

F-2

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN - POLONIA

VOL. II. N. 2.

SECTIO E

10. I. 1918

(Z Zakładu Genetyki i Drobniarstwa Wydziału Rolnego U. M. C. S. w Lublinie oraz Działu Biologii Hodowlanej  
P. I. N. G. W. w Puławach.<sup>1)</sup>  
Mierownik: prof. dr. Laura Kaufman.



em 7619

Laura KAUFMAN

**Badania nad »starzeniem się« jaj II<sup>2)</sup>.**

**Spadek procentu wylęgu, a zawartość katalazy  
w przechowywanych jajach**

**»Aging« of eggs II.**

**Decrease of hatchability and catalase content in stored eggs.**

Zmianom, zachodzącym w przechowywanych jajach kurzych (morfologicznym, chemicznym i fizycznym) poświęcono dość dużo uwagi przede wszystkim ze względu na znaczenie ekonomiczne jaja jako produktu spożywczego i konieczność jego magazynowania w miesiącach jesienno-zimowych, oraz celem wywozu zagranicę. (Por. Grossfeld 4). Z drugiej strony, hodowcy drobiu wiedzą dobrze, że przechowywanie jaj przez okres dłuższy niż 10 dni obniża ich zdolność rozwojową. Podczas przechowywania zmienia się zatem nie tylko białko i żółtko, ale także żywy zarodek. Te zmiany, zaczynające się już we wczesnych okresach magazynowania, są szczególnie ważne dla hodowcy, gdyż w znacznej mierze utrudniają możliwość otrzymania większej liczby potomstwa od wartościowych sztuk w ciągu tego samego sezonu wylęgowego, jako też wylęgu jaj, sprowadzonych z dalekich stron. Wobec tego wykrycie związku między zmianami, zachodzącymi z jednej strony w żółtku i białku, a z drugiej — w zarodku, poznanie czynników, wpływających na zamieranie embrionów w »starych« jajach jest zagadnieniem ważnym nie tylko dla nauki, ale także dla praktyki hodowlanej. Mimo to autorka była pierwszą, która starała się znaleźć powody

<sup>1)</sup> Badania zostały wykonane przed wojną na materiale Działu Biologii Hodowlanej P. I. N. G. W. w Puławach, a doniesienie tymczasowe ukazało się w języku angielskim w Proceedings VII th World's Poultry Congress, Cleveland, Ohio, 1939.

<sup>2)</sup> I część ogłoszona w 1937 r. (Kaufman, 6).

D. M. 161052 2 405

zmniejszonej wylęgowości, badając rozwój i wzrost zarodków w przechowywanych jajach i niektóre czynniki, wpływające na ich śmiertelność (K a u f m a n 6). Znalaziono przy tym, że niema związku między zamieraniem zarodków a procentową ilością wody, wyparowanej z jaj podczas przechowywania. W tych badaniach stwierdzono ponadto, że w jajach przechowywanych przed włożeniem do wylęgarki przez 28 do 34 dni większość zarodków zamarła w pierwszym tygodniu wylęgania. Te, które przeżyły, były znacznie mniejsze niż zarodki tego samego wieku wylęgania, rozwijające się w świeżych jajach. Jednakże tempo wzrostu było wyższe u zarodków w magazynowanych jajach, co wskazywało na przesunięcie początku rozwoju. Okazało się rzeczywiście, że podczas gdy w świeżych jajach ciało embriona jest już założone i wzrost zaczyna się po 36 godzinach wylęgania w temp. 38.5°, to w jajach przechowywanych widać w tym okresie zaledwie smugę pierwotną, a wzrost ciała zaczyna się około 24 godziny później. Wynika stąd jasno, że zmiany zachodzące w jaju podczas przechowywania, pociągają za sobą zahamowanie podziałów komórkowych po włożeniu jaja do wylęgarki. Zahamowanie to może być odwracalne i wywoływać opóźnienie początku wzrostu lub osłabienie i śmierć zarodka w późniejszych okresach, albo nieodwracalne i pociągać za sobą zupełną niemożność dalszego rozwoju.

W dalszym ciągu tych badań należało wyświecić przyczynę opóźnionego rozwoju i wzmożonej śmiertelności zarodków, rozwijających się w jajach, które przed włożeniem do wylęgarki były przez dłuższy czas (około 30 dni) przechowywane.

J. L o e b i W a s t e n a y s (7), W a r b u r g (12) i in. wykazali, że bruzdkowaniu jaj towarzyszy wzmożona wymiana gazowa, a B i n e t i W e l l e r (1) i in. wskazali na rolę połączeń SH w tych procesach i wogóle w podziałach komórkowych. Wreszcie R a p k i n e (9) stwierdził, że krótkie zanurzenie zapłodnionych jaj jeżowca w słabym roztworze sublimatu zupełnie hamuje podziały komórkowe, lecz że dodatek cysteiny lub kwasu tioglikolowego przywraca zdolność podziałową. R a p k i n e dochodzi do wniosku, że zahamowanie podziałów komórkowych w jego doświadczeniach zostało wywołane blokadą połączeń SH przez toksyny.

Zauważone w poprzednich badaniach autorki odwracalne ew. nieodwracalne zahamowanie rozwoju embrionalnego może również być wynikiem toksycznego działania pewnej substancji nagromadzającej się w przechowywanych jajach. Jako taką substancję można było brać pod uwagę przede wszystkim wodę utlenioną, silną truciznę protoplazmatyczną, powstającą normalnie w żywych komórkach, lecz ulegającą, dzięki obecności katalazy, natychmiastowemu rozszczepieniu na wodę i tlen.

Znany jest ubytek katalazy w przechowywanych nasionach roślin, proporcjonalny do spadku ich siły kiełkowania (Schmidt 11, Gracani i in 3 i in). Według Dingemansa (2) w świeżych jajach zawartość katalazy jest średnio znacznie wyższa niż w jajach z chłodni. Natomiast Rogers i Winternitz (10) nie stwierdzili ubytku katalazy w jajach magazynowanych.

W obecnych badaniach chodziło o stwierdzenie zawartości katalazy w jajach przechowywanych, w związku z ich zmniejszoną zdolnością rozwojową, o zbadanie wpływu  $H_2O_2$  na rozwijające się jaja oraz możliwości przeciwdziałania skutkom magazynowania przez wprowadzanie do jaj substancji, odgrywających rolę w procesach oksydo-redukcji.

### Materiał i metody

Jaja zielononózek kuropatwianych, hodowanych w Dziale Biologii Hodowlanej P. I. N. G. W. w Puławach, stanowiące materiał badań, podzielono na trzy grupy: I jaja świeże (od kilku godzin do 5 dni po zniesieniu, 21 sztuk) II jaja 10 – 11 dniowe (11 sztuk) i III jaja 30 ew. 31 dniowe (16 sztuk). Jaja, stojące ostrym końcem w dół, przechowywano w pomieszczeniu o temperaturze około  $12^{\circ}C$ .

Zawartość katalazy oznaczono metodą eudiometryczną. Po 3 g. substancji (żółtka, ew. białka) wprowadzano do kolbki Erlenmeyera, dodając do białka  $15\text{ cm}^3$  wody destylowanej, a do żółtka, celem zubożenia, taką samą ilość 2% roztworu węglanu wapnia. Na dno kolbki wstawiano ostrożnie wywrotne naczynie z 3% wodą utlenioną, za każdym razem świeżo przygotowywaną z perhydrolu Mercka. Kolbkę wstawiano do naczynia z wodą utrzymywaną w temperaturze  $25^{\circ}C$ , łączono z eudiometrem i przewracano naczynie z wodą utlenioną. Reakcja trwała godzinę.

Wodę utlenioną, wodę destylowaną, ew. roztwory glutationu M/500 lub M/100 wprowadzano do białka zapomocą strzykawki, a otwór w skorupie zaklejano gipsem.

### Wyniki doświadczeń

Tabl. 1 zawiera liczby, odnoszące się do zawartości katalazy w żółtku i w białku jaj świeżych, 10 dniowych i 30 dniowych. Widzimy przede wszystkim, że zawartość katalazy w żółtku jest znikoma i raczej rośnie z wiekiem jaja (Różnice są nieistotne). Białko natomiast zawiera znaczne ilości enzymu. Ilość katalazy w białku waha się w szerokich granicach i charakteryzuje jaja od poszczególnych kur. Po 10 dniach przechowywania niema różnicy w ilości katalazy, lecz po dal-

Tab. 1

Zawartość katalazy w zależności od wieku jaja.  
 Ilość tlenu (w  $\text{cm}^3$ ) odszczepionego w temp.  $25^\circ$  przez 3 g substancji.  
 Catalase content of eggs according to age.  
 Cc of  $\text{O}_2$  split up at  $25^\circ$  C by 3 g of substance.

	Żółtko — Yolk of egg			Białko — White of egg		
	Świeże Fresh laid	po 10 dniach after 10 days	po 30 dniach after 30 days	Świeże fresh laid	po 10 dniach after 10 days	po 30 dniach after 30 days
Wartości średnie Average	0.25 + 0.04	0.29 + 0.03	0.40 + 0.08	7.60 + 1.66	7.10 + 3.04	2.00 + 0.66
Granice wahań Range of variability	0.0—0.8	0.1—0.7	0.1—1.0	0.7—29.9	0.8—28.9	0.1—9.2

szczych 20 dniach zawartość katalazy spada znacznie. Mimo bardzo dużej zmienności, różnica pomiędzy ilością tlenu, odszczepionego przez białko jaj świeżych i jaj 30 dniowych jest istotna. Porównywano też jaja od tej samej kury zaraz po zniesieniu i po 30 dniach i znaleziono z reguły duży spadek zawartości enzymu. Jednakże białko jaj niektórych kur jest tak bogate w katalazę, że nawet po 30 dniach zawiera jeszcze ilości przewyższające średnią zawartość tego enzymu w świeżych jajach. Jeżeli istnieje zależność pomiędzy brakiem katalazy a śmiertelnością zarodków w przechowywanych jajach, to można się było spodziewać, że jaja od kur, odznaczających się wysoką zawartością katalazy, będą bardziej odporne na szkodliwe działanie przechowywania niż jaja kur o niskiej zawartości katalazy. Porównywano zatem w obu grupach rozwój zarodków w jajach przechowywanych przez 30 dni, lecz nie zauważono różnic co do procentu śmiertelności. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że analiza chemiczna i rozwój musiały być oczywiście badane w różnych jajach i różnych porach roku i że wobec tego niewiadomo, jaka była rzeczywista zawartość katalazy w jajach wylęganych.

Wyniki tych badań wskazują na pewną równoległość pomiędzy ubytkiem katalazy a spadkiem wylęgowości. Mianowicie zdolność wylęgowa jaj 10 dniowych, podobnie jak i zawartość w nich katalazy nie różnią się istotnie od tych wartości w świeżych jajach, podczas gdy jaja przechowywane przez 30 dni, o zmniejszonej zdolności wylęgowej, zawierają też mniej katalazy. Dla przekonania się, czy pomiędzy obu szeregami zjawisk istnieje związek przyczynowy, a więc czy wytwarzana podczas przechowywania jaj i nie ulegająca rozkładowi woda utleniona jest czynnikiem, powodującym zahamowanie rozwoju i śmierć zarodków, wprowadzano do świeżych jaj po  $0.2 \text{ cm}^3$  wody utlenionej. Zrazu za-

strzykiwano roztwór 0.3‰, później 0.6‰, a gdy przekonano się, że nie mają szkodliwego wpływu na rozwój—roztwory 1.0, 3.0 a nawet 10.0‰ perhydrolu Mercka. Rozwój zarodka przebiegał zupełnie normalnie. Na powierzchni białka, w miejscu zastrzyku tworzyła się piana, świadcząc o silnym działaniu katalazy. Uwidoczniła się w tych doświadczeniach niezmiernie jasno ochronna rola białka, działającego jako tarcza, niedopuszczająca do rozwijającego się zarodka szkodliwych wpływów zewnętrznych. Nie można było natomiast rozstrzygnąć kwestii co do roli  $H_2O_2$  jako czynnika, powodującego opóźnienie początku rozwoju i wzmożoną śmiertelność zarodków w przechowywanych jajach.

Jeżeli obniżenie wylęgowości w przechowywanych jajach jest spowodowane działaniem na żywy zarodek pewnych toksycznych substancji, gromadzących się w jajach, to wprowadzenie do jaj czynników odtruwających mogłoby temu szkodliwemu wpływowi przeciwdziałać. Jako taką substancję można było w pierwszym rzędzie brać pod uwagę glutation którego działanie jako czynnika odtruwającego zostało stwierdzone, (H a r r o w, C h a m e l i n i M a z u r 5). Celem rozstrzygnięcia tego zagadnienia, przeprowadzono nową serię doświadczeń. Robiono mianowicie zastrzyki glutationu w dwu grupach jaj: I przechowywanych 10 do 14 dni i II — przechowywanych więcej niż 14 dni od chwili zniesienia. Do wylęgarki wkładano obie grupy jaj 30 dnia po ich zniesieniu, a rozwój zarodków badano po 3 dniach wylęgania. Jako kontrola służyły a) jaja przechowywane przez 30 dni bez zastrzyków i b) jaja przechowywane, do których wprowadzono ilości wody destylowanej, odpowiadające ilościom roztworu glutationu. Wyniki zebrane w tab. 2 wyraźnie wskazują na to, że glutation wprowadzony do przechowywanych jaj, zwłaszcza w drugim tygodniu, ma korzystny wpływ na zdolność rozwojową zarodków.

### Omówienie i streszczenie wyników.

Zagadnienie, które było tematem opisanych doświadczeń, zostało jedynie częściowo rozwiązane. Okazało się, że między zawartością katalazy w białku a zdolnością rozwojową przechowywanych jaj zachodzi pewien prosty stosunek. Mianowicie średnia zawartość katalazy i wylęgowość jaj świeżych i jaj dziesięciodniowych nie różnią się istotnie, a znaczny spadek zarówno zdolności rozwojowej jak też ilości katalazy zauważyć można po 30 dniach przechowywania. Pomędzy poszczególnymi kurami występują jednak duże różnice pod względem ilości katalazy w znoszonych przez nie jajach. Jaja od niektórych kur były tak bogate w katalazę, że nawet po 30 dniach przechowywania można w nich było stwierdzić większą zawartość tego enzymu niż średnia za-

Tab. 2

Wpływ zastrzyków glutationu na rozwój przechowywanych jaj.  
*Effect of glutathion injections on embryo development in stored eggs.*

Dane Item	Zastrzyki 10 – 14 dni po zniesieniu jaja <i>Injections made 10 to 14 days after deposition of egg</i>		Zastrzyki więcej niż po 14 dniach od zniesienia jaja <i>Injections made more than after 14 days after deposition of egg</i>		Bez zastrzyków <i>No injection</i>
	Substancja zastrzyku ana <i>Substance injected</i>	Glutation <i>Glutathione</i>	Woda dest. <i>Dist. water</i>	Glutation <i>Glutathione</i>	Woda dest. <i>Dist. water</i>
Śmiertelność zarodków po 3 dniach u yłęgania, w procentach <i>Percent mortality of embryos after 3 days of incuba- tion</i>	29.4	83.3	41.8	50.0	80.0

wartość w świeżych jajach. Ponieważ, podobnie jak Dingemans zauważyłam, że ilość katalazy w jajach jest cechą charakterystyczną dla poszczególnych kur, można się było spodziewać, że jaja po kurach, odznaczających się wysoką zawartością katalazy, będą szczególnie odporne na szkodliwe działanie przechowywania i wykazywać mniejszą śmiertelność zarodków podczas rozwoju w wylęgarni. Takiej zależności nie zauważono. Wobec tego pozostaje wątpliwe, czy spadek zawartości katalazy w przechowywanych jajach może być uważany za przyczynę, ew. jedną z przyczyn przesuniętego początku rozwoju i zwiększonej śmiertelności, czy też uważać go należy jedynie za zjawisko towarzyszące.

Nie rzuciły światła na tę sprawę próby wprowadzenia do jaja roztworów  $H_2O_2$ . Białko jest bowiem tak bogate w katalazę, że następuje natychmiastowy rozpad wody utlenionej; nawet zastrzyki o 2 cm<sup>3</sup> 10% perhydrolu Mercka nie wywoływały zaburzeń rozwoju. Na tę ochronną rolę białka nie zwrócono dotąd, o ile mi wiadomo, wcale uwagi. Nie podkreśla jej nawet *Needham* w swym wyczerpującym dziele, dotyczącym chemii rozwoju embrionalnego (8).

Z wyników dalszej serii doświadczeń należy wysnuć wniosek, że wzmożona śmiertelność zarodków w jajach przechowywanych wywołana jest toksycznym działaniem pewnych substancji, powstających w jaju podczas magazynowania. Wskazują na to wyraźnie dodatnie wyniki

wprowadzania do starych jaj glutationu, a więc związku mającego własności odtruwające. Zbadanie natury tych substancji i czynników, ograniczających ich szkodliwy wpływ powinno być przedmiotem dalszych badań. Opisane doświadczenia stanowią pierwszą próbę znalezienia przyczyn zmniejszania się zdolności rozwojowej w przechowywanych jajach.

Wyniki badań streścić możemy w następujący sposób:

1) Białko świeżych jaj jest bardzo bogate w katalazę. Zawartość tego enzymu w żółtku jest znacznie mniejsza.

2) Pomiedzy zawartością katalazy w białku jaj świeżych i jaj 10-dniowych niema różnicy; natomiast w białku jaj przechowywanych 30 dni, średnia ilość katalazy jest znacznie mniejsza niż w obu poprzednich grupach.

3) Jaja od poszczególnych kur różnią się wybitnie pod względem zawartości katalazy w białku. Nie stwierdzono jednak, by kury, znoszące jaja o wyższej zawartości katalazy odznaczały się lepszą wylęgowością z przechowywanych jaj.

4) Woda utleniona (0.3; 0.6; 1.0; 3.0, a nawet 10.0% perhydrolu) wprowadzona do białka ulega natychmiastowemu rozpadowi i nie powoduje zaburzeń w rozwoju zarodka.

5) Glutation wprowadzony do jaj, zwłaszcza w drugim tygodniu po ich zniesieniu obniża śmiertelność zarodków w jajach, włożonych do wylęgarki po 30 dniach przechowywania.

## PIŚMIENNICTWO

1. Binet L. et Weller G. Le glutathion. Actualités Scientifiques et Industr. Paris, 1937.
2. Dingemans J. J. / Chem. Weekbl. 29, 1932 (cytowane według Grossfelda 4)
3. Gracanic M. Biochem. Zeitschr., 180, 1927.
4. Grossfeld J. Handbuch der Eierkunde, Berlin, 1938.
5. Harrow, Chamelin and Mazur. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 37, 1937. (Cytowane według B. Harrow. Textbook of Biochemistry, str. 252. Philadelphia and London, 1943.
6. Kaufman L. Pamiętnik Instytut. Nauk. w Puławach, 17, 1937.
7. Loeb J. and Wastenays H. Bioch. Zeitschr., 36, 1911.
8. Needham J. Chemical Embryology. Cambridge University Press, 1931.
9. Rapkine L. Journal de Chimie Physique, 34, 1937.
10. Rogers W. B. and Winternitz M. C. Jour. Exp. Med. 12, 1910. (Cytowane według Needhama 7)
11. Schmidt W. Forstarchiv, 1936.
12. Warburg O. Arch. f. d. ges. Physiol. 160, 1915. (Cytowane według Needhama 7).

## SUMMARY

## »Aging« of eggs II.

## Decrease of hatchability and catalase content in stored eggs

In continuation of her former research on the influence of storage of eggs on mortality, development and growth of embryos (6), the author endeavours to elucidate, the causes of the impaired hatchability from eggs which had been stored previous to incubation.

From the research of Loeb and Wastenays (7), Warburg (12) a. o. it may be inferred that egg-segmentation is accompanied by increased respiratory exchanges. According to Binet and Weller (1), SH compounds play an important rôle during the processes of cell-division. Rapkine (9) found that cell-divisions which were checked by toxins could be restored through the addition of cysteine or thioglycolic acid solutions and he therefore considers the arrest of cell-divisions in his experiments as caused by blockade of SH compounds.

In the present research the hypothesis has been advanced that the delayed growth and increased mortality of embryos developing in eggs which had been stored, are the effect of intoxication of the embryo by  $H_2O_2$ . This substance is formed in living cells, but is normally split up, owing to the presence of catalase. Schmidt (11) Gracanian (3) a. o. found decrease of catalase content in stored plant grains in proportion to their decreasing germinating power and Dingemans (2), in contradiction to Rogers and Winternitz (10), observed that on the average the amount of catalase in fresh-laid eggs was much higher than in those from cold storages.

In the present experiments catalase content was determined both in egg-yolk and in egg-white of a) fresh-laid eggs, b) 10 days after their deposition, and c) in eggs 30 days old. It is seen from the items of table 1 in the Polish text that egg yolk contains but slight amounts of catalase and that its content does not change essentially during storage. Egg white, on the contrary, is rich in this enzyme. The content of catalase in the white of fresh-laid eggs and in eggs 10 days old (and their hatchability) do not differ, whereas a considerable decrease may be noticed as to eggs 30 days old. There is a wide range of variability as to the amount of catalase of fresh-laid eggs from separate hens and



after 30 days of storage catalase content of the egg-white of certain hens was higher than the average content of this enzyme in fresh-laid eggs of other hens. No difference, however, could be ascertained as to the resistance to the noxious influence of storage of eggs from hens differing as to the catalase content of their eggs. Consequently, it is doubtful whether the decrease of catalase may be considered as a causative agent of the impaired embryo development in eggs which had been stored.

Injections of  $H_2O_2$  (0.2 ccm of 0.3; 0.6; 1.0; 3.0 and 10.0 per cent resp) into egg-white of fresh-laid eggs had no effect on embryo development, being immediately split up, owing to the presence of catalase. The important protective rôle of egg white is demonstrated by these experiments.

According to Harrow, Chamelin and Mazur (5) glutathione may be of importance as a detoxifying agent. Solutions of this substance (M/500 and M/100 resp.) were injected into stored eggs 10 to 14 days old and to those more than 14 days old. The eggs were set into the incubator 30 days after they had been laid and embryo mortality after 3 days of incubation was observed. Eggs of the same age, injected with distilled water and stored eggs without any injection served as a control. From the results collected in table 2 of the Polish text it is seen that glutathione, first of all if injected during the second week of storage, reduced embryo mortality in eggs which had been stored 30 days previous to incubation.

BIBLIOTEKA  
UNIwersytecka  
Gdańsk

CU 2619