzanej degradacji ulegało około 90% wprowadzonego cyjanku. Fenol w tym czasie nie był degradowany. Dopiero w 12 godzinie inkubacji rozpoczęła się degradacja fenolu. Jego rozkładowi towarzyszył wzrost bakterii (rys. 1), czego nie obserwowano w fazie rozkładu cyjanku. Przypuszczalnie cyjanek w stężeniu 1 mM hamował indukcję dioksygenaz katecholowych lub nietrwale wiązał się z enzymami odpowiedzialnymi za rozszczepienie struktury aromatycznej unieczynniając je. Dopiero, gdy cyjanek ulegał prawie całkowicie usunięciu ze środowiska hodowlanego, obserwowano uaktywnienie enzymów degradujących fenol. Biodegradacja fenolu i cyjanku przez szczep *Pseudomonas sp.* FCR przebiegała zatem w dwóch następujących po sobie fazach procesu.

Szczep *Pseudomonas* FCR zachowywał się odmiennie niż szczepy badane poprzednio (1). Szczep *Ps. putida* na przykład, tolerował znacznie niższe stężenia cyjanku, w obecności których fenol był degradowany. Proces równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku przebiegał od pierwszej godziny po wprowadzeniu obu związków do medium hodowlanego, ale czas rozkładu był dłuższy niż w hodowli kontrolnej z samym fenolem (1).

W celu potwierdzenia biodegradacyjnego charakteru rozkładu cyjanku, którego ubywanie stwierdzano w pierwszych 10 godzinach obserwacji, przeprowadzono kontrolny pomiar ubywania cyjanku w wyniku fizycznej desorpcji w roztworze o pH 8,1 (wydmuch) i sorpcji na powierzchni komórek bakterii. Stwierdzono, że z wprowadzonej porcji 1 mM cyjanku jedynie około 10% ulegało desorpcji fizycznej z roztworu. Sorpcji na powierzchni komórek zabitych w oddzielnych próbach modelowych ulegało około 25% (rys. 2).

Przeprowadzone obserwacje dynamiki rozkładu fenolu i cyjanku przez szczep *Pseudomonas* sp. FCR sugerowały, że przeważająca część cyjanku z porcji 1 mM dodawanej do hodowli ulegała degradacji. Ponieważ degradacja cyjanku odbywała się poza fazą wzrostu bakterii (rys. 1) sugerowało to, że cyjanek nie był wykorzystywany jako źródło węgla i energii. Był on źródłem azotu dla badanego szczepu, gdyż do hodowli nie wprowadzano innych związków azotowych. Dla potwierdzenia tego przypuszczenia prowadzono hodowlę badanego szczepu w obecności 4 mM fenolu z przemennym dozowaniem 1 mM cyjanku i bez cyjanku. Wykazano, że jeżeli w hodowli znajdował się zarówno cyjanek jak i fenol, to oba związki były degradowane w cyklu dobowym. Niedodanie do hodowli cyjanku powodowało zakłócenie degradacji fenolu (rys. 3). Ponowne uzupełnienie medium hodowlanego porcją cyjanku powodowało rozkład fenolu i cyjanku. Mogłoby to potwierdzać przypuszczenie, że cyjanek jest źródłem azotu dla badanego szczepu. W celu ostatecznego udowodnienia tych sugestii należałoby przeprowadzić badania ze znakowanym cyjankiem potasu.

Dla uwidocznienia, jak cyjanek wpływał na enzymy degradacyjne fenolu izolowano białka enzymatyczne szczepu *Pseudomonas* sp. FCR z hodowli, które w medium miały 4 mM fenolu lub mieszaninę: 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku. Wyizolowane białka poddano rozdzielaniu na Sephadexie G-150. W wyniku przeprowadzonego rozdzielania białek surowej frakcji enzymatycznej izolowanej ze szczepu rosnącego z wykorzystaniem fenolu uzyskano 2 piki białkowe (rys. 5). Z danych literaturowych wiadomo, że degradacja fenolu przebiega z udziałem kilku enzymów (13,14). Prawdopodobnie enzymy szlaku metabolicznego degradacji fenolu mają zbliżone masy cząsteczkowe, stąd uzyskiwano dwa piki na krzywej wymywania. Rozdział ten należy zatem traktować jako wstępny.

Filtracja żelowa frakcji enzymatycznej izolowanej z hodowli prowadzonej w mieszaninie dwuskładnikowej fenol-cyjanek, ujawniła pojawienie się nowych pików na krzywej wymywania (rys. 5). Porównanie tej krzywej wymywania z uzyskaną dla szczepu hodowanego jedynie w obecności fenolu (rys.4,5) przypuszczalnie wskazuje, że pierwsze dwa piki odpowiadają enzymom biorącym udział w degradacji fenolu, a pozostałe 5 frakcji – jak się wydaje – wiążą się z rozkładem cyjanku.

Rozdział białek enzymatycznych z hodowli dwuskładnikowych fenol – cyjanek potwierdził biodegradacyjny charakter ubywania cyjanku. Niewiele natomiast można jeszcze wnioskować o enzymach biorących udział w tym procesie. Białka związane z detoksykacją cyjanku mają prawdopodobnie mniejszą masę cząsteczkową od białek związanych z degradacją struktury aromatycznej, o czym świadczy późniejszy wypływ z kolumny żelowej. Dla dokładniejszego określenia właściwości uzyskanych frakcji białkowych należałoby przeprowadzić dalszy ich rozdział z zastosowaniem innych technik lub żeli filtracyjnych.

Praca finansowana częściowo ze środków Fundacji dla Uniwersytetu Śląskiego.

Literatura

1. Łabużek S., Pająk J., Pająk I., (1992), *Biotechnol.*, 1, 28–38.
2. Kojima Y., Itada N., Hayaishi O., (1961), *J. Biol. Chem.*, 193, 265–276.
3. Ľurie J., Rybnikova A. J., (1970), *Chimiczeskij analiz proizvodstwiennych stocznych wod*, Gozchimizdat, Moskwa.
4. Asmus E., Garshagen H., (1953), *Z. Anal. Chem.*, 138, 414–421.
5. Engelbrecht R. S., McKinney R. E., (1956), *Sew. Ind. Wastes*, 28, 32–38.
6. Łabużek S., (1988), – rozprawa habilitacyjna 938, Wyd. Uniwersytet Śl., Katowice.
7. Feist F., Hegeman G. D., (1969), *J. Bacteriol.*, 100, 869–876.
8. Bradford M., (1976), *Anal. Bioch.*, 72, 248–252.
9. Bieszkiewicz E., (1971), *Ćwiczenia z mikrobiologii*, PWN, Warszawa.
10. Breed E. S., Murrey E. G. O., Smith N. R., (1975), *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins Comp., Baltimore.
11. Burbianka M., (1971), *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa.
12. Richards D. J., Shieh W. K., (1989), *Biotechn. and Bioeng.*, 33, 32–38.
13. Dagley S., (1971), *Advan. Microbiol. Physiol.*, 6, 1–34.
14. Gibson D. T., (1971), *Rev. Microbiol.*, 1, 199–220.
15. Knowles C. J., Bunch A. W., (1986), 27, 73–82.
16. Pawlikowska Cz., (1985), *Enzymatyczny rozkład cyjanku przez szczep *Pseudomonas sp.** – rozprawa doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice.
17. Chmielowski J., Kłapcińska B., Łabużek S., (1975), *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 22, 327–342.

Degradation of phenol and cyanide by *Pseudomonas sp.* strain – Part 2

Summary

The strain of *Pseudomonas sp.* FCR was isolated from the mixed population of the activated sludge microorganisms. This strain after adaptation degraded 4 mM of phenol and 1 mM of cyanide in 24 hour cycles. The degradation of phenol and cyanide ran in two consecutive phases: first cyanide and then phenol were degraded. Isolation and fractionation of the crude fraction of enzymatic proteins proved the microbiological nature of cyanide and phenol degradation.

Adres dla korespondencji:

Sylwia Łabużek, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40–032 Katowice.