

INDOLVÁZAS VEGYÜLETEK BIOSZINTÉZISÉNEK
VIZSGÁLATA ÉLESZTŐKÖN

D o k t o r i é r t e k e z é s

A József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karához
benyújtja:

Procs Tibor
okl.középiskolai tanár
a Kőbányai Gyógyszerárúgyár kutatója

Budapest
1963



Diss. B 462



Tartalomjegyzék

	Oldal
B e v e z e t é s	1
A/ A kérdésre vonatkozó korábbi vizsgálatok	2
1. Az aromás aminosavak bioszintézise	2
2. Az indol bioszintézise	8
3. A triptofán (TTP) bioszintézise	11
4. A β -indolilecetsav (IES) bioszintézise	14
B/ A vizsgálat célja	18
C/ Anyag és módszer	19
1. Az élesztőtörzsek tenyésztése	19
2. Az indol bioszintézisét vizsgáló módszer . .	21
3. Triptofán bioszintézisét vizsgáló módszer . .	22
a/ A fermentlé szabad aminosav meghatározása	23
b/ Az élesztősejtek szabad aminosav tartalmának meghatározása	24
c/ Az élesztősejtek kötött aminosav tartalmának meghatározása	24
4. A β -indolilecetsav (IES) bioszintézisét vizsgáló módszer	26
5. A <i>S. cerevisiae</i> triptofán dekarboxiláz rendszerek kimutatásának és mérésének manometriás módszere	29
6. IES hatása az élesztők endogén légzésére . .	30
7. Az IES-oxidáz kimutatása	30
D/ Kísérleti eredmények	31
1. Indol bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok	31
2. A TTP bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok	35
3. Az IES-bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok	45
4. A triptofán dekarboxilációjának vizsgálata	57
5. Az IES hatása az élesztők endogén légzésére	57
E/ Az eredmények értékelése	59
1. Az indol bioszintézise	59
2. A triptofán bioszintézise	61
3. A β -indolil ecetsav bioszintézise	69
4. Az IES hatása az élesztők endogén légzésére és az IES-oxidáz	80
Ö s s z e f o g l a l á s	82
I r o d a l o m	83

B e v e z e t é s

A harmincas évektől kezdve az indolvázias vegyületek az érdeklődés központjába kerültek. Számos közlemény számol be ezen vegyületek izolálásáról, bioszintéziséről és élettani hatásáról egyaránt. Az indolvázias vegyületek és származékaiknak kutatása jelentős, mivel bioszintézisük ismerete számos elméleti és gyakorlati probléma megoldásában segíti a kutatókat.

Az élettanilag jelentős indolszármazékokat két csoportra oszthatjuk:

1. A növények növekedését szabályozó fitohormonok jelentős része indolszármazék. E hormonszerű anyagra bioszintézise nem egységes, számos útja lehetséges, amelyek közül egyeseké a magasabb szervezettségű növényekben és a mikroorganizmusokban már igen valószínű.

2. Indolvázszármazéknak tekintjük az anyarozs-alkaloidokat (indolalkaloidokat) is, noha az alkaloidkémia nem ebbe a csoportba sorolja őket. Idesorolásukat az a körülmény indokolja, hogy ezek magvát képező lizergsav szintézise is a triptofánból indul ki, és a lizergsav szerkezetében is felismerhető az indolváz. Az anyarozs-alkaloidok a gyógyászatban jelentősek.

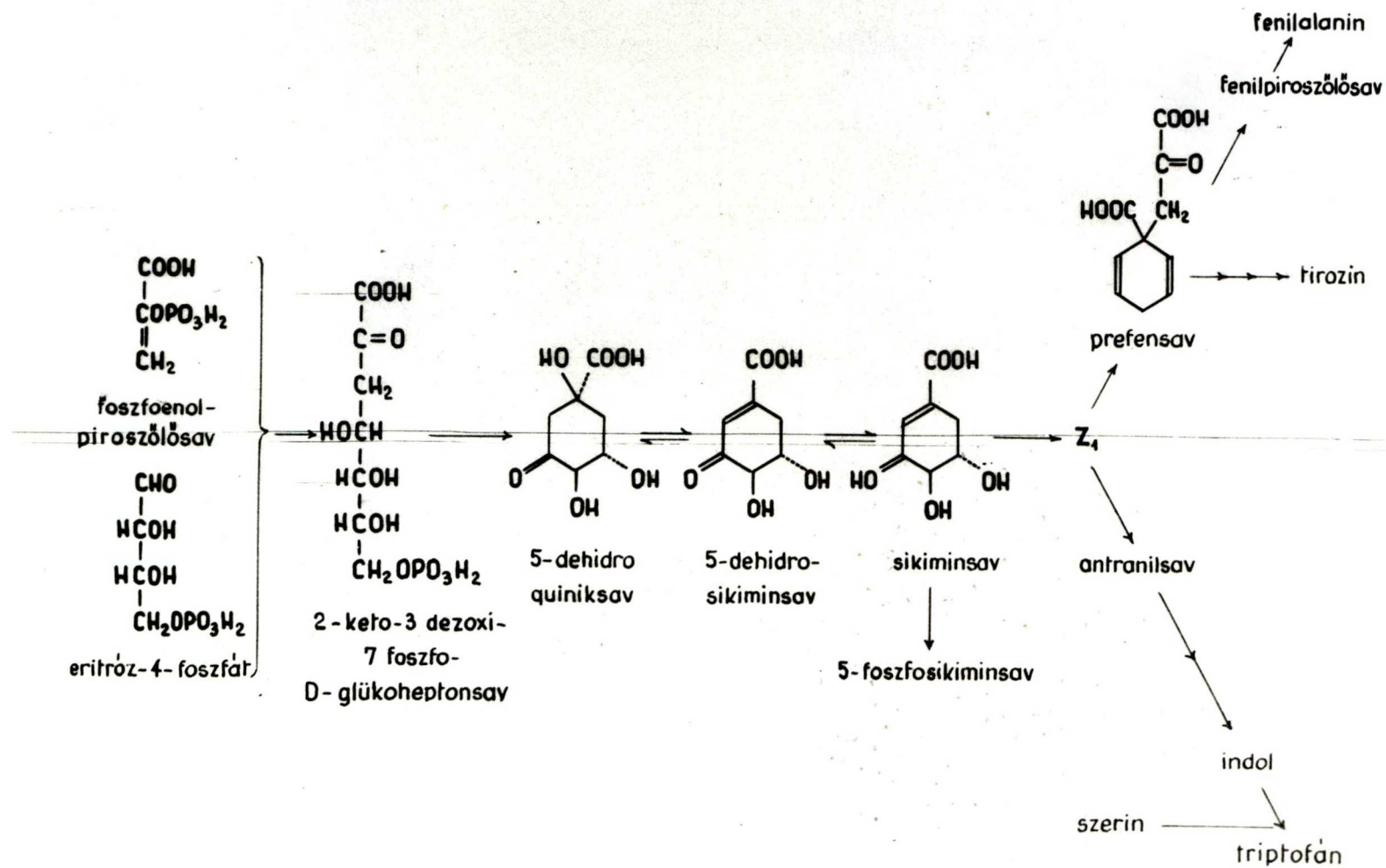
Disszertációmban vizsgálat tárgyává tettem az indolváz vegyületek bioszintézisét néhány élesztőfajban és pedig az antranilsavból kiindulva, asszal a hipotézissel, hogy ilyen módon feleletet kapok magának az indolváznak bioszintézisére is.

A/ A kérdésre vonatkozó korábbi vizsgálatok

1. Az aromás aminosavak bioszintézise

DAVIS (1955), ZOBERST (1958), POLJANOWSKI (1959) munkáiban az aromás aminosavak bioszintézisének lehetséges utjaira vonatkozólag igen figyelemre méltó vázlatokat közölnek (1-3. ábra).

DAVIS a foszfoenol-piroszdlősavból és az eritróz-4-foszfátból kiindulva vezeti le a 2-keto-3-dezoxi-7 foszfo-D-glükoeptonsav keletkezését. A foszfoenol-piroszdlősav a glikolizis folyamán a 2-foszfoglicerinsavból az enoláz enzim hatására dehidratációval keletkezik. Az eritróz-4-foszfát pedig a szedoheptulóz-7-foszfátból, vagy a glicerinaldehid-3-foszfátból a transzaldoláz enzim jelenlétében. Az aromás mag szintéziséhez a 2-keto-3-dezoxi, -7-foszfo, D-glükoeptonsav képezi a közvetlen előanyagot. Az 5-dehidro-quiniksavból dehidratációval az 5-dehidro-sikiminsav, majd a sikiminsav keletkezik. A sikiminsavig minden lépés tisztázottnak látszik. Ezután jön egy ismeretlen Z_1 vegyület, amelyből kiindulva az aromás aminosavak bioszintézise két úton is megvalósulhat. Az egyik úton a prefensavon keresztül eljutunk a fenilalaninig, illetve ismeretlen közteseken ke-



1. ábra: Aromás aminosavak bioszintézise /DAVIS 1955/.

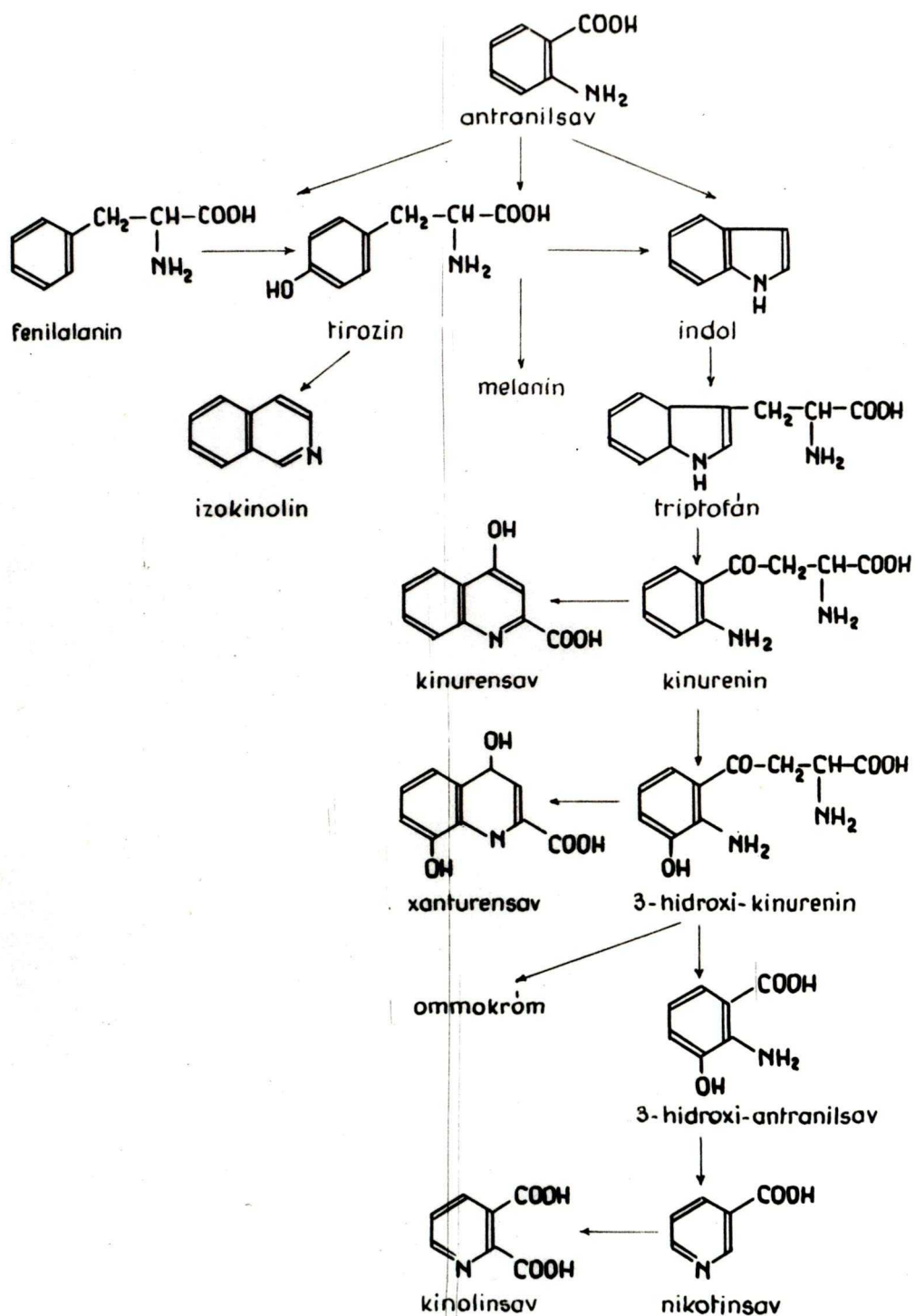
resztül a tirozinig, míg a másik úton a Z_1 -ből antranilsav keletkezik, majd ebből indol, végül az indol és a szerin kondenzációs reakciójából triptofán jön létre (1. ábra).

POLJANOWSKI az 5-dehidro-quiniksavat "X" jelzett ismeretlen vegyületnek tekinti. A Z_1 vegyületet DAVIS-szel ellentétben az 5-foszfo-sikiminsavból származtatja. A Z_1 ismeretlen vegyületből prefensavat, a prefensavból pedig a fenilalanint és a tirozint vezeti le. Az indolváz-szintézise kérdésében DAVIS-szel azonos állást foglal el. A vázlat szerint a fenilalanin és a tirozin reverzibilisen átalakulnak egymásba (2. ábra).

ZOBERST által közölt szkéma lényegileg megegyezik a már ismertetett utakkal, azonban szerző a Z_1 vegyületet megelőző intermedierek átalakulását katalizáló egyes enzimek nevét is feltünteti (3. ábra).

SCHÖTER szerint az indol, a fenilalanin és a tirozin antranilsavból keletkezik. Elképzelésének újszerűsége abban foglalható össze, hogy a fenilalanint és a tirozint az antranilsavból származtatja. Ezen meggondolás alapján a prefensavat nem tekinthetjük a fenilalanin és a tirozin közös prekursorának. A vázlat szemléletesen mutatja a triptofán lebontási termékeit. A triptofánból kiindulva a kinureninen keresztül veseti le a nikotinsav keletkezését. Ezen reakciósor egyes intermedierjeiből származtatja a kinurensavat és a xanturensavat (4. ábra).

Az aromás aminosavak bioszintézisére vonatkozó vázlatok azt mutatják, hogy a szintézisnek útjai még tisztázatlanok

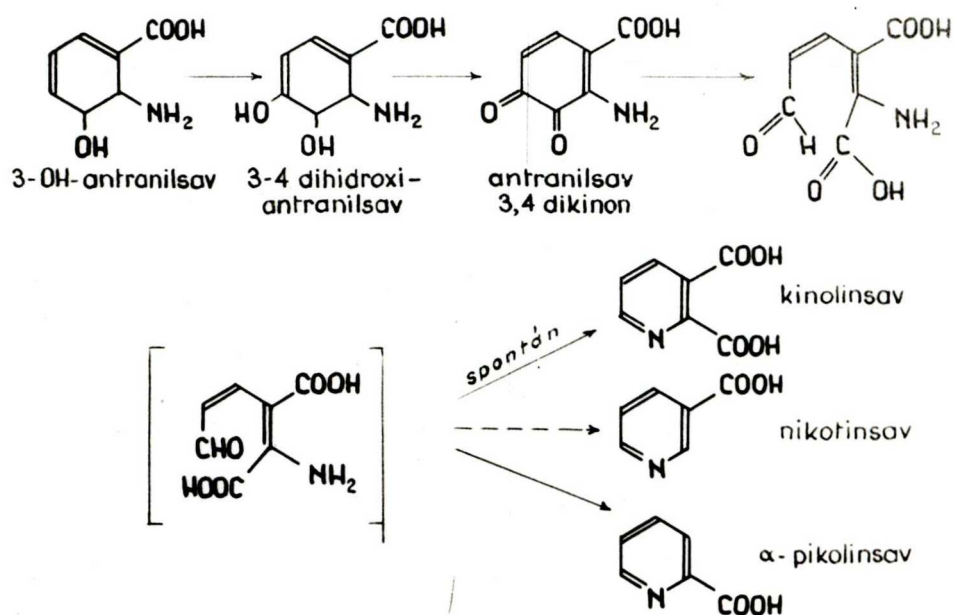


4. ábra: Aromás aminosavak bioszintézise és lebomlása
(SCHRÖTER 1958)

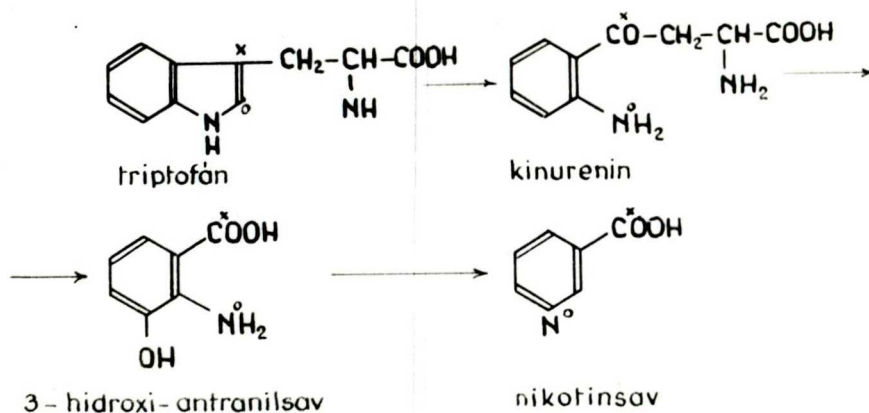
és jelentős számú ellentmondó lépést tartalmaznak. Ezen vázlatokban a szerzők a legkülönbözőbb élő szervezeteken megfigyelt egyes reakciólépéseket összegezték, így az ellentmondó megállapítások részben érthetőek.

2. Az indol bioszintézise

Az előzőekben bemutatott szkémák szerint az antranilsav fontos vegyület és központi helyet foglal el az indolváz bioszintézisében, amennyiben annak közvetlen előanyaga. DAVIS, POLJANOWSKI és ZOBERSZT idézett műveikben az antranilsavat az ismeretlen Z_1 intermediérből, tehát a glükóz foszforolitikus lebontása közben keletkező intermedierekből származtatják. Az antranilsav azonban lehet lebontási reakció terméke is, hiszen TEAS és ANDERSON (1951) a kukorica porzóiban, csirnévényeiben és leveleiben megfigyelték a triptofánnak antranilsavvá való átalakulását. Hivatkozhatunk TYLER és SCHWARTING (1953) munkáira is, akik izotoptechnikával bizonyították, hogy a triptofán a *Claviceps purpurea*-ban antranilsavra bomlik. Az antranilsav és alanin keletkezését triptofánból - kinureninen keresztül - állatkísérletekben is igazolták. Ez utóbbi reakció valószínűleg reversibilis. A triptofánból kinureninen keresztül 3-OH-antranilsav, és ebből több lépésen át a kinolinsav, nikotinsav, és a α -pikolinsav keletkezik. MEHLER (1955) a 3-OH-antranilsavból kiindulva az antranilsav 3,4-dikinonon át vezeti le a reakciót (5. ábra). A nikotinsav keletkezésének mechanizmusát a triptofánból HEIDELBERGER, ÁBRAHÁM, LEFKOVSKY (1949) tisztázták (6. ábra).



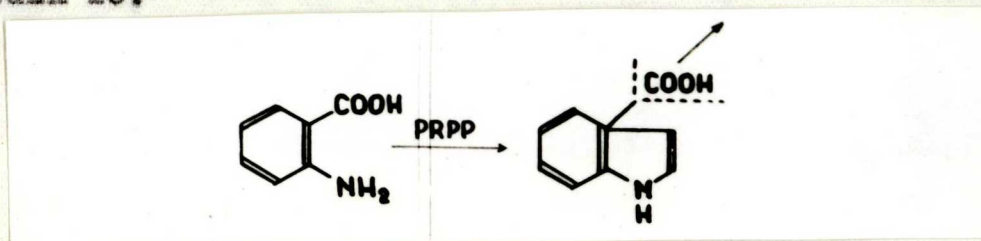
5. ábra: Kinolinsav, nikotinsav, α -pikolinsav keletkezése az élő szervezetben (MEHLER 1955).



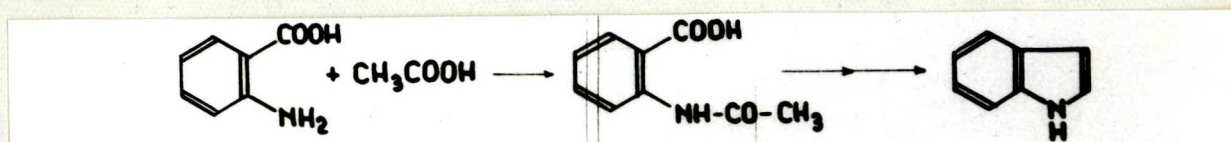
6. ábra: Triptofánból a nikotinsav keletkezése (HEIDELBERGER, ABRAHAM, LEPKOVSKY 1949).

Maga az antranilsav észterek formájában virágok illatanyagában fordul elő, de jelenléte feltehetően fontos az élő szervezetben az indolvázias vegyületek bioszintéziséhez is. Erre mutatnak NYC, MITCHELL, LEIPER és LANGHAM (1949) izotóptechnikával végzett kísérletei a *Neurospora* néhány mutánsában, ahol az antranilsav $\longrightarrow$ indol reakciót bizonyították. YANOFSKY (1956), PARKS és DOUGLAS (1957) az *E.coli* antranilsavas táptalajából szintén kimutattak indolt.

YANOFSKY szerint ez az átalakulás a következőképpen játszódik le:

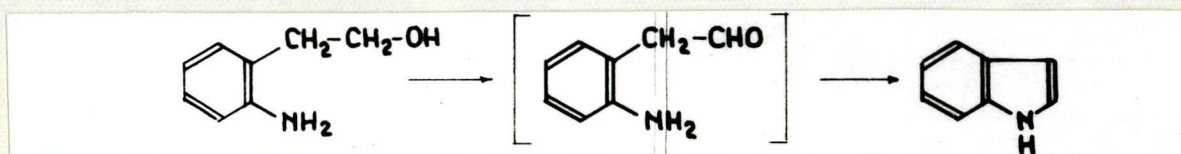


POLJANOWSKY (1959) szerint antranilsavból és ecetsavból keletkezik az N-acetilantranilsav, majd több lépésen át az indol:

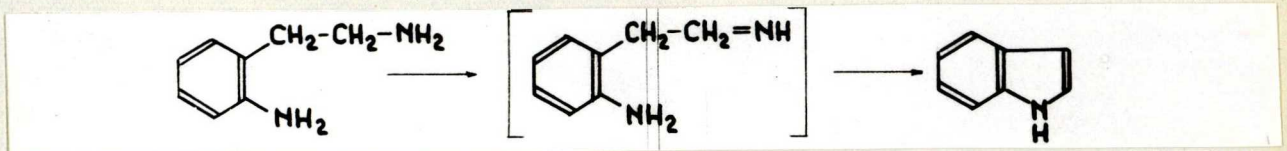


N-acetil antranilsav

KREBS, HAFIZ és EGGLESTON már 1942-ben kimutatták, hogy a *Bacterium coli* a 2/2 aminofenil-etanol képes átalakítani indollá:



MANN és SMITHES (1955) szerint indol keletkezik a 2/2 aminofenil-etilaminból is:



A felsorolt kísérleti megfigyelések alapján jogosan feltételezhetjük, hogy az indol szintézise többféle előanyagból és a különböző élő szervezetben különböző utakon valósulhat meg.

3. A triptofán (TTP) bioszintézise

Számos irodalmi adat utal arra, hogy több élő szervezetben indolból és szerinből TTP szintetizálódik. Olyan esetekben, amikor az élő szervezet elegendő szerint tartalmaz és ezt enzimatis hidrolizissal szabaddá tudja tenni, a tápoldathoz külön szerin adagolás nem szükséges.

GUGGENHEIM (1944) a *Neurospora*-ban megvalósította az indol és a szerin TTP-ná való kondenzálódását. Mig WILDMANN, FERRI és BONNER (1947) az indollal és szerinnel infiltrált parajlevelekben észlelték a TTP szintézisét. YANOFISKY (1957) *Neurospora* mutánst vizsgált és kimutatta az indol és szerin kondenzációját TTP-ná.

MADHUSUDANAN, NAIR, VAIDYNATHAN (1961) a csicseri borsón végzett infiltrációs kísérleteikben tapasztalták, hogy a TTP közvetlen előanyaga az indol és a szerin. A szintézist feltehetően megvalósító enzimet (a TTP-szintetázt) a magvak

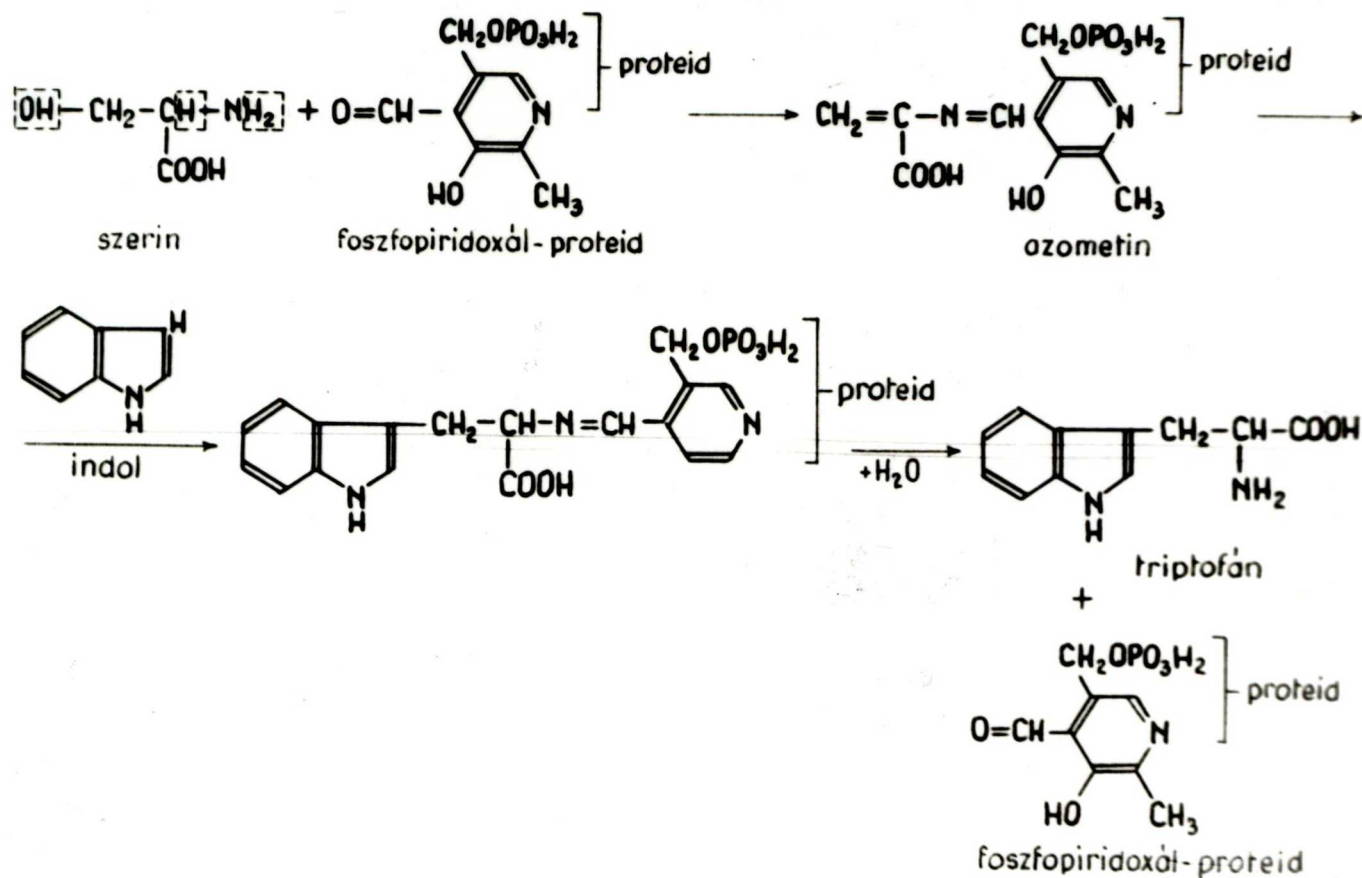
sejtmentes extraktumból kimutatták. A szintézis optimális pH-ja 5,5 és reakció megvalósulásához a piridoxál-foszfát jelenléte is szükséges. A TTP-szintetáz működését nehéz fém-ionok gátolták.

UMBREIT, WOOD, GUNDALES (1946), YANOFSKY (1952, 1955, 1956, 1957) mutattak rá először, hogy az indol és szerin kondenzációs reakciójához a piridoxál-foszfát jelenléte szükséges. POLJANOWSKY (1959), BRAUNSTEIN és SCHEMIKIN (1953) tisztázták a fosztopiridoxál-proteid biokatalitikus szerepét az indol és szerin kondenzációjában (7. ábra). Eszerint az indol reakcióba lép a szerin-piridoxál-proteid komplex-szel (a szerin és a fosztopiridoxál-proteid egy azometin kötéssel létesít vegyületet) és a fosztopiridoxál-proteid kilépésével TTP keletkezik.

TATUM és SHEMIN (1954) a reakció mechanizmusát tanulmányozták. A szerint C^{14} -gyel, N^{15} -tel és deutériummal jelölték. A reakció lejátszódása után egy molekula TTP-ra számolva, egy atom deutérium hiányzik. Ebből következik, hogy a reakció intermolekuláris dehidratáció.

RAFELSON (1955) az *Aerobacter aerogenes*-ből kivonta a jelzett szerinből szintetizált TTP-t és annak oldallánca hasonló volt a jelölt szerinhez.

Az indol és szerin kondenzációs reakcióját a következő mikroorganizmusokban valósították meg: *Lactobacillus* ssp. (SNELL 1943, SCHWEIGERT 1947); *Lentinus amphotodes* (FRIES 1950); *Salmonella typhosus*, *Bacterium coli*, és *Claviceps purpurea* (HARLEY-MASON 1954).



7. ábra: A foszfopiridoxál-proteid biokatalitikus szerepe /POLJANIWSKI 1959, BRAUNSTEIN és SCHEMISKIN 1953/.

Az indol és szerin kondenzációját TTP-ná a *Claviceps purpurea*-ban TYLER és SCHWARTING (1953) is megvalósították, azonban a keletkezett TTP antranilsavra és nikotinsavra bomlott.

4. A β -indolilecetsav (IES) bioszintézise

A magasabb szervezetségű növényekben az IES előfordulása közismert, de számos közlemény bizonyítja az IES-nak a mikroorganizmusokban való előfordulását is. GRUEN (1959) nagy összefoglaló dolgozatában - melyben az auxinok gombákban való előfordulásáról számol be - közli, hogy eddig 30 gomba genus és 75 gombafaj auxinprodukciónak írták le. Az előfordulási adatokat figyelemmel kísérve megállapíthatjuk, hogy az IES jelenlétét többségében biológiai teszt-módszerekkel mutatták ki. A mikroorganizmusokból preparatív három esetben mutattak ki és állítottak elő IES-at. KÜGL és KOSTERMANS (1943) 50 kg élesztőből éteres extrahálással 1,2 mg IES-at kaptak. THIMANN (1935) a *Rhizopus suinus*-ból, CRAMM és FISCHER (1948) a *Penicillium*-ból vontak ki IES-at, a gombák auxin produkcióját főleg *Avena coleoptilis*-teszttel igazolták.

A *Saccaromycetales* genusban a *S. cerevisiae* auxinprodukciónak igazolták *Avena coleoptilis*-teszttel és izolálással^{1/}.

^{1/} A dolgozat készítése idején a József Attila Tudományegyetem Növényélettani Intézetében Szalai I. professzor több (mintegy 10) *Saccharomyces* speciést vizsgált meg és egyesekben jelentős IES szintézist figyelt meg szintetikus tápoldatban. A fermentle kromatografiás izolálásával és Gordon-Weber reakcióval a fajok között jelentős különbséget talált az IES produkciót illetően. (Nem közölt eredmény.) (Ex.verb. Prof. Szalai).

Az élesztők IES előfordulásával és szintetizálásával kapcsolatban az irodalomból csupán néhány közlemény ismeretes.

A gombák köréből is csak kevés eset ismeretes, amikor az IES jelenlétét papírkromatográfiásan bizonyították. WOLF (1956) *Gymnosporangium juniperi-virginiae* kulturát állított be folyékony szintetikus táptalajon és a gomba auxinprodukciónak megvizsgálta. Az IES-t a kultura szűrletéből Gordon-Weber reagenssel és spektrofotometriásan kvantitatíve meghatározta. Sem a tápoldatból, se az egy hónapos kultura szűrletéből nem lehetett IES-t kimutatni, de ha a tápoldathoz 0,1 %-nyi l-triptofánt adott az IES már a tizedik napon kimutatható volt. Papírkromatográfiával igazolta, hogy az IES a triptamin (TA), az indolacetaldehid IAA köztes termékeken keresztül TTP-ből keletkezik. WOLF (1956) vizsgálataiból következik, hogy a gombával fertőzött növény magas IES tartalma a gomba IES szintetizáló képességével magyarázható, viszont az IES prekursorokat a gomba a gazdanövényből kapja.

GRUEN (1956) a *Phycomyces blakesleanus*-ból papírkromatográfiával és Salkowsky-reagenssel mutatta ki az IES-at. WATANABE (1957) Ehrlich-reagenssel mutatta ki az IES-at a *Piricularia oryzae* éteres extraktumának savanyú frakciójából készült papírkromatogramján. SHAW és HAWKINS (1958) a *Puccinia graminis tritici* uredospórájának éteres extraktumával készült papírkromatogramján *Avena* teszttel az IES-at kimutatták és még két aktív foltot észleltek.

URLICH (1960) IES előfordulást közölt a mikorrhiza gombákban. Említést tesz az IES-oxidázról is, mely a gomba

kimutatható IES tartalmát 24 óra alatt 11 más vegyületté alakítja át.

Számos példát találunk az irodalomban arra is, hogy a szintetikus táptalajhoz egyes aminosavak adagolása miképpen emeli vagy indítja meg az IES produkciót. Ma már bizonyított, hogy a TTP az IES prekursora. Számos szerző számolt be arról, hogy a tápoldathoz, vagy a szilárd táptalajhoz adagolt TTP hatására emelkedik az IES produkció, avagy csak ennek hatására indul meg a szintézis.

Meglepő viszont az, hogy egyes mikroorganizmusok esetében a tirozin is jelentősen megemelte az IES mennyiségét, holott a tirozin szerkezeti sajátosságai jelentősen eltérnek az indolváz szerkezetétől. KÜGL és KOSTERMANS (1934) a *Saccharomyces cerevisiae* tápoldatában akkor kapott legmagasabb auxin produkciót (530000 AE_1), ha a tápoldatban a tirozin is jelen volt. BOYSEN-JENSEN (1932) az *Aspergillus niger* auxinprodukciónál variálta különböző aminosav tartalmú szintetikus tápoldatokban vizsgálta. A tirozin és TTP tartalmú tápoldatokban mindig magasabb volt az auxinszint. Amennyiben a szintetikus tápoldathoz még hisztidint, leucint, lizint, glicint, fenilalanint, triptofánt és tirozint is adott, az auxin megjelent a tápoldatban. Egy más összetételű szintetikus tápoldatban nevelt *Aspergillus niger*-tenyészethez alanint, arginint, aszparagint, cisztint, glicint és prolint adott, s a megfelelő inkubációs idő után az Avenateszt negatív auxinreakciót mutatott. Ezek az adatok még nem bizonyítékok arra, hogy az *A. niger* tirozinból indolauxint

szintetizál, mivel a tápoldatban a TTP is jelen volt. Minden esetre BOYSEN-YENSEN (1932) vizsgálatai arra mutattak rá, hogy az *A. niger* saját szabad aminosavkészletéből nem képes auxint szintetizálni, hanem csak a felsorolt aminosavak egyikeiből.

KÜGL és KOSTERMANS (1934) *A. niger* szintetikus tápoldatához aszparegint adva, a tápoldatban pozitív auxinreakciót kaptak a tirozin szintén pozitív reakciót adott, sőt az auxint IES-val azonosították. SUKHORUKOV és STROGONOV (1945) adatai megegyeznek az előző eredményekkel, vagyis az *A. niger* tirozin tartalmú tápoldatában az auxinprodukciónő.

Mindezen adatok arra mutatnak, hogy egyes mikroorganizmusok a tirozinból képesek IES-vat szintetizálni. Ha ezen folyamat reakciólépéseinek lehetőségét keressük, csak egy út lehetséges. A tirozinnek először indollá kell alakulnia, amely a szerinnel egy dehidratációs kondenzációval TTP-t szolgáltat. A TTP pedig közismerten IES prekursor. Még kérdéses és kellőképpen nem bizonyított az, hogy a tirozin képes-e indollá alakulni, avagy csak az indol-szintézisét indukálja valamilyen, eddig ismeretlen reakció révén. Fennáll a lehetősége annak is, hogy a tirozin egy fiziológiailag nagy hatású enzim-fehérjesszintéziséhez elengedhetetlen. A kérdésre végleges választ csak az izotópos módszerrel végzett vizsgálatok adhatnak.

B/ A vizsgálat célja

Az áttanulmányozott irodalomból az állapítható meg, hogy az indolváz vegyületek szintézise kérdésében még nincs egységes álláspont, és az eddig megvizsgált szervezetekben különböző utak voltak megfigyelhetők. Éppen ezért feladatul tűztem magam elé, megvizsgálni több élesztőtörzsben az indolváz és származékainak bioszintézisét, az antranilsavból kiindulva, továbbá e szintézisben a tirozin jelentőségét. Célkitűzésemet egyrészt KÜGL és HAAGEN-SMIDT (1931), KÜGL, HAAGEN-SMIDT és BRILEBEN (1933), NIELSEN (1931), KOSTERMANS (1934), JUMP (1938) és ROBINSON és STIER (1941) ama megállapítására alapoztam, amely szerint a *Saccharomyces cerevisiae* auxint termel. Ebből pedig igen nagy valószínűséggel következik, hogy az indolváz felépítésére is képes, hiszen az auxin szintézise indolmentes tápoldatban is megvalósul. Másrészt mind az egyszerűbb, mind a magasabb szervezetségű növényekből is ismert az antranilsavból megvalósított indolszintézis. Viszont az indol a szerinnel kondenzáció útján triptofánt ad, ami az IES prekursora.

A tirozin-indol reakció út tisztázásához tirozin tartalmú tápoldatban nevelt élesztőtörzsek indol termelését is vizsgálat tárgyává tettem, miután irodalmi adatok szerint a *S. cerevisiae*-tenyészet auxintartalma tirozin tartalmú tápoldatban magasabb mint anélkül.

C/ Anyag és módszer

1. Az élesztőtörzsek tenyésztése

A bioszintetikus reakciókat a következő tesztörzseken tanulmányoztam:

1. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen
2. *Schizosaccharomyces pombe* Lindner
3. *Endomycopsis fibuliger* (Lindner) Dekker
4. *Hansenula anomala* (Hansen) H. et P. Sydow
5. *Geotrichum candidum* Link
6. *Candida utilis* (Henneberg) Lodder et Kreger van Rij
7. *Kloakera apiculata* (Reess emend. Klöcker) Janke
8. *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder
9. *Paratorulopsis pseudaria* (Zsolt) Novák et Zsolt
10. *Dekkeromyces fragilis* (Jørgensen) Novák et Zsolt
11. Kereskedelmi forgalomban lévő pékésztő (*S. cerevisiae*)

Az élesztőtörzseket 20 % malátát tartalmazó 2 %-os ferde ágárra oltottam. Két napos inkubáció után (28 °C-on), 15 ml steril bouillonban szuszpendáltam, amelynek 10 ml-nyi mennyiségét a már előzőleg (autoklávban 120 °C-on) sterilizált tápoldatba pipettáztam. Az oltásokat steril oltófülkében végeztem.

Teszt-tápoldatok:

I. Teljes tápoldat:

1000 ml tápoldat tartalma:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Élesztőkivonat	10,0 g
Szacharoz	50,0 g

II. Teljes peptonos tápoldat:

100 ml tápoldat tartalma:

Ugyanaz mint az I. tápoldat + 20 g pepton

III. Hiányos tápoldat:

1000 ml tápoldat tartalma:

Glükóz 10 g

IV. Szilárd táptalaj:

1000 ml tápoldat tartalma:

Maláta 20 %

Ágár 2 %

A teljes és a teljes peptonos tápoldat a tesztörzsek elszaporításához volt szükséges. A fermentáláshoz 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokat és 100-100 ml tápoldatot használtam. A fermentálást rázógépből, 28 °C-os hőmérsékleten 3 napon át végeztem. A prekuzort, illetve prekuzorokat Seitz-féle szűrőn préseltem a tenyészetbe. A peptonos tápoldat alkalmazásával az volt a célom, hogy nagyobb mennyiségű aminosavat vigyek be, amelyek közül egyesek prekuzorként szerepelhetnek. A vizsgálatokhoz használt Caramin, Heparamin, Cellamin és Tripton aminosav tartalma a papírkromatográfiás vizsgálatok alapján a következő: leucin, fenilalanin, triptofán, tirozin, alanin, szerin, glicin, glutamin, aszparagin, lisin és hisztidin. Valamennyi peptonfóleség ugyanazokat az aminosavakat tartalmazta, természetesen eltérő mennyiségben. Kísérleteimben magas tirozin és triptofán tartalma miatt főleg a "Caramin"-t használtam.

A hiányos tápoldatot kizárólag a pékélesztőhöz használ-

tam, ahol a cél nem a tömeg produkció, hanem az IBS szintézisén volt, amelyet a minimális szaporodás mellett valósítanak meg.

2. Az indol bioszintézisét vizsgáló módszer

1. Kísérlet: Az indol bioszintézise hiányos tápoldatban.
A III. számú tápoldat 100 ml-ében szuszpendált 4 g péklesztőhöz 50 mg, 2 ml etanolban oldott antranilsavat adtam. A kontroll ugyanígy volt beállítva, de antranilsav nélkül. A 3 párhuzamos tenyészetet 28 °C-on 48 órán át rázattam. Az inkubálás befejeztével a tenyészet 50 ml-nyi mennyiségét 6000 ford/perc mellett centrifugáltam, majd a szupernatant G3-as szűrőn átszűrtem. Borkósavval pH 3-ra beállított fermentlevet 3x20 ml peroxidmentes éterbe átráztam. Az egyesített éteres frakciót 60 °C-os vízfürdőn vakuumban (4 gmm mellett) 2 ml-re besűritettem és abból 0,2 ml-nyi mennyiséget Sch-Sch 2043b papíron felszálló módszerrel kromatografáltam (68). Szolvensként izopropanol:ammonia:víz 10:1:1 arányú keveréket használtam, majd a megszáritott kromatogramot Gordon-Weber reagenssel (68) kezeltem. Száritás után az indolfoltokat kivágtam, 5 ml 1 %-os perklorsavval eluáltam, ha szükség volt G3-as szűrőn szűrtem és 560 mμ-nál fotometráltam.

2. Kísérlet: Az indol bioszintézise teljes tápoldatban.
A törzstenyészetből bouillonnal készített szuszpenzió 10 ml-nyi mennyiségét 100 ml steril I.sz. tápoldatba vittem és 28 °C-os hőmérsékleten erőteljes rázás mellett 72 óráig inkubál-

tam. Ezután 20 %-os meleg etanolba oldott annyi antranilsavat vittem be Seitz-szűrőn át, hogy a tenyészet antranilsav tartalma 100 ppm legyen, ezután az inkubálást azonos körülmények között folytattam. Az indol mennyiségét 24 óránként négy alkalommal az 1. kísérletnél leírt módszerrel mértem. Az antranilsavat csak 72 órás inkubálás után célszerű a tenyészet-hez hozzáadni, mert így a szaporodást gátlóhatása nem zavaró.

3. Triptofán bioszintézisét vizsgáló módszer

3. Kísérlet: Triptofán szintézis teljes tápoldatban. A tenyészet beállítása azonos a 2. kísérletnél leírtakkal. A 72 órás inkubáció után Seitz-szűrőn a tenyészet-hez annyi metanolban oldott indol és szerint vittem, hogy a tápoldat koncentrációja 210 ppm, illetőleg 70 ppm legyen. A triptofán mennyiségét 24 óránként hat alkalommal ROTH (1939) módszerével határoztam meg. A módszer a következő:

20 ml fermentátumot turmixon homogenizáltam, majd a homogenizátumhoz 50 ml 5 %-os triklórecetsavat adtam, és rázógépen 30 percig ráztam. Az élesztősejteket a fermentátumból centrifugálással választottam el, a szupernatant leöntöttem, a maradványt kétszer egymásután 50-50 ml 1 %-os triklórecetsavval mostam, majd centrifugáltam. (Az egyesített szupernatans tartalmazza a szabad triptofánt.) A triklórecetsavas oldatot vácuumban 10 ml-re bepároltam. A centrifugacsőből a maradványt 8 ml deszt.vizzel Erlenmeyer lombikba kvantitativé be-mostam (ez tartalmazza a kötött triptofánt). Mind a bepárolt oldathoz, mind a maradványhoz 40-40 ml oxidált keveréket (100 ml 70 %-os H_2SO_4 + 60 ml 25 %-os HNO_3) adtam, és 10 perces állás után 100 °C-os vízfürdőn gyakori rázogatók között egy órán át főztem. Lehűlés után az anyagot Sch-Sch 5893 (kékszalagos) szűrőn át 50 ml-es mérőlombikba szűrtem, majd 70 %-os kénsavval addig mostam szűrőn a csapadékot, míg a szűrlet 50 ml nem lett. A sárga színű oldatot S_{43} -as szűrővel 1 cm-es küvettában vakpróbával szemben Pulfrich fotométeren fotometráltam.

4. Kísérlet: Triptofán szintézis hiányos tápoldatban: A III.sz. tápoldat 100 ml-ben szuszpendált 4 g pékélesztőhöz 2 ml, 60 %-os etanolban oldott 30 mg indol és 10 mg szerint vittem. Az indol és szerin élesztősejtek általi felvételét az alkoholban való teljes feloldás megkönnyíti. Ha az indol és szerint oldott állapotban és nem kristály formájában vittük a tápoldatba, lényegesen több triptofán szintetizálódott. A pékélesztő triptofán tartalmát úgy határoztam meg, hogy 5 g pékélesztőt 50 ml 5 %-os triklórecetsavval turmixban homogenizáltam. A homogenizált élesztő triptofán tartalmát ROTH módszerével (1. a 3. kísérletnél) határoztam meg. A ROTH-féle triptofán-meghatározás itt csak úgy volt alkalmazható, ha a szupernatanst és a leülepedett élesztősejteket alapos (3x15 ml) éteres mosásnak vettem alá. Erre azért volt szükség, mert az indol és az indolauxinok az oxidáló keverékkel a kolorimetriás értékelést zavaró vörös színt adnak, ami egy órás főzéssel sem tűntethető el. Az éteres extraktumot egyesítettem, bepároltam, majd kromatografáltam és kvalitatíve értékeltem. Az indol és szerin kondenzációs reakciója folytán keletkezett triptofán mérésére nem tartottam kielégítőnek a ROTH módszert, ezért papírkromatografiás vizsgálatokkal is kiegészítettem. Miután az élesztők feltehetően jelentős mennyiséget beépítenek a szintetizálódott triptofánból saját fehérje rendszerükbe is, szükségesnek mutatkozott a beépült aminosavak meghatározása is.

a/ A fermentlé szabad aminosav meghatározása a következő:

A 20 ml fermentlevet 6000 ford/perc mellett ülepi-

tettem és a szupernatans lebontása után az élesztősejteket 2x20 ml deszt.vizzel újból centrifugáltam. Végül 60 %-os meleg etanollal nuccson átmostam. A szupernatant és a mosófolyadékok egyesítése után a fehérjéket abs. alkohollal kicsaptam. A zsírok eltávolítása céljából a fermentlevet felemennyiségű széntetrakloriddal 4 részletben kiráztam. A széntetrakloridos átrázás után a választótölcsérben három fázis különült el, felül a fehérje- és zsírmontes fázis a szabad aminosavakkal, ez alatt a kicsapódott fehérjék különülnek el, míg az alsó fázisban a fermentlé széntetrakloridban oldott zsirkomponensei találhatók. A vizes fázist G3-as szűrőn átszűrtem, majd vakuumban 2 ml-re koncentráltam. Ebből 0,5 ml-t butanol-ecetsav-víz (4:1:1 arányú) szolvensben felszálló módszerrel futtattam. A kromatogramot ninhidrinreageneszel hívtam elő.

b/ Az élesztősejtek szabad aminosav tartalmának meghatározása. Annak megállapítása céljából, hogy a szintetizált triptofán milyen arányban oszlik meg a sejtek és a fermentlé között, meg kellett határozni az élesztősejtek szabad aminosavait is.

Az a/ pont szerint vízzel és alkohollal átmosott élesztősejtek 0,5 g-nyi mennyiségét dörzscsészébe kvarchomokkal homogenizáltam, majd a homogenizátumot 5 ml abs. alkohollal kvantitativ kénecébe bemosom és jégsekénybe helyeztem. Az alkoholos homogenizátumot két nap múlva vakuumon szűrtem és 5 ml 60 %-os meleg etanollal átmostam. Az aminosavakat tartalmazó alkoholos extraktumot vakuumban 2 ml-re bepároltam, és ebből 0,1 ml-t kromatografáltam. Jelen esetben elegendő volt 0,1 ml extraktumot kromatografálni. Mivel az élesztősejtekben az aminosav tartalom magasabb mint a fermentlében, 0,1 ml-nél nagyobb mennyiség felvitele nem lett volna előnyös.

Az élesztősejtek kötött aminosavtartalmának meghatározása a következő:

0,5 g, vízzel és 60 %-os meleg etanollal átmosott élesztősejteket 100 ml-es jódszámlombikban 20 ml 20 %-os káliumhidroxiddal vízfürdőn, visszafolyós hűtő közeibeiktatásával 24 óráig hidrolizáltam. A hidrolizátumot 40 %-os perklorátsavval neutralizáltam, így a keletkező káliumperklorát az oldatból kvantitativ kicsapódik és kiszűrhető. Más sav használata esetén sok só marad az oldatban, amely a kromatografálást zavarja. A kötött

aminosavakat tartalmazó neutrálizált folyadékot 2 ml-re bepároltam és abból 0,05 ml-t kromatografáltam.

Az aminosavak kromatográfálásához Whatmann papírt és butanol:ecetsav:víz (4:1:1) szolvenst használtam. A foltokat 0,5 %-os acetonban oldott ninhidrinnel hívtam elő, melyet felhasználás előtt vízből átkristályosítottam. Az előhívott kromatogramok értékelését HAIS és PRANK módszerével (csökkenő standard mennyiségek módszere az analizálandó oldat növekvő mennyiségével szembeállítva) végeztem.

A fermentlé triptofán tartalmát a prekursorok bevitelekor, és ezt követően 24 óránként 6 alkalommal mértem. A triptofán bioszintézisét peptonos teljes tápoldatban nem tanulmányoztam, mivel a pepton nem tartalmazott kimutatható mennyiségben szerint, és így prekursor hiányában nem sokat mondott volna ez a vizsgálat.

A triptofán-szintetáz optimális pH-jának meghatározása céljából a teljes tápoldatból 0,1 n sósavval 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5 pH-ju sorozatot készítettem. A tápoldatsorozatot a triptofánt jól szintetizáló *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Schyzosaccharomyces pombe* fajokkal oltottam be. A módszer nem vezetett sikerre, mert az eltérő pH-ju tápoldatokban a szárazsúly tekintetében igen jelentős különbséget kaptam, ami feltehetően befolyásolja a triptofán-szintézist. Ezért a pH-t a megfelelő savmennyiség hozzáadásával a prekursorok bevitele után állítottam be, amikor a tenyészet már teljesen kifejlett. A különböző pH-ju tenyészetek triptofán tartalmát a negyedik napon mértem, mivel a triptofán-

termelés maximuma ekkor jelentkezett. A pH-t naponként ellenőriztem és a sterilitás fenntartása mellett az esetleges változásokat 1 %-os borkóssavval, illetőleg 10 %-os nátriumhidrokarbonáttal korrigáltam. A triptofán és az indolváz bioszintézisének kvantitatív értékelése a fermentlé vizsgálata alapján reális, mert az egyes tenyészetek szárazsúlya is - a hibahatárt figyelembe véve - azonosnak tekinthető.

4. A 6-indolilecetsav (IES) bioszintézisét vizsgáló módszer

Az IES bioszintézisének tanulmányozásához két prekursor: a triptofánt és a tirozint használtam.

5. Kísérlet: Az IES szintézise hiányos tápoldatban.

A III. tápoldat 100 ml-ben 4 g péklesztőt szuszpendáltam és meleg vízben feloldott 10 mg triptofánt, illetőleg tirozint adtam hozzá. A tenyészetet 28 C°-on inkubáltam 6 napig és a szintetizálódott IES mennyiségét naponta meghatároztam.

6. Kísérlet: Az IES szintézise teljes tápoldatokban.

Az IES bioszintézisét az I. sz. tápoldatban hasonló módon tanulmányoztam azzal a különbséggel, hogy a prekursorokat 3 napos inkubálás után vittem be olyan mennyiségben, hogy a tápoldat 100-100 ppm mennyiségben tartalmazzon. A prekursorok bevitele után az inkubációt 6 napig folytattam és naponként mértem az IES mennyiségét, majd az inkubáció befejeztével a fermentlé indolvegyületeit kromatográfiásan analizáltam.

7. Kísérlet: Az IES bioszintézise teljes peptonos tápoldatban. A II. sz. tápoldathoz nem adtam se triptofánt, se

tirozint, kontrollja a teljes tápoldat volt. Az aminosav prekurzorokat maga a pepton nagy mennyiségben tartalmazza. Az IES mennyiségét a beoltástól kezdve 12 napon át, 24 óránként mértem.

Az IES mennyiségét a beoltás előtt is mértem, mivel elképzelhető, hogy a tápoldatnak is van IES tartalma.

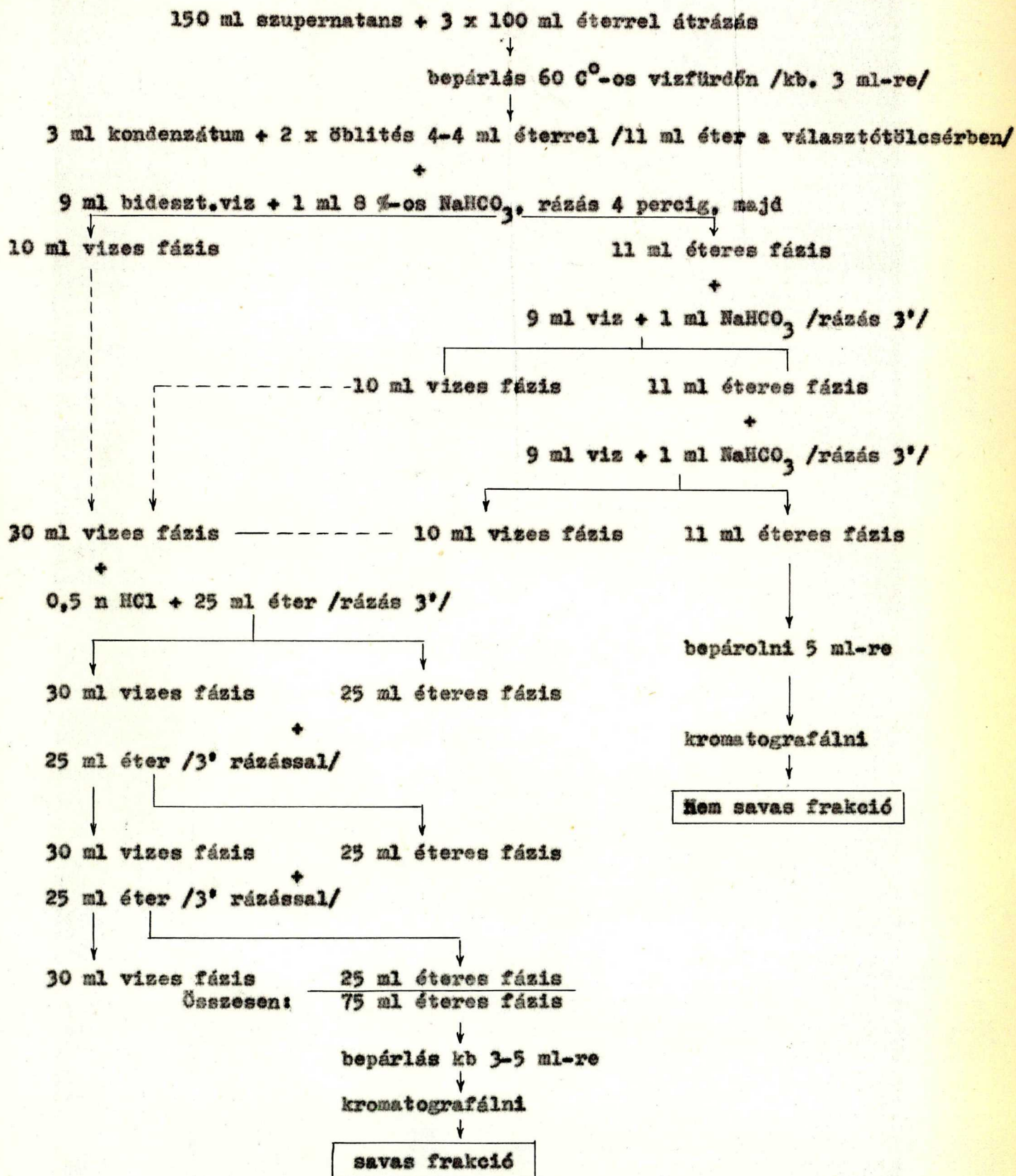
A 6. és 7. kísérleteket egyaránt intenzív rázatás mellett 28 °C-on inkubáltam. A jelzett IES vizsgálatra külön rázólabdikot állítottam be.

Az indolauxinok papírkromatográfiás kimutatásához a tápoldatot 50 ml-ét 6000 ford/perc mellett centrifugáltam, az az üledéket 2x50 ml vízzel átmostam és a szupernatansokat egyesítettem.

Az extraktum elkészítéséhez BONDE-LARSEN módszerét használtam (8. ábra) némi módosítással. A savas és nem savas frakciót közös foltra vittem fel, mert szétválasztásuk és identifikálásuk így sem okozott nehézséget.

A kromatografálását Sch-Sch 2043b papíron izopropanol-ammonia-víz, 10:1:1 szolvenssel végeztem. Az értékelése részben fluoreszcencia-analizist (analitikai UV lámpa alatt), részben kémiai módszert (Gordon-Weber reagenssel) használtam. Az azonosítás standardok egyidejű futtatásával és R_f-érték alapján történt. A foltokat kvantitativ nem értékeltem.

Az IES kolorimetrikus meghatározása: 50 ml tápoldatot 6000 ford/perc mellett centrifugáltam, majd a szupernatans leöntése után az üledéket 2x50 ml vízzel átmostam. Az egyesített szupernatant G3 szűrőn átszűrve, pH-ját 1 %-os bor-



bepárolni 5 ml-re

kromatografálni

Nem savas frakció

8. ábra: Indolauxinok extrahálása papirkromatográfiára. BONDE-LARSEN kombinált eljárása

kőssavval 4,5-re állítottam be. Az extrahálást 5x50 ml peroxidmentes éterrel (HEYN 1936) rázóüvegben végeztem és az egyesített éteres extraktumokat vízfürdőn szárazra bepároltam. A maradékot 5 ml bideszt.vizzel felvettem és 10 ml Gordon-Weber reagens hozzáadása után a jellemző színreakció kialakulása céljából 20 percig 100 °C-on tartottam. A színes oldatot 25 ml-es mérőlombikban a jelleg vízrel kiegészítettem és UVIFOT fotométeren KF szűrőállásban 546 mμ-nál fotometráltam. Tirozin prekursor adagolásakor is ugyanezzel a módszerrel dolgoztam.

Az indolauxinok elektroforetikus elválasztása. Az elválasztást ADOLF FISCHER (1954) módszerével végeztem. 30 cm hosszú és 4 cm széles (Sch-Sch 2043b) papírcsikra az analízandó (a BONDE-LARSEN extrakciós eljárással nyert) oldatból 0,1 ml-t vittem fel. A papírcsik nedvesítéséhez SØRENSEN féle foszfátpuffert használtam. Az elfo-kamrát 8 órás időtartamra 100 V feszültségnek vetettem alá. Az elektroforézis befejeztével a papírcsíkakat szobahőmérsékleten, sötétben szárítottam és Gordon-Weber reagenssel hivatam elő. Az IES feltja határozottan az anód felé vándorolt, míg a triptofán feltja (melyet aminosav extrakcióval kaptam) majdnem a felviteli helyen maradt, a triptamin pedig határozottan a katód felé vándorol.

5. A S. cerevisiae triptofán dekarboxiláz rendszerek kimutatásának és mérésének manometriás módszere

Az IES bioszintézise folyamán a triptofán — tripta-

min reakciólépésben a triptofán dekarboxilációja közben felszabaduló széndioxidot WARBURG-metódussal mértem.

50 ml 0 C⁰-os acetona szitán át pékésztőt préseltem és üvegbottal állandóan kevergettem. Üllepedés után az acetont leöntöttem. Ezt a műveletet 3x megismételtem. Vacuumszűrés után az élesztősejteket 50 ml peroxidmentes éterrel átmostam. Szárítás után a 6 g-nyi "acetonport" 50 ml 10⁻³ M-os káliumdihidrofoszfát-oldatban szuszpendáltam. A WARBURG-készülék manométer edénykéjének főterébe 2 ml szuszpenziót vittem, az oldaledénykébe 1 mg triptofánt tartalmazó 1/2 ml metanolt. A megfelelő kontroll oldaledénykéjében 1/2 ml metanol volt triptofán nélkül. A méréseket 25 C⁰-on végeztem.

6. IES hatása az élesztők endogén légzésére

Malátás táptalajon nevelt *S. cerevisiae* három napos tenyészetét steril vízben szuszpendáltam és 6000 ford/perc mellett centrifugáltam. Az üledékből (élesztősejtekből) 1 g-ot 100 ml 10⁻¹ M-os káliumdihidrofoszfát pufferben szuszpendáltam. A szuszpenzióból 2 ml-t a manométer edénybe vittem, a hengeredénybe 0,2 ml 20 %-os káliumhidroxidot, az oldaledénybe 0,2 ml deszt.vizet, illetve 10⁻³ M-os IES-t. Az oxigén fogyasztást 29 C⁰-on mértem.

7. Az IES-oxidáz kimutatása

Ammóniumkloriddal 2 C⁰-on 24 óráig autolizált 5 g élesztőt a M/60-os (6,1 pH-jú) káliumdihidrofoszfátban szusz-

pendáltam, majd 6000 ford/perc mellett centrifugáltam. A szupernatanst 25 ml-es mérőlombikba öntve pufferral jelig feltöltöttem. Az oldat enzimpreparátumként szerepelt és felhasználásig jégsekrényben tároltam. Az IES-oxidáz tanulmányozására az alábbi két reakcióelegyet készítettem; az utóbbit vakpróbaként:

3 ml enzimkivonat	és	3 ml enzimkivonat
5 ml 6,1 pH puffer		5 ml 6,1 pH puffer
2 ml 5×10^{-4} M-os IES oldat		2 ml deszt.viz

A két reakcióelegyet 35°C -on 2 órán át inkubáltam, majd mindkét elegyből kivett 5-5 ml-hez 10-10 ml Gordon-Weber reagenst adtam. E két elegyet 60 percre 40°C -os termosztátba helyeztem a színreakció kifejlesztése céljából. Ezután PULFRICH-fotométeren az extinciót S_{53} -as szűrővel olvastam le. Az IES koncentrációt hitelesítőgörbével határoztam meg.

D/ Kísérleti eredmények

1. Indol bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok

a/ Antranilsav tartalmú hiányos tápoldat kromatogramja: a pékélesztő tenyészetben. A kromatogram analitikai kvarclámpa alatt 0,40; 0,80; 0,86 és 0,95 R_f értéknél fluoreszkáló zónákat kaptam, melyeket az indol és indolilecetsav párhuzamos futtatásával, valamint Gordon-Weber reagens alkalmazásával részben sikerült azonosítani. Az R_f 0,4 indolilecetsavnak, az R_f 0,95 pedig a narancsszíneződés alapján indolnak bizonyult, míg a másik két fluoreszkáló zóna azonosítása nem sikerült.

A kontroll kromatogramján az IES foltja gyengébb színreakciót adott, mint az antranilsavas tápoldaté. A Gordon-Weber reagenssel indolreakciót nem kaptam, viszont az UV-analízis nyomokban jelenlévő indolra mutat. A 100 γ /ml antranilsav tartalmú hiányos tápoldatban szuszpendált pékélesztő 48 órás inkubáció folyamán 22 γ /ml indolt szintetizált.

b/ Antranilsav tartalmú teljes tápoldatok kromatogramja. A teljes tápoldatban nevelt tíz élesztőtörzs közül a következő három szintetizált indolt antranilsav jelenlétében.

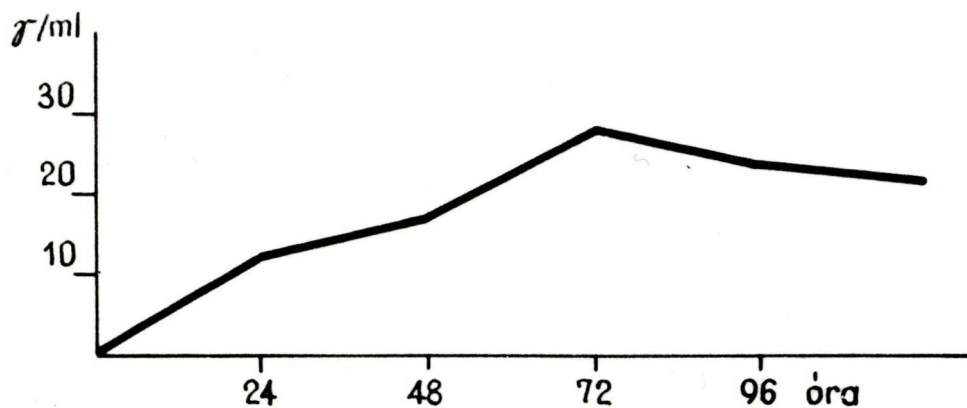
Schizosaccharomyces pombe: A kromatogramon csak az indol és IES-foltok azonosítása sikerült, míg az 0,53; 0,60; 0,80 R_f értékkel jelzett foltoké nem. Az indolszintézisét az idő függvényében a 9. ábra mutatja. Ezerint az indolgörbe a 72. órában éri el a maximumot (28 γ /ml), utána a görbe esik.

Endomycopsis fibuliger: A kromatogramon csak az indol és IES-foltok azonosítása sikerült, míg az 0,53; 0,60; 0,80 R_f értékkel jelzett foltoké nem. Az indolszintézisét az idő függvényében a 9. ábra mutatja. Ezerint az indolgörbe a 72. órában éri el a maximumot (28 γ /ml), utána a görbe esik.

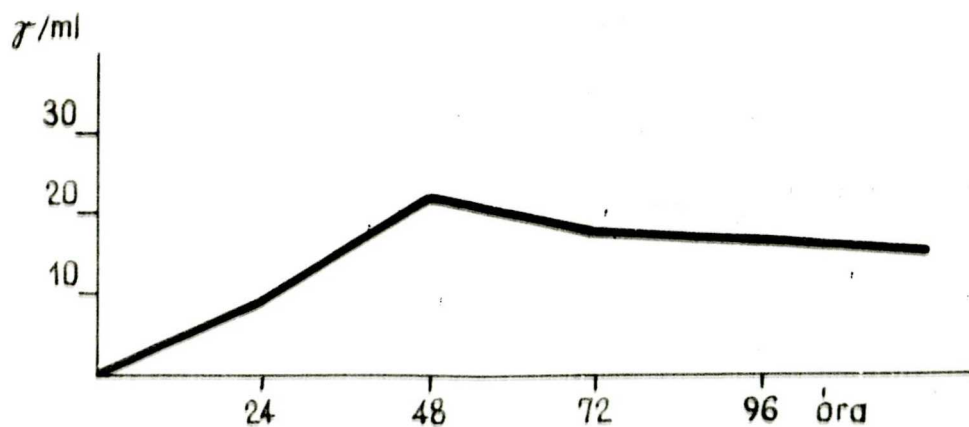
Endomycopsis fibuliger: A kromatogramon az indol és az IES volt azonosítható, míg az identifikálatlan anyagok a 0,53, illetve a 0,80 R_f értéknél helyezkedtek el. Az indol-maximum itt a 48 órában jelentkezik (10. ábra), majd mennyisége csökken. Az IES-folt színreakciója erőteljesebb mint az előbbi törzsnél.

Paratorulopsis pseudaria: A kromatogramon kimutatható az indol és az IES, valamint a 0,80; 0,86 R_f -nél két azono-

Indol bioszintézise teljes tápoldatban + 100 γ /ml antranilsav

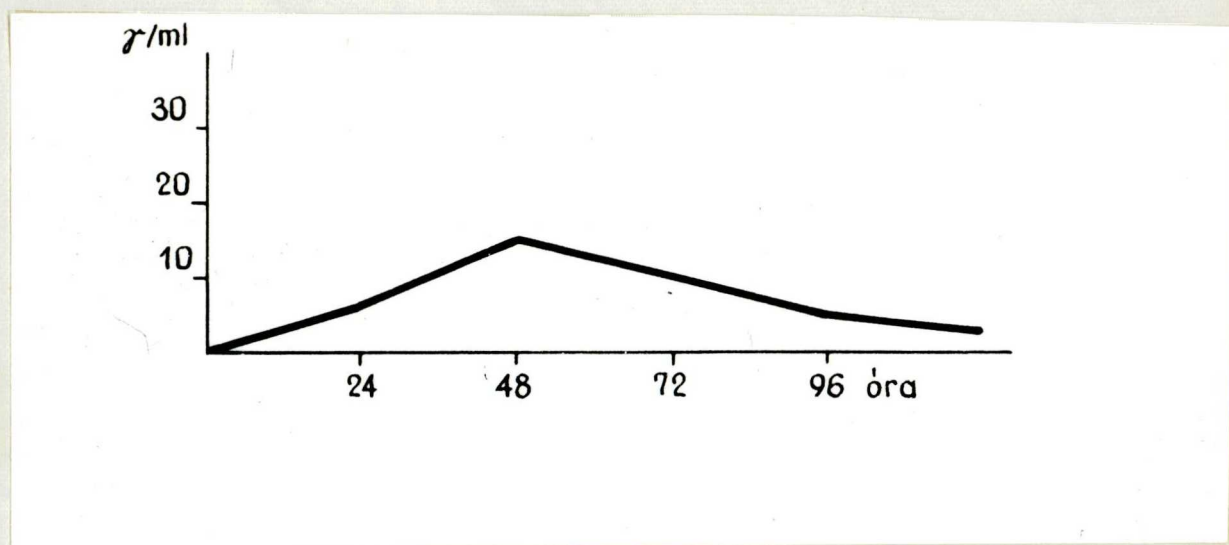


9. ábra: *Schizosaccharomyces pombe*



10. ábra: *Endomycopsis fibuliger*

sítatlan anyag. Az indol és az IES mennyisége a kromatogramon minimális, tehát vizuális értékeléssel is könnyű eldönteni, hogy a *P. pseudaria* a három törzs közül a leggyengébben szintetizál indolt antranilsavból. Az indolszintézis maximuma a 48. órában jelentkezett (15 γ /ml). A 24 órás inkubálás után színreakcióval még kimutathatatlan mennyiségben van jelen a tápoldatban az indol, majd a 96. órában az indol mennyisége ismét a kimutatható érték alá süllyed (11. ábra).



11. ábra: *Paratorulopsis pseudaria*

2. A TTP bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok

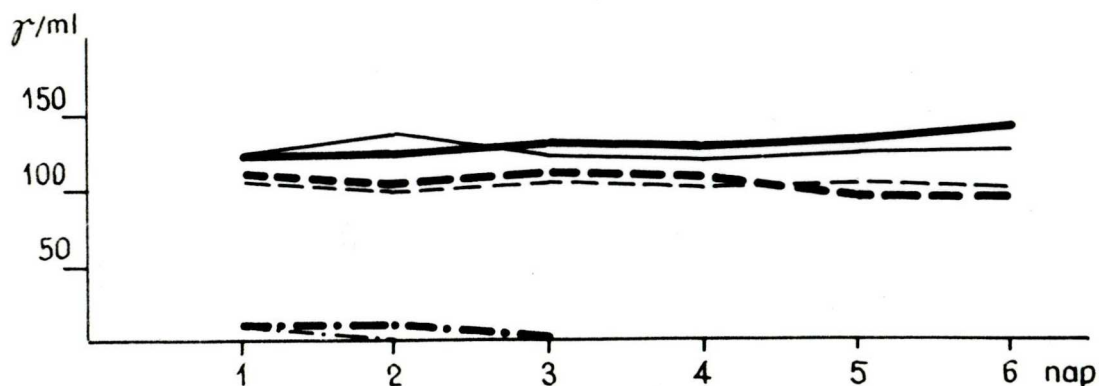
A kísérleti eredmények alapján az élesztőtörzsek kötött-, szabad- és össz-triptofán tartalmának változását grafikusan ábrázoltam TTP prekursorok jelenlétében és a nélkül.

A kötött-, szabad- és össztriptofán mennyiségének változása teljes tápoldatban, amelyhez prekursoronként 210 γ /ml indolt és 70 γ /ml dl szerint adtam. Az alábbi értékeket mutatta (12-21. ábrák).

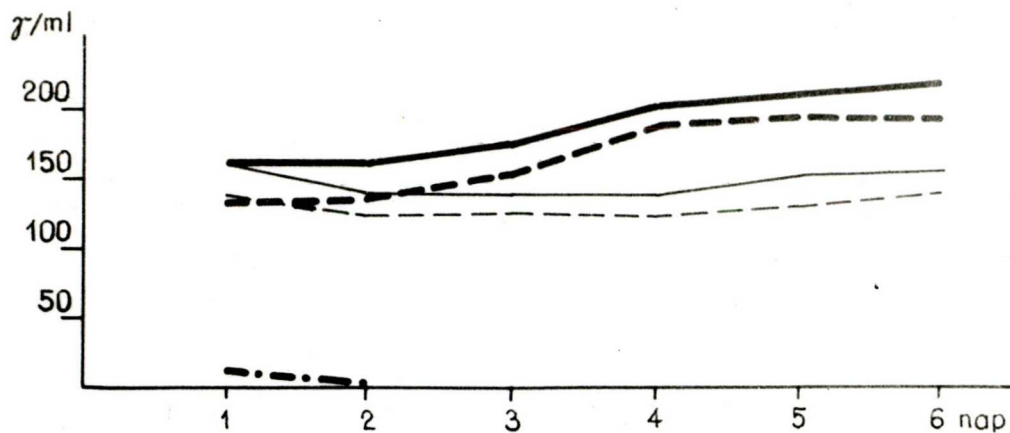
Jelmagyarázata:

- össz. tript. prekursorok jelenlétében
- - - - - kötött tript. prekursorok jelenlétében
- - szabad tript. prekursorok jelenlétében
- össz. tript. prekursorok nélkül
- - - - - kötött tript. prekursorok nélkül
- - szabad tript. prekursorok nélkül

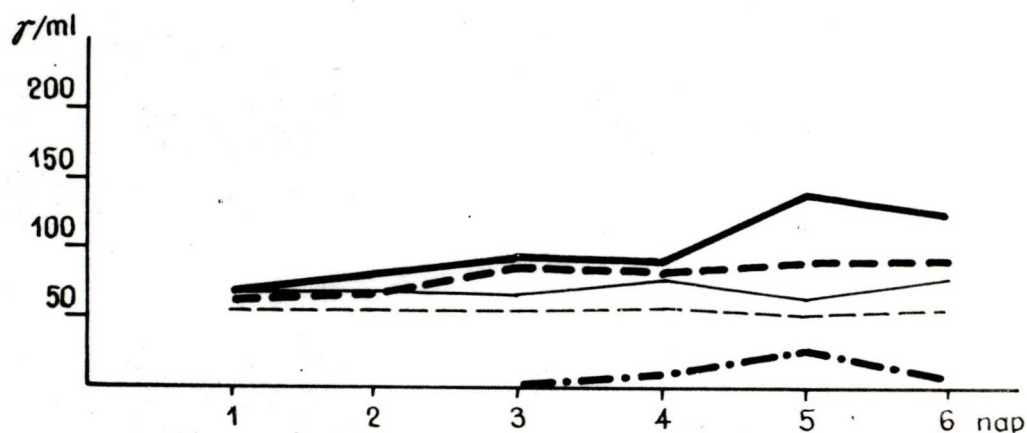
A jelmagyarázat valamennyi (12-21) ábrára vonatkozik.



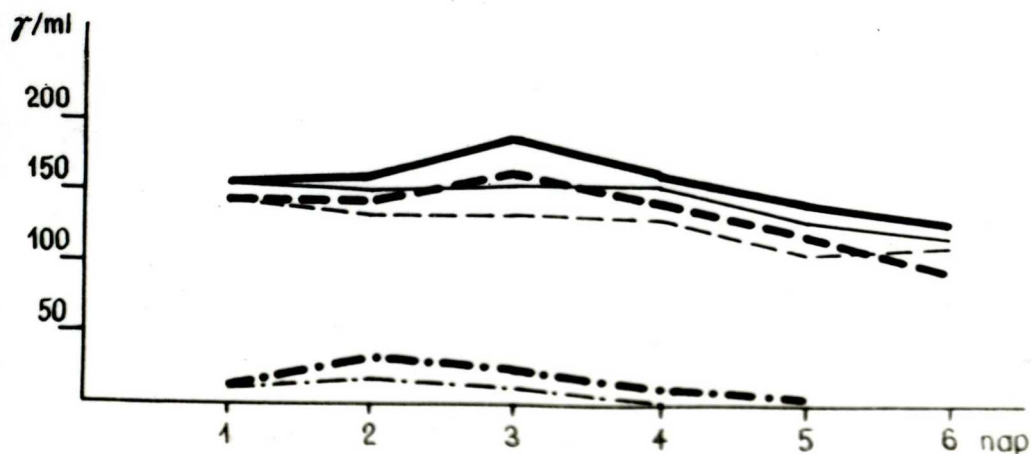
12. ábra: *Candida utilis*



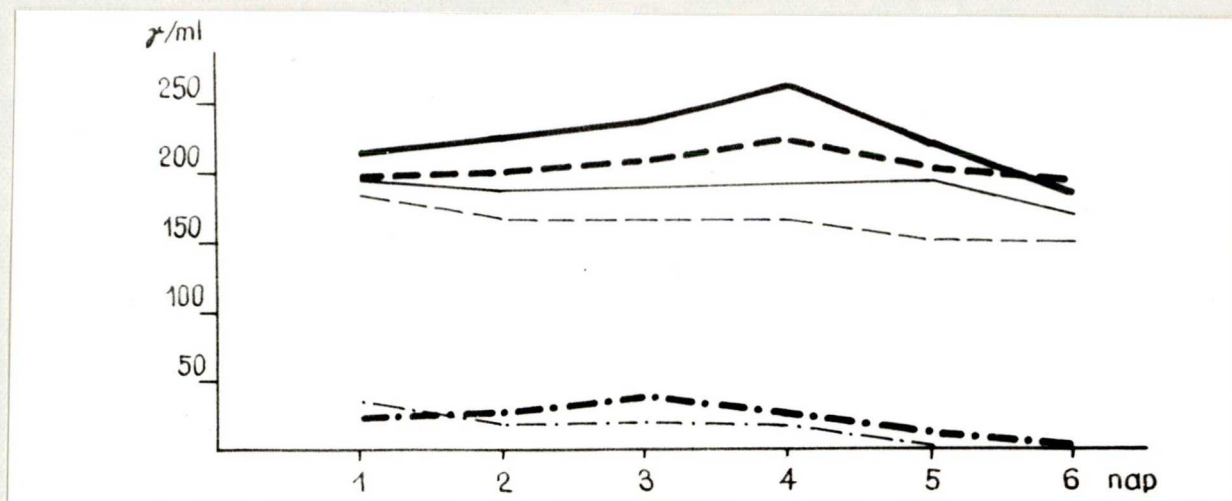
13. ábra: *Endomycopsis fibuliger*



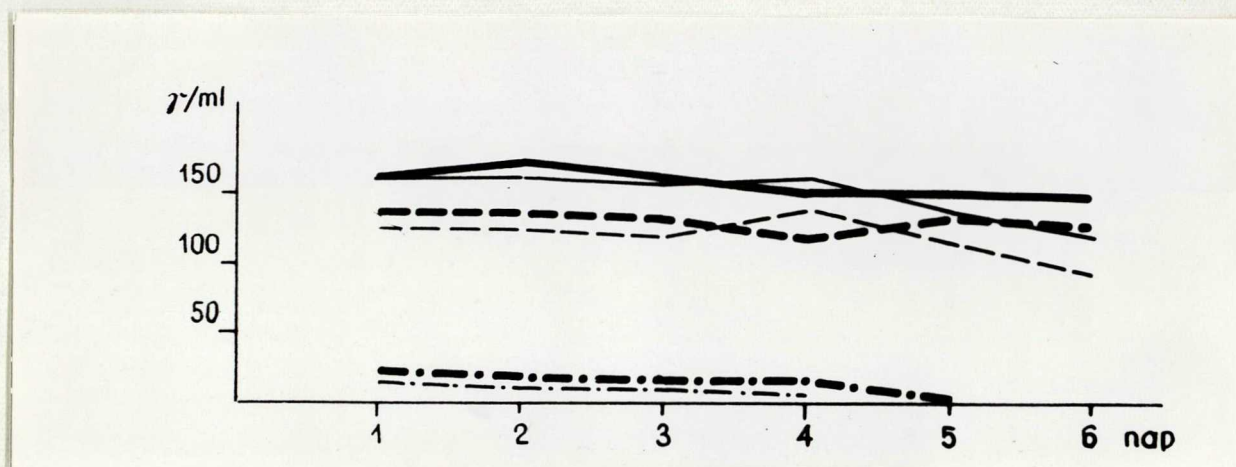
14. ábra: *Fabospóra fragilis*



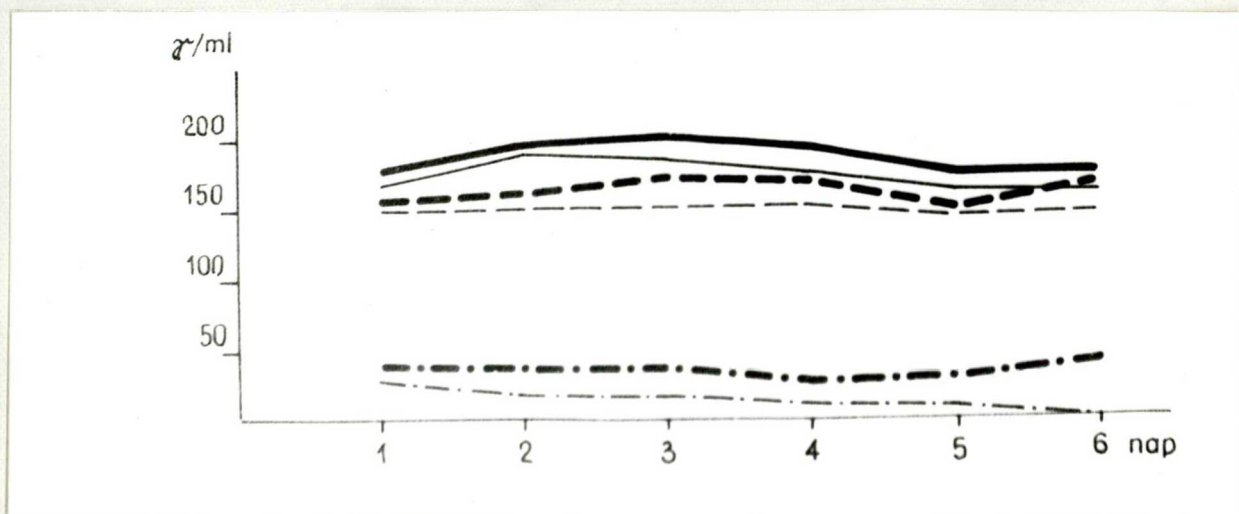
15. ábra: *Geotrichum candidum*



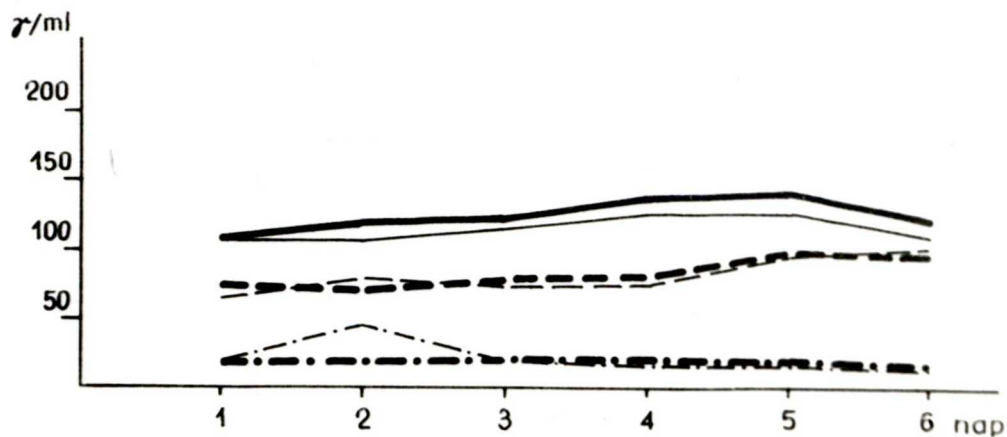
16. ábra: *Hansenula anomala*



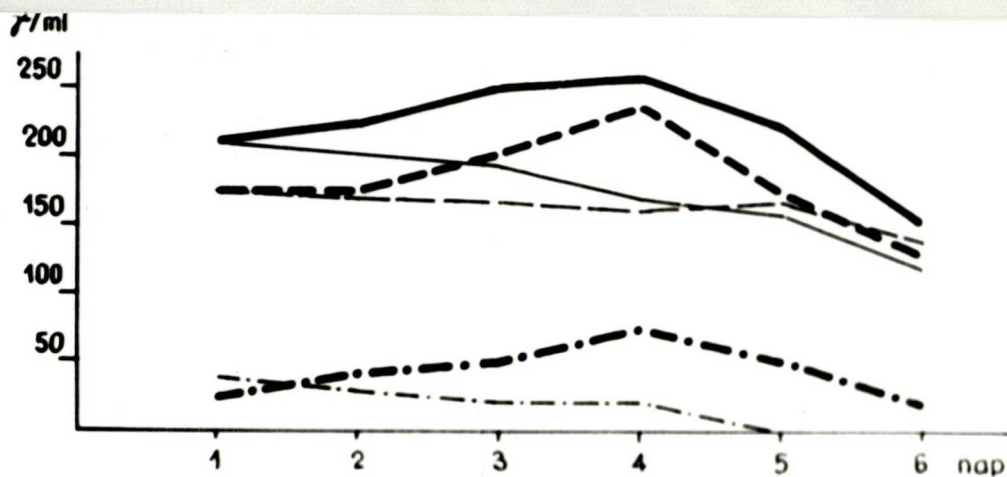
17. ábra: *Kloeckera apiculata*



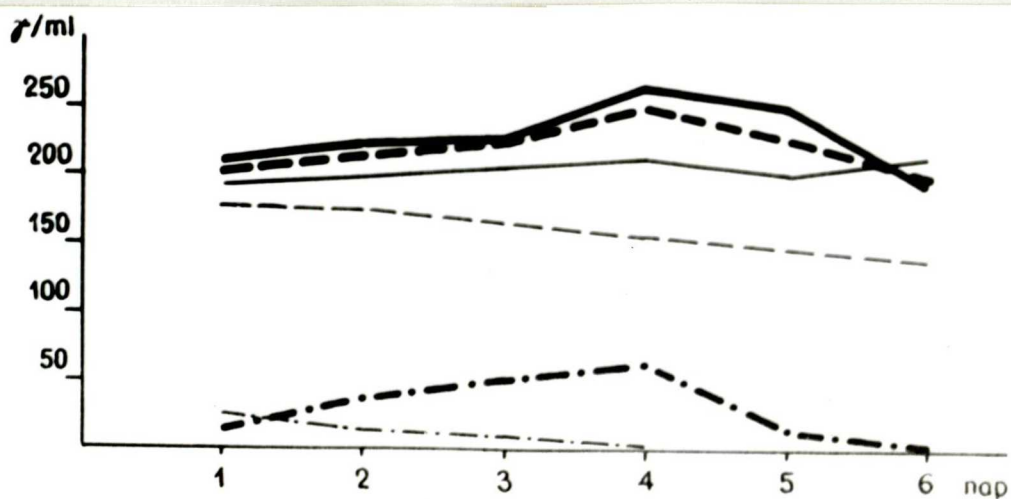
18. ábra: *Parathorulopsis pseudaria*



19. ábra: *Rhodotorula rubra*



20. ábra: *Saccharomyces cerevisiae*



21. ábra: *Schizosaccharomyces pombe*

A 12-21. ábrák alapján elmondhatjuk, hogy az élesztőtörzsek TTP-szintetizáló képessége meglehetősen szelektív. A *Fabospora*, *Geotrichum* és *Hansenula* az említett prekursorok jelenlétében az inkubációs idő alatt kiemelkedő TTP-maximumot mutat, mások pedig egy lapos görbét adnak. Az indolauxinok meghatározása céljából készített kromatogramokat kvalitatíve értékelve megállapíthatjuk, hogy a nagy mennyiségben jelenlevő indol foltján kívül, az IES foltját is megtalálhatjuk mind azon törzseknél, amelyek IES-bioszintézisre képesek (l. később). A triptamin is állandó jelleggel megjelenik a kromatogramon ott, ahol az IES foltja is megtalálható. Az R_f 0,53; 0,80; 0,86 anyagokat nem tudtam azonosítani.

Az egyes törzsek TTP-tartalmának meghatározása céljából az inkubációs idő befejezése után elvégeztem a szabad aminosavkészlet papirkromatográfiás analizisét is. A kromatogramokat csak kvalitatíve értékeltem, csupán a TTP mennyiségét vizsgáltam a HAINS és FRANC (1961) félkvantitatív módszerével és vizuális összehasonlítás alapján az alanin és a valin foltjait (l. táblázat).

Az élesztőtörzsek aminosav kromatogramjai majdnem azonos képet mutatnak. Ezeket összehasonlítva a fermentlé szabad aminosav tartalmával megállapíthatjuk, hogy a tápoldatban mindazok a szabad aminosavak megtalálhatók, de jóval kisebb mennyiségben (l. táblázat).

A sejtek kötött aminosav mennyisége jóval magasabb, mint a szabad aminosavaké.

1. táblázat: A *S. cerevisiae* 96 órás tenyészetének szabad aminosavai

+ = 10 γ /ml, ++ = 20 γ /ml, +++ 30 γ /ml,
++++ = 40- γ /ml

aminosavak	a sejtek		a fermentlé
	szabad	kötött	szabad aminosav tartalma
leucin	++	++	+
fenilalanin	+	++	
valin	+++		+
metionin	++	+++	
triptofán	+	+	
tirozin	++	+++	+
prolin	+	+++	+
alanin	++++	++++	++
treonin	+	+	+
glutamin	++	+	++
glicin	+	+++	
aszparaginsav	++	+++	+
hisztidin	++	+++	+
glutaminsav	++	++	++
aszparagin	+	++	+
cisztein	+++	++++	++
szerin	+	++	+

Ha indol és szerin prekursorokat adagolunk a tápoldat-hoz, némi változást találunk az egyes aminosavak mennyisége közt (2. táblázat).

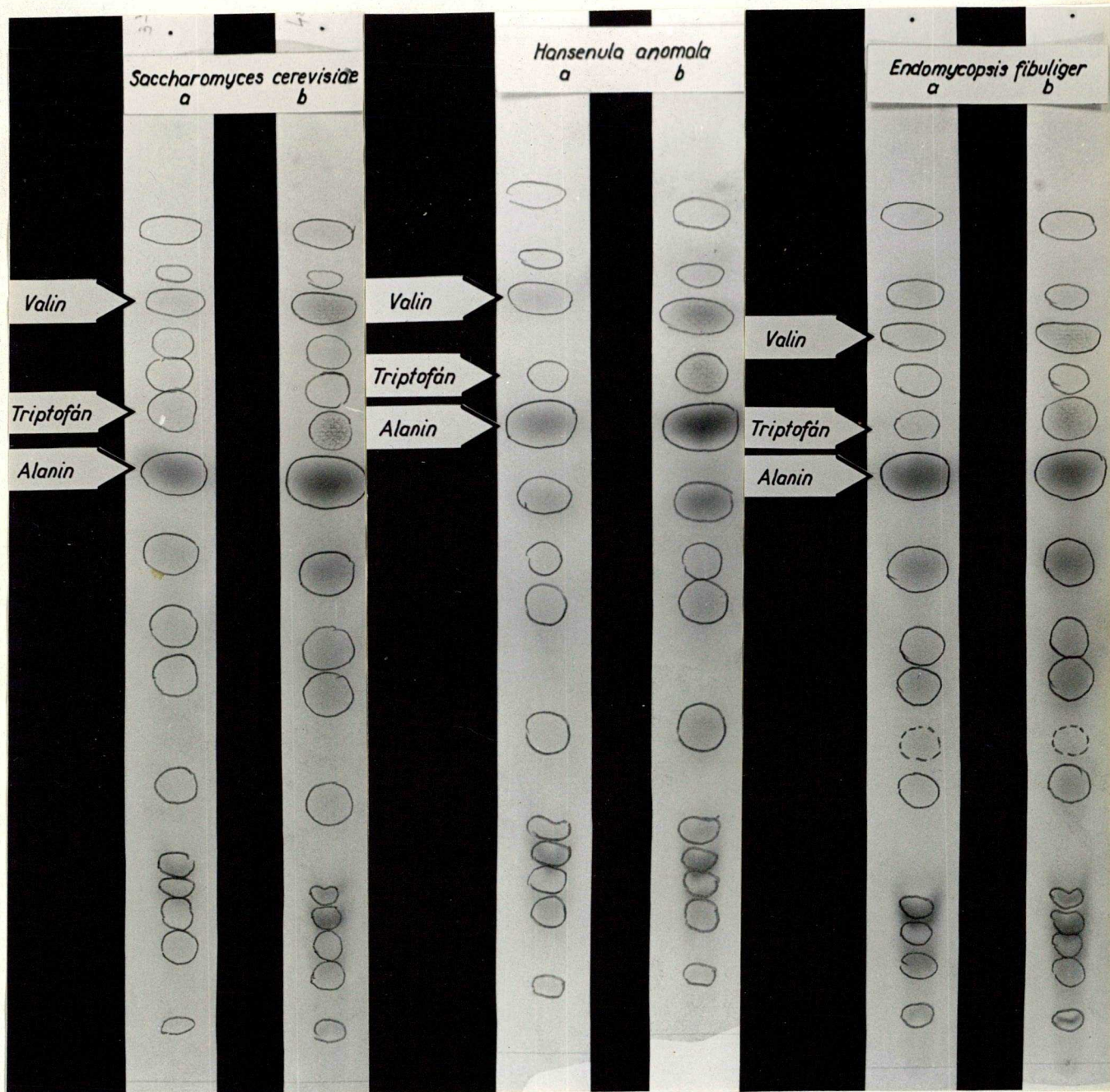
A 2. táblázat szerint az élesztősejtek szabad aminosav tartalma - a TTP, valin és alanin kivételével - nem mutat lényeges különbséget a prekursor tartalmú és a prekursor mentes tápoldatokban.

2. táblázat

aminosavak	a fermentlé szabad aminosavai	a sejt	
		szabad aminosavai	kötött aminosavak
leucin	++	++	+++
fenilalanin		+	++
valin	+++	++++	++
metionin		++	++++
triptofán	++++	+++	+++
tirozin	+	++	+++
prolin	+	+	
alanin	++++	++++	+++++
treonin	+	+	+
glutamin	++	++	+
glicin		+	+++
aszparaginsav	+	++	+++
hisztidin	+	++	++++
glutaminsav	++	++	++++
aszparaginsav	+	+	++
cisztin	++	++	+++++

A 22. ábrán látható, hogy az indolt és szerint tartalmazó tápoldat szabad aminosavai közül az alanin ($0,38 R_f$), a triptofán ($0,50 R_f$) és a valin ($0,60 R_f$) foltjai sokkal intenzívebb, mint a teljes tápoldatban nevelt élesztőtörzsek hasonló aminosavai.

Összehasonlítva a megvizsgált tíz élesztőtörzs alanin, valin és triptofán tartalmát teljes tápoldatban prekursorok jelenlétében és ezek nélkül megállapítható (3. táblázat), hogy a törzsek nagy része megemelt TTP-szint jelenlétében intenzívebb alanin- és valinszintézist mutatnak.

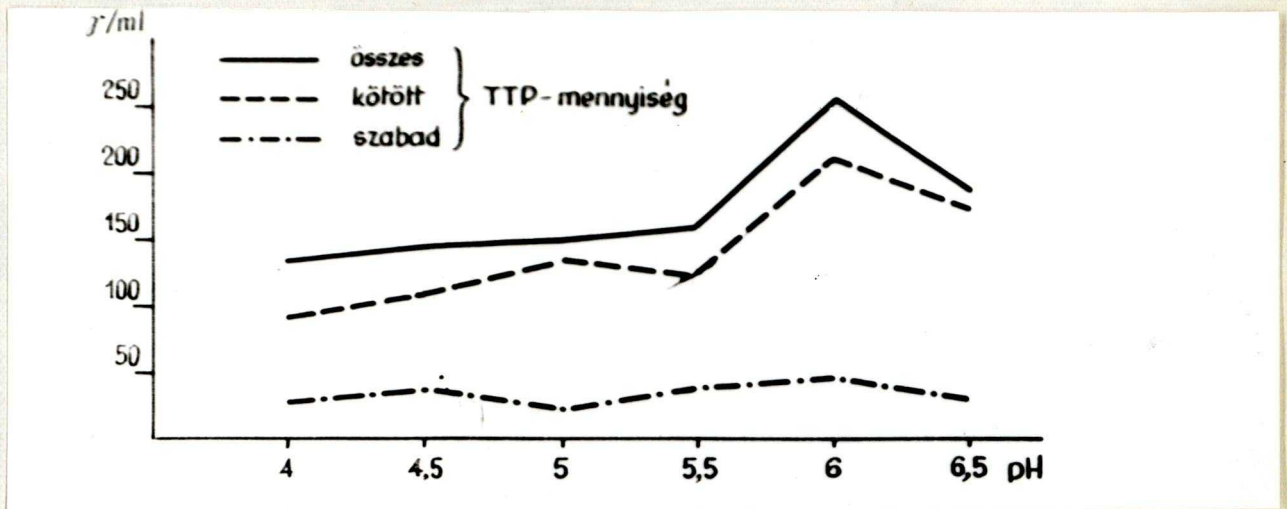


22. ábra: A *S. cerevisiae*, *H. anomala* és az *E. fibuliger* sejtjeinek szabad aminosav kromatogramja teljes tápoldatban illetve 210 γ /ml indolt és 70 γ /ml szein prekurzorok mellett 96 órás inkubáció után.
a/ teljes tápoldatban, b/ teljes tápoldat + 210 γ /ml indol + 70 γ /ml szerin

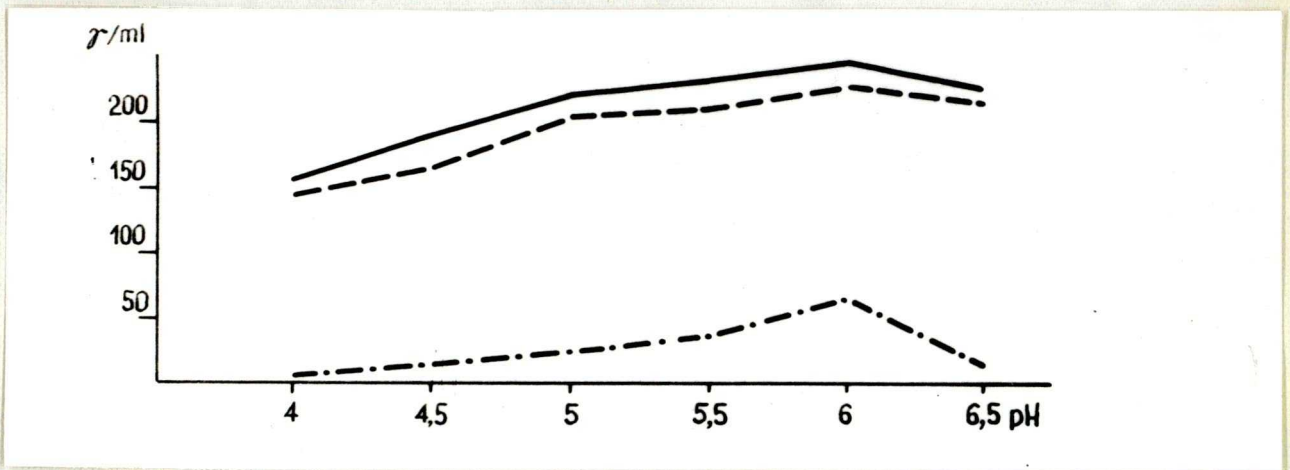
3. táblázat: Az élesztőtörzsek alanin, valin és triptofán tartalma triptofán prekursorok nélkül, (a) és prekursor jelenlétében (b), teljes tápoldatban 96 órás inkubáció után

	alanin		valin		triptofán	
	a	b	a	b	a	b
<i>C. utilis</i>	++	+++	++	++++	+	++
<i>E. fibuliger</i>	++	++++	+	+++	+	+++
<i>P. fragilis</i>	++	+++	++	++	+	++
<i>G. candidum</i>	++	++++	+	++	+	+++
<i>H. anomala</i>	++	++++	+	++++	++	++++
<i>K. apiculata</i>	++	+++	+++	+++	++	++
<i>P. pseudaria</i>	+++	++++	++	++++	++++	++++
<i>R. rubra</i>	++	++	+	+++	+	++
<i>S. cerevisiae</i>	++	++++	++	++++	++	+++
<i>S. pombe</i>	++	+++	+	+++	++	+++

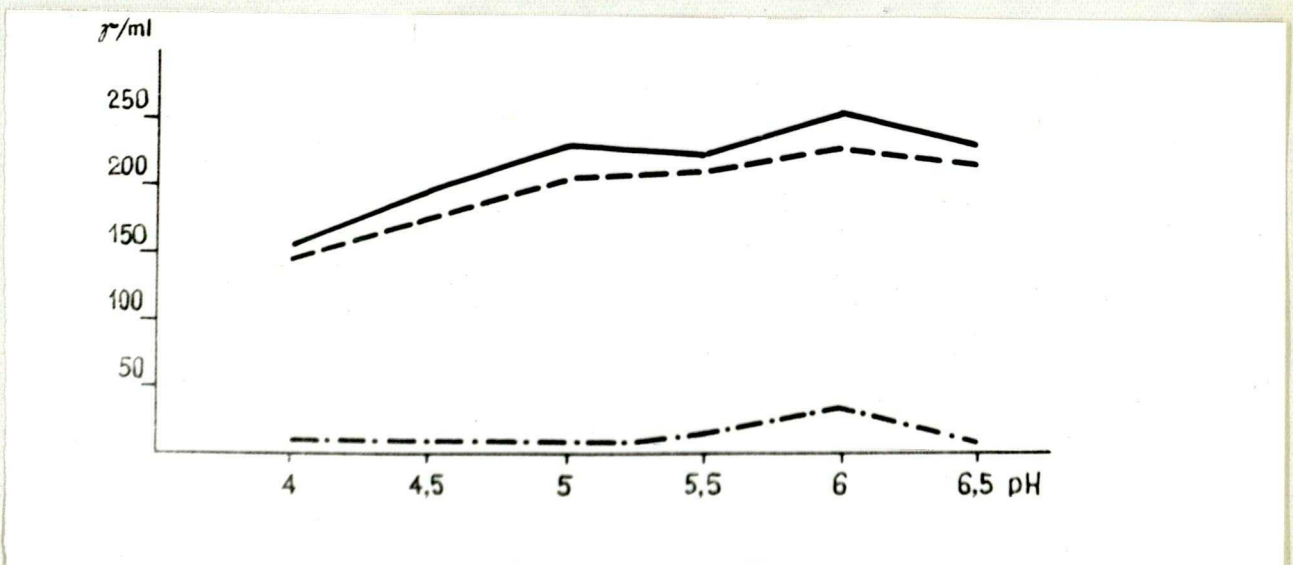
Egyes élesztőtörzsek TTP-szintézise maximumának ismeretében vizsgálat tárgyává lehetett tenni, hogy mi az optimális pH-ja a TTP-szintézisnek. A TTP-szintézis és az optimális pH közti összefüggést csak azon törzseknél vizsgáltam, amelyek e tekintetben kiemelkedtek. Mivel a szintézis maximuma általában az inkubáció 4. napján következett be, a különböző pH-jú tápoldatok TTP-tartalmát a prekursorok bevitelét utáni negyedik napon mértem. A TTP-szintézis optimális pH-ja a 23., 24. és a 25. ábrák alapján a 6 körüli értéknél van. A *H. anomala* (23. ábra) e tekintetben igen szűk pH határok között, a *S. cerevisiae* pedig igen széles pH értékek között szintetizálja a TTP-t, míg a *S. pombe* esetében két kis TTP-maximumot látunk pH 5 és 6-nál.



23. ábra: *Hansenula anomala*



24. ábra: *Saccharomyces cerevisiae*



25. ábra: *Schizosaccharomyces pombe*

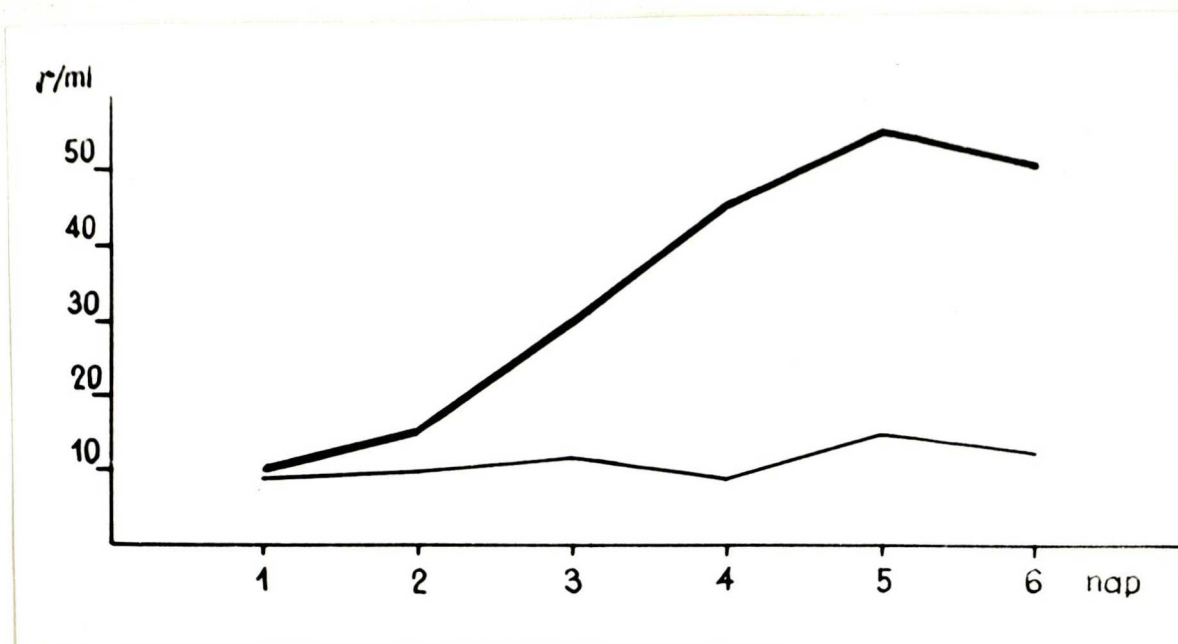
3. Az IES-bioszintézisére vonatkozó vizsgálatok

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy ha egyes gombák tápoldatához TTP-t adunk, úgy egy bizonyos inkubációs idő eltelte után a tápoldatban IES mutatható ki, a bevitt TTP mennyisége pedig csökken. Ezen vizsgálatok alapján bizonyítottnak látszik, hogy az egyszerűbb szervezettségű élőlények IES-szintézise is TTP-ből indul ki. Számos közlemény számol be arról is, hogy magasabb szervezettségű növényekben az IES és a TTP mennyisége korrelációban van egymással és a TTP prekursor jellegű vegyületnek tekinthető.

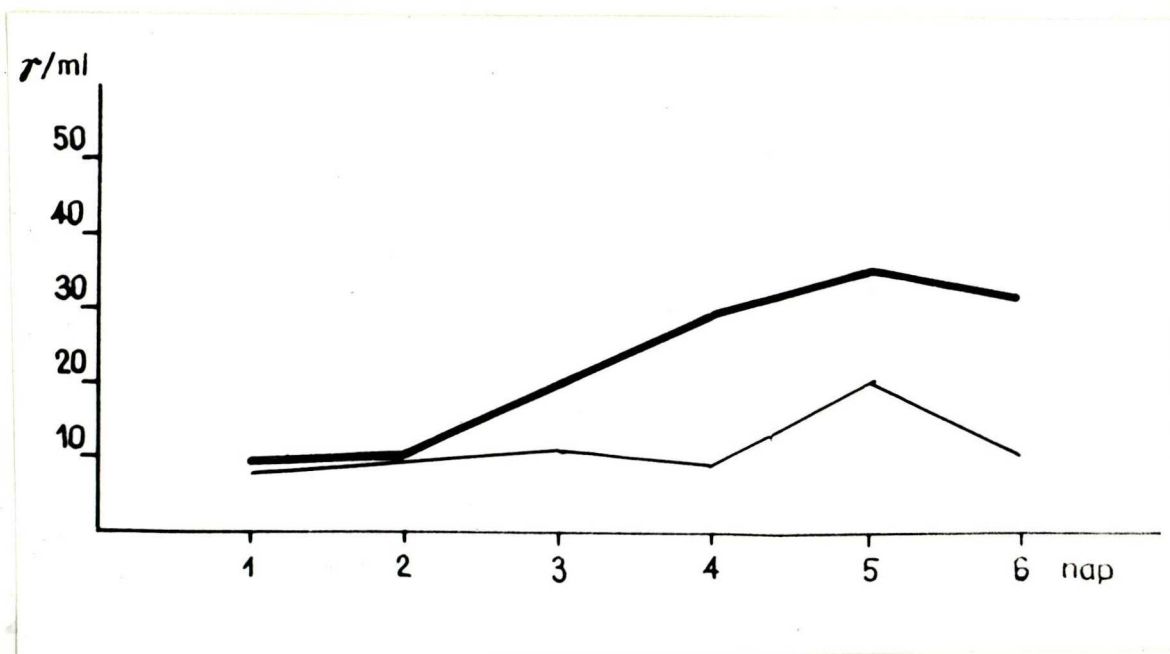
Hiányos tápoldatban szuszpendált pékélesztő éteres extraktumának kromatogramján egyéb indolvázias vegyületek mellett 0,35 R_f értéknél azonosítani lehetett az IES-at. TTP jelenlétében a kontrollhoz viszonyítva nőtt az IES produkció. Egy napos inkubálás után a tápoldatban 10 γ /ml IES volt kimutatható, ami közel azonos volt a kontroll IES-tartalmával. Az inkubálás 5. napjáig ez az érték TTP jelenlétében tovább emelkedett, majd egy (55 γ /ml) maximum után az IES-tartalom lassan csökkent. A kontroll-tenyészetben az IES-tartalom az inkubálás alatt (10-15 γ /ml) alig változik (26. ábra).

A tirozin adagolása szintén fokozza az IES-szintézist. A maximum az ötödik inkubációs napon jelentkezett és pedig 35 γ /ml mennyiségben (27. ábra).

A kontroll auxin kromatogramján is 0,35 R_f -értéknél jelentkezett az IES. Gordon-Weber-reagenssel 0,79 R_f -értéknél egy azonosíthatatlan zöldes-barna folt keletkezett. A TTP-



26. ábra: Pékélesztő IES szintézise hiányos tápoldatban 100 γ /ml triptofán jelenlétében.



27. ábra: Pékélesztő IES szintézise hiányos tápoldatban 100 γ /ml tirozin jelenlétében.

tartalmú tápoldat auxinkromatogramja a kontrollal szemben lényeges különbséget mutat. Gordon-Weber-reagenssel 0,37 R_F -nél ibolya (IES), 0,75 R_F -nél barna (triptamin), 0,90 R_F -nél ibolya színű (indol) foltokat kaptam. A 0,79 R_F -értéknél itt is megjelent a zöldes-barna azonosítatlan folt.

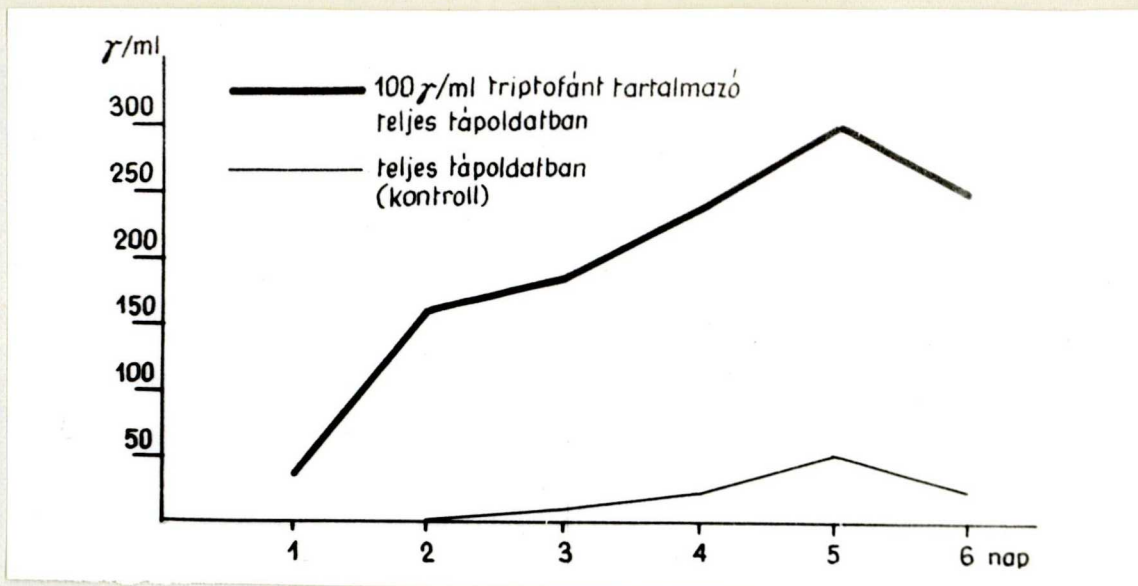
A megvizsgált tíz élesztőtörzs közül TTP-tartalmú teljes-tápoldatban hat produkált IES-at (28-33. ábra). Az IES-produkció tekintetében az élesztőtörzsek nem viselkednek egységesen. Egyeseket intenzívebb IES-szintézis jellemez, pl. a *G. candidum*, *E. fibuliger*, *Sch. pombe* tápoldatában már 24 órá inkubálás után kimutatható az IES; másoknak 48 órá inkubálás szükséges az IES kémiai mérhető mennyiségének megjelenéséhez. A TTP-tartalmú teljes tápoldatban az IES-maximum a 4-5. napon jelentkezik.

Legjelentősebb IES-produkciót az *E. fibuliger*-nél a TTP bevitele utáni ötödik napon mérhetünk, amikor is az IES-tartalom 300 γ /ml (28. ábra). Viszonylag magas IES tartalma van a *Sch. pombe*-nak, az ötödik napon 160 γ /ml-es maximummal.

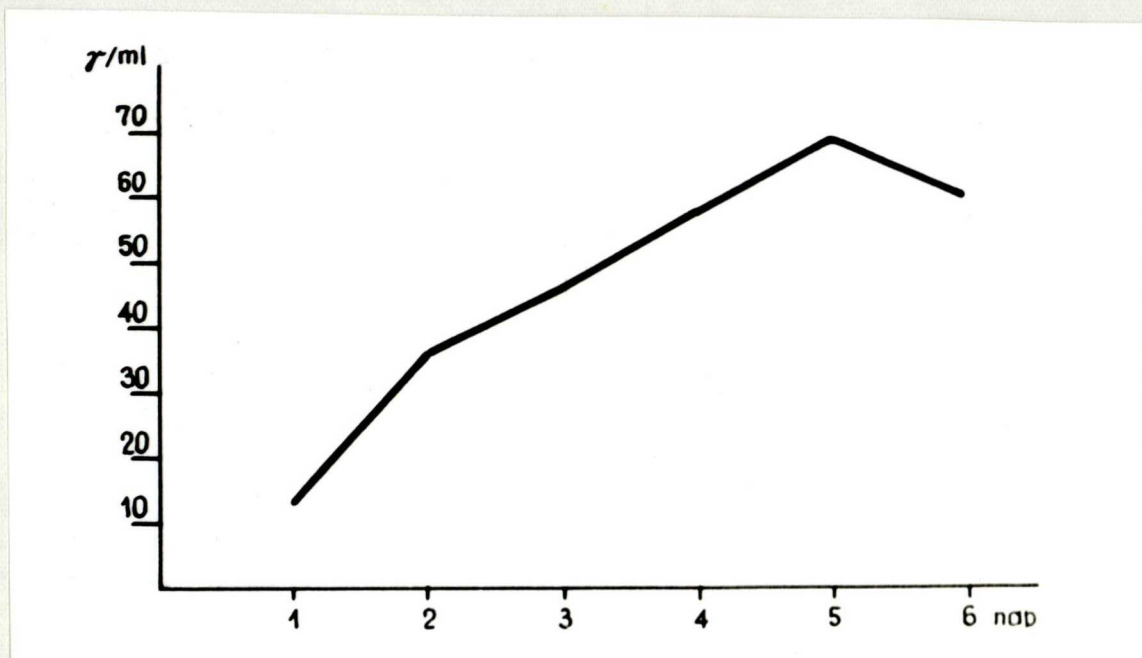
A *Hansenula anomala* és az *Endomycopsis fibuliger* a fermentlévében TTP hozzáadása nélkül is kimutatható az IES. A *H. anomala* IES-produkciója a TTP-mentes tápoldatban a maximum elérése után hosszabb ideig állandó értéken marad (31. ábra).

A vizsgálatokat pH 6-os tápoldatban nevelt élesztőtörzseken végeztem, mivel ennél a pH-értéknél mutattak az egyes élesztőtörzsek maximális IES-produkciót.

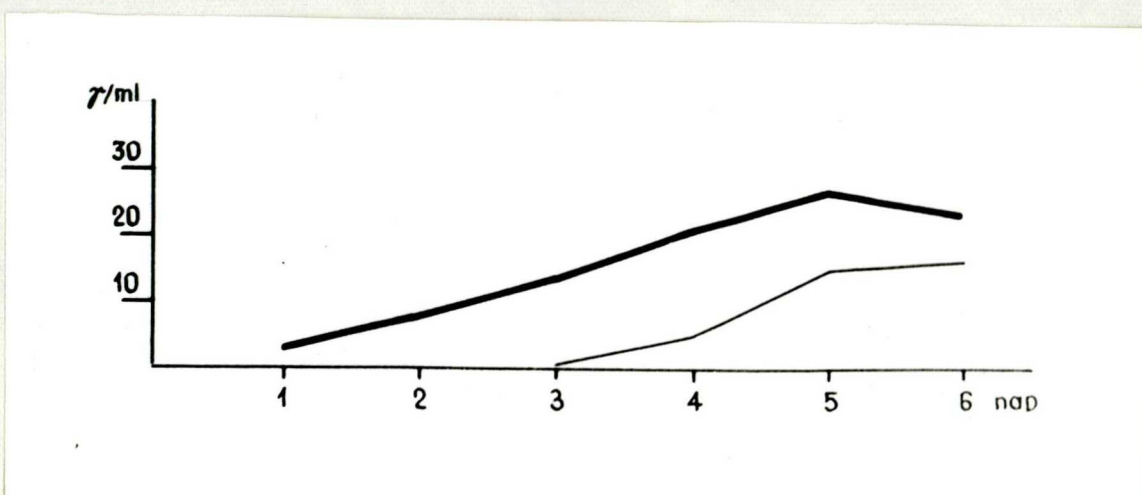
Teljes peptonos tápoldatban nevelt élesztőtörzsek IES termelését az idő függvényében a 34-39. ábrákon mutatom be.



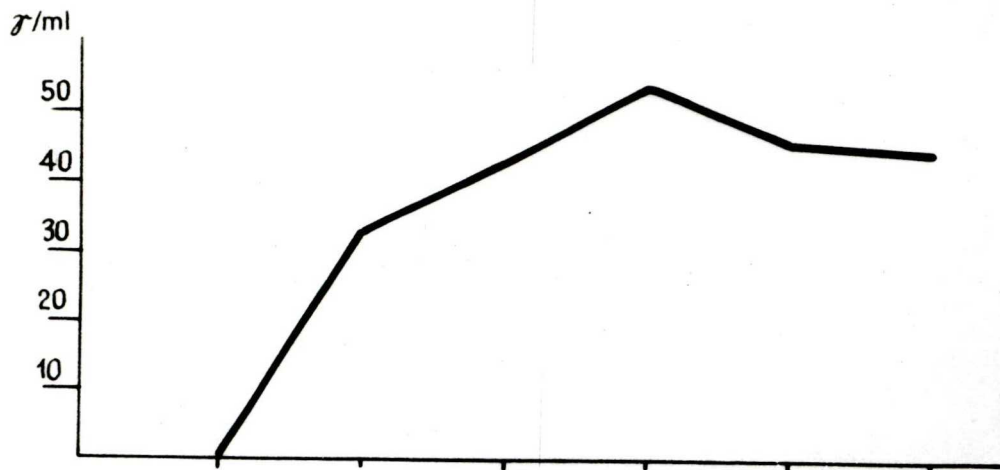
28. ábra: *Endomycopsis fibuliger*



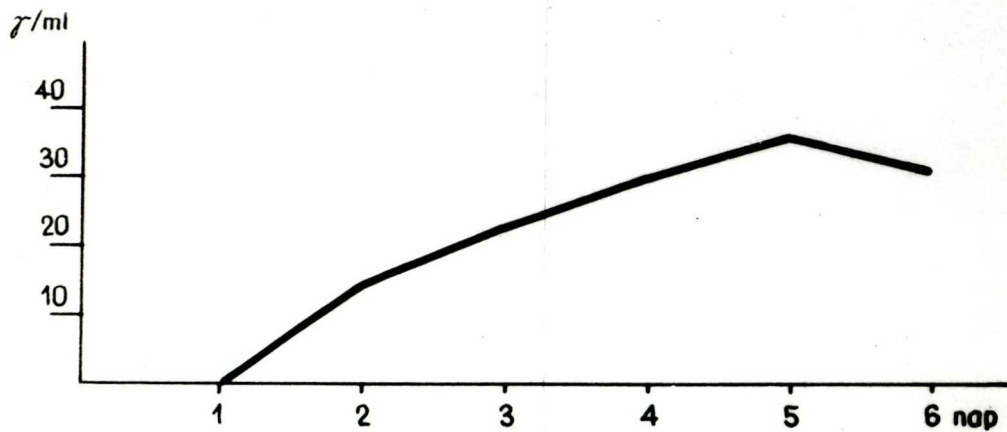
29. ábra: *Geotrinum candidum*



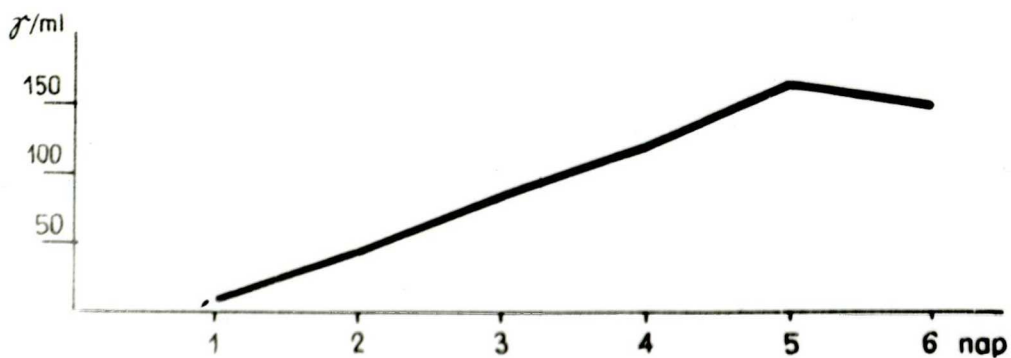
30. ábra: *Hansenula anomala*



31. ábra: *Paratorulopsis pseudaria*

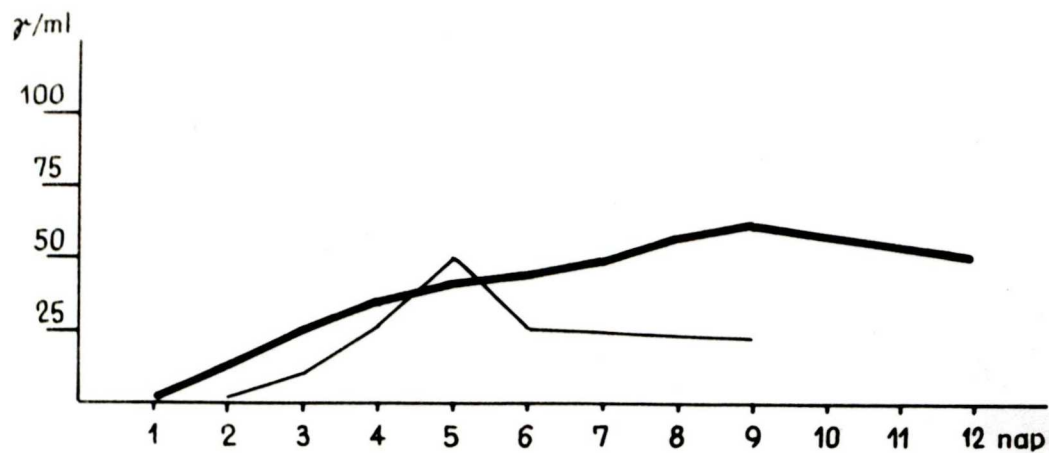


32. ábra: *Saccharomyces cerevisiae*

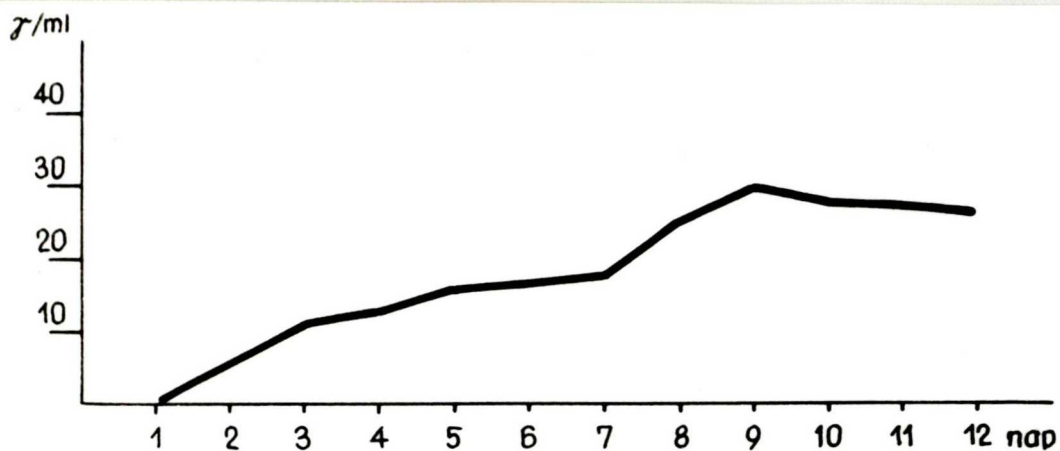


33. ábra: *Schizosaccaromyces pombe*

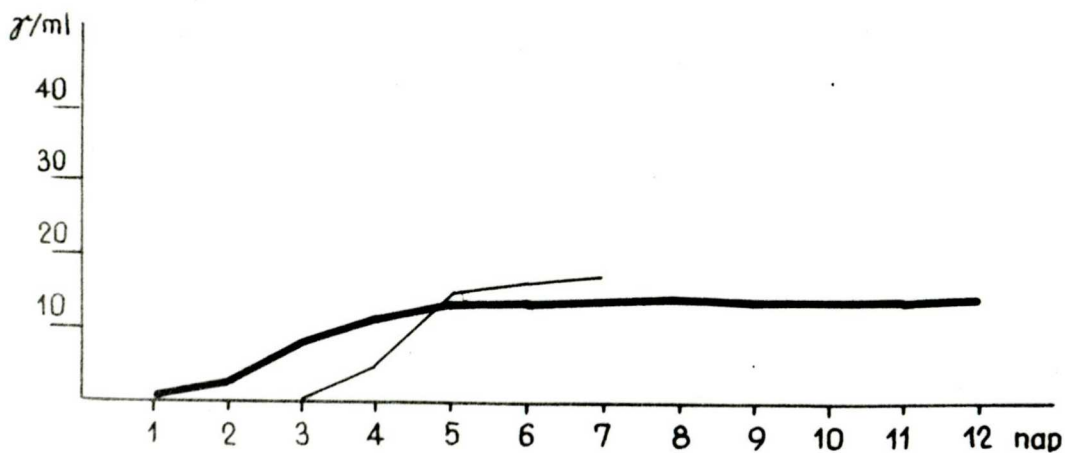




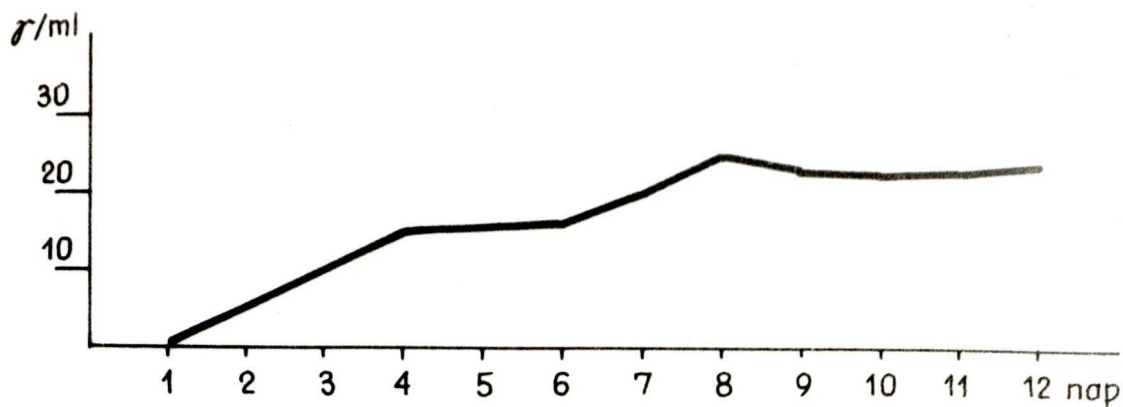
34. ábra: *Endomycopsis fibuliger*



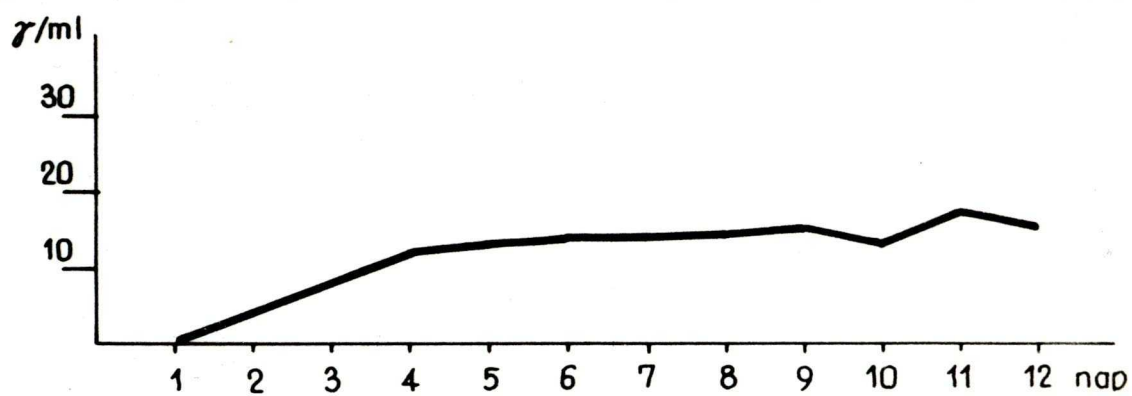
35. ábra: *Geotrichum candidum*



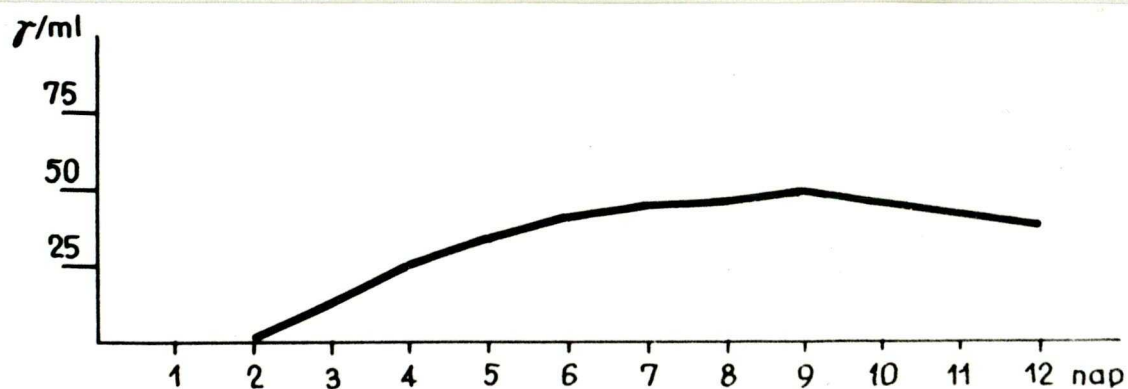
36. ábra: *Hansenula anomala*



37. ábra: *Paratorulopsis pseudaria*



38. ábra: *Saccharomyces cerevisiae*



39. ábra: *Schizosaccharomyces pombe*

Szembevetendő, hogy peptonos tápoldatban is ugyanazok a törzsek szintetizálnak IES-t, amelyek TTP jelenlétében erre képesek voltak. A peptonos teljes tápoldatban azonban kevesebb IES mutatható ki, mint TTP jelenlétében. A teljes peptonos tápoldat IES tartalmát a beoltás után 12 napon át naponta mértem. A grafikonokból látható, hogy az IES-maximumok általában a 9-10. napon következnek be. Azon törzsek esetében, melyek teljes tápoldatban TTP nélkül is képeznek IES-t az IES produkció teljes peptonos tápoldatban is hasonló értékű.

Teljes tápoldatban tirozin hatására egyes törzsek IES-szintézise intenzívebb lesz, mint a kontrollban, vagy ott is tapasztalunk IES szintézis-t, ahol tirozin nélkül nem mutatható ki (4. táblázat).

4. táblázat: Élesztőtörzsek IES szintézise teljes tápoldatban 100 γ /ml tirozin tartalom mellett, négy napos inkubáció után

A megvizsgált fajok	Teljes tápoldat + 100 γ /ml ti- rozin	Teljes tápoldat (kontroll)
	IES γ /ml	
Candida utilis	-	-
Endomycopsis fibuliger	50	40
Fabospora fragilis	-	-
Geotrichum candidum	30	-
Hansenula anomala	25	15
Kloeckera apiculata	-	-
Parthorulopsis pseudaria	35	-
Rhodotorula rubra	-	-
Saccaromyces cerevisiae	25	-
Schizosaccharomyces pombe	46	-

A 4. táblázat adataiból következik, hogy egyes élesztő törzsek számára a tirozin is lehet IES-prekurzor. Legmagasabb IES-produkciót tirozin jelenlétében az E. fibuliger és a Sch. pombe tápoldatában mértem. A szintézisre képes törzsek esetében közös vonás, hogy tirozin-prekurzor jelenlétében is azok a törzsek szintetizálnak több IES-vat, amelyek TTP jelenlétében.

Az inkubálás befejeztével készített papirkromatogramokból megállapíthatjuk, hogy valamennyi azonos foltokat tartalmaz, melyek csupán szín intenzitásukban különböznek. Azon törzsek kromatogramján, amelyek valamennyi vizsgált körülmény között szintetizálnak IES-t Gordon-Weber reagenssel a következő foltok láthatók:

- 0,37 R_F-nél ibolya-vörös folt
- 0,75 R_F-nél barna színű folt
- 0,79 R_F-nél zöldes-barna folt
- 0,90 R_F-nél ibolya folt.

Analitikai kvarclámpa alatt az említett foltokon kívül 0,54 és 0,44 R_F-értéknél intenzíven fluoresszkáló foltokat jelennek meg, de ezek Gordon-Weber-reagenssel még feldúsított állapotban sem adnak foltot. Párhuzamosok futtatásával és az R_F-értékek alapján a 0,37-nél lévő foltot IES-val, a 0,75-öt pedig triptaminnal azonosítottam.

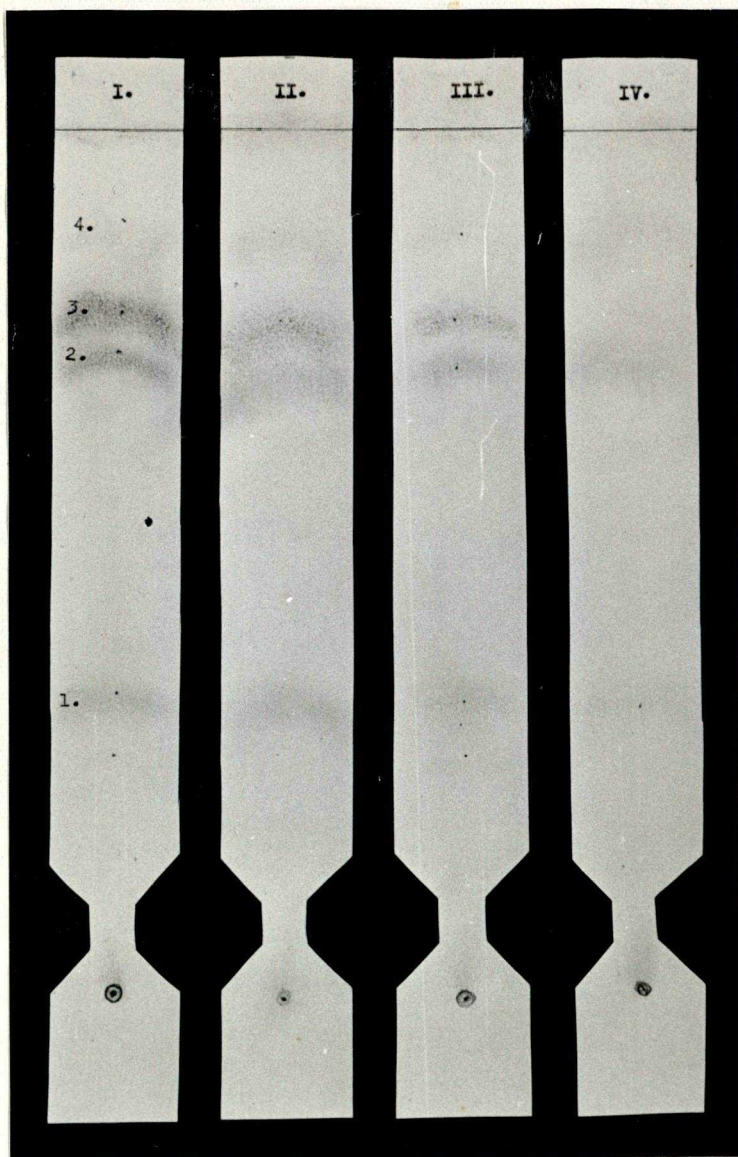
Vizuális kromatogramértékeléssel megállapíthatjuk, hogy azon törzsek kromatogramján - melyek magasabb IES szintézisre képesek - az IES és ezzel párhuzamosan a triptamin foltja is intenzívebb. A nem azonosítható foltok és az indol foltja nem mutat szabályszerű összefüggést az IES termelés-

sel. Az hosszabb inkubálás után felvett kromatogramon az indolfolt intenzivebb.

A peptonos tápoldatban nevelt törzsek kromatogramján az IES-folt természetesen kisebb, de a triptamin foltja is megtalálható, bár némely esetben csak egészen halvány barna színnel jelentkezik.

Tirozin tartalmú tápoldatban nevelt törzsek kromatogramján az IES és a triptamin foltja megtalálható, de UV lámpa alatt láthatunk egészen gyengén fluoreszkáló foltokat is. Az indolfolt értékelésével óvatosan kell eljárunk - bár az meglehetősen intenzív és határozott- mégsem lehet tudni, hogy az nem valamely indolvegyület lebontásából, avagy a tirozinból származott-e. A kérdést csak izotopos vizsgálatokkal lehet eldönteni.

A 40. ábrán az E. fibuliger indolauxin kromatogramjait mutatom be, különböző tápoldatban és prekursorok jelenlétében inkubálva. A kromatogramokon jól látható, hogy a legmagasabb IES termelés TTP jelenlétében van, de a kontroll tápoldathoz viszonyítva intenzivebb IES foltot kapunk tirozin és pepton prekursor jelenlétében is. Bár az egyes élesztőtörzsek indolvegyületeit papirkromatográfiával sikerült tökéletesen szétválasztani, mégis hasznosnak látszott az eredmények kontrollálása elfo-analízissel is (41. ábra). Az IES határozottan az anód felé, míg a triptamin a katód felé vándorolt. Az indol foltja a felvitel helyéhez közel, de az anód felé mozdult el. Az identifikálatlan foltok kis sebességgel a katód felé vándoroltak.



40. ábra: *Endomycopsis fibuliger* indolauxin kromatogramjai különböző tápoldatokban és prekursorok jelenlétében.

Jelmagyarázat: I. Teljes tápoldatban 100 γ /ml triptofán

II. Teljes tápoldatban 100 γ /ml tirozin

III. Teljes peptonos tápoldatban

IV. Teljes tápoldatban (kontroll)

1. β -indolil ecetsav, 2. triptamin

3. azonosítatlan anyag, 4. indol



41. ábra: *Endomycopsis fibuliger* indolauxin elfo-gramjai különböző tápoldatokban és prekursorok jelenlétében.

Jelmagyarázat: 1. β -indolil ecetsav, 2. indol, 3. triptamin, 4. azonosítatlan folt

4. A triptofán dekarboxilációjának vizsgálata

Az élesztőből készült acetonepor-szuszpenzió széndioxid termelését WARBURG-metódussal mértem. A metanolban oldott TTP hozzáadása után emelkedett a széndioxid mennyisége a kontrollhoz viszonyítva. Az óránkénti széndioxid termelést TTP jelenlétében és anélkül az 5. táblázat mutatja

5. táblázat:

		h 1.óra		h 2.óra	
		közép		közép	
triptofán	1.	+ 36,6	+ 33,1	+ 17,2	+ 14,8
nélkül	2.	+ 29,7		+ 12,7	
+ tript.	1.	+ 42,1	+ 50,0	+ 20,5	+ 27,2
	2.	+ 58,0		+ 34,0	

Az első órák mérések alapján:

$$\begin{aligned} &\text{levegő} \\ Q_{\text{CO}_2} &= 0,2 \text{ (25 } ^\circ\text{C-on)} \end{aligned}$$

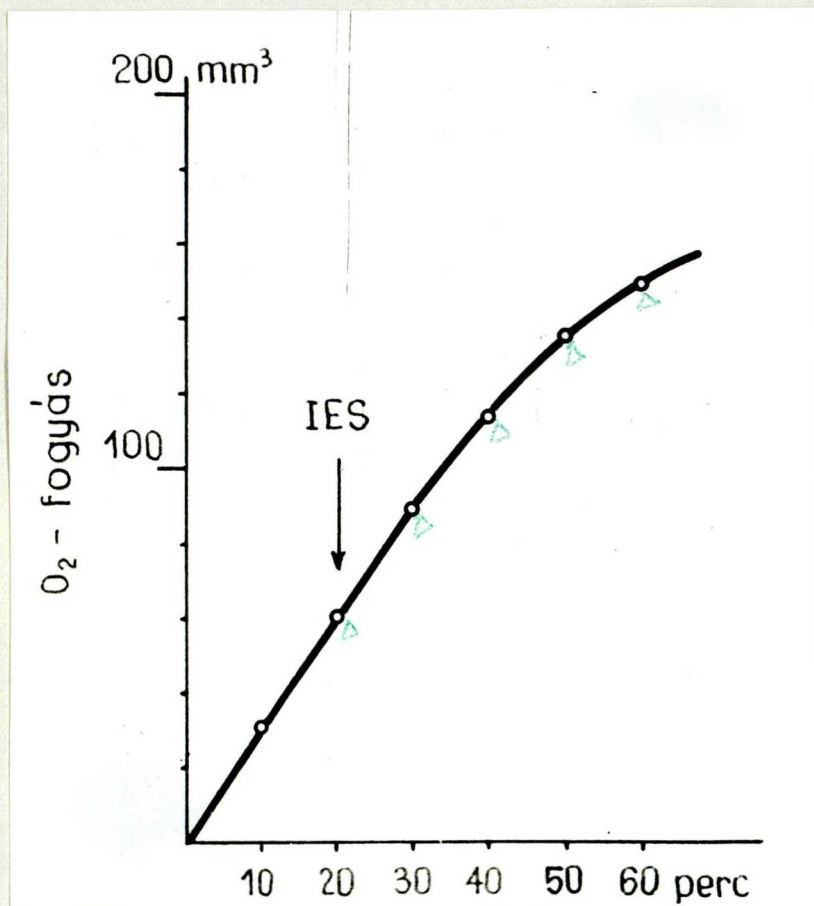
A reakció lassúságát valószínűleg a TTP rossz oldódásával magyarázhatjuk.

A manometriás mérések és a kromatográfiás eredmények összhangban vannak. A TTP dekarboxilációját a manometrikus mérések és a kromatográfikus analízisek igazolják, ami a *S. cerevisiae*-ben TTP-dekarboxiláz enzimrendszer létét bizonyítja. Az enzim jelenlétét az irodalomban eddig nem írták le és jelenlétét sem mutatták ki.

5. Az IES hatása az élesztők endogén légzésére

Négy párhuzamos mérést végeztem WARBURG készülékben. A

manométerodény főterébe bevitt IES az élesztőszuszpenzió légzésére nem volt hatással. Az IES-nak az élesztők endogén légzésére gyakorolt hatását a következő grafikonon ábrázolom (42. ábra).



42. ábra:

O = az élesztők oxigén fogyasztása

Δ = az élesztők oxigén fogyasztása az IES bevitele után

IES ↓ = IES bevitele a főterbe

A kísérlet szerint az IES, az élesztők endogén légzését nem befolyásolja. IES-oxidázt az ismertetett módszerrel nem sikerült kimutatni. A $2 \cdot 10^{-4}$ -es IES koncentráció az enzimkivonattal való két órás inkubáció után nem változott meg.

E/. Az eredmények értékelése

1. Az indol bioszintézise

Antranilsavas tápoldatban az élesztők indol produkcióját fluoreszcencia analizissel igazolni lehet, ami a kontroll tápoldatban csak nyomokban volt jelen. A Sch. pombe és E. figuliber és a P. pseudaria a teljes tápoldat 100 γ /ml antranilsav tartalmából az indol szintézisére mintegy 20 %-ot használtak fel. A legmagasabb indolszint a Sch. pombe (9. ábra) fermentlevében található (28 γ /ml), míg a legalacsonyabb érték (15 γ /ml) a P. pseudarium-nál van (11. ábra). Az indol mennyisége a maximum elérése után valamennyi esetben csökkent, amit kétféleképpen magyarázhatunk:

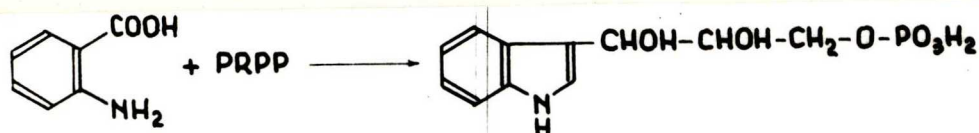
a/ Az indol kondenzációs reakcióba lép az élesztő szabad szerin tartalmával és TTP keletkezik, amelyből azután IES-at szintetizál. Ezt a feltevést az a kísérleti tény is alátámasztja, hogy az antranilsavas fermentlé éteres extraktumának kromatogramján egy igen intenzív IES folt volt azonosítható, míg az antranilsav nélküli teljes tápoldat hasonló kromatogramján csak nyomokban volt meg.

b/ A 9. ábra szerint a TTP szintézis maximuma általában a 96. órában következik be, így érthető, hogy az indol mennyisége csak 72 órás inkubáció után csökken, mivel ezután a TTP szintézis maximális.

Indolt jól szintetizáló törzsek antranilsavas tápoldatában sikerült kimutatni egy magasabb TTP szintet is. Tehát antranilsavból kiindulva az IES-ig több köztesterméket lehet azonosítani, ami arra mutat, hogy az indolvázias vegyületek

bioszintézise az élesztőkben is az antranilsavon keresztül valósul meg és az antranilsav az indolváznak közvetlen prekursora. Ezt a képességet természetesen nem lehet csupán az említett három törzse korlátozni, hiszen a megvizsgált többi törzs mindenike jelentős mértékben tartalmazott TTP-t. Így igen valószínű, hogy a másik hét törzs is meg tudja valósítani az antranilsav $\rightarrow$ indolreakciót, de a keletkező indol azonnal felhasználódik a TTP szintézisére. Mivel az alkalmazott módszerrel az indolt nem lehet kimutatni, egy közvetett módszert - nevezetesen a TTP mennyiségének mérését - kellene felhasználni. Az indol nagyobb mennyiségben az élő szervezetben nem is kumulálódhat, hiszen közismerten erős fungisztatikus hatása van. Hogy az említett három törzs táptájkájában mégis kémiai kimutatható mennyiségben jelen volt, csak úgy magyarázhatjuk, hogy az antranilsav $\rightarrow$ indolreakció főleg mennyiségű indol prekursor jelenlétében nagyobb sebességgel játszódik le, vagy pedig a TTP szintézise gátolt. Jelen esetben az indolvázak vegyületek bioszintézise egyensúlyának megbomlásáról van szó.

Az indol bioszintézisét antranilsavból NYC, MITCHELL, LEIFER és LANGHAM (1948) a *Neurospora*-ban bizonyították. YANOFISKY (1955, 1956, 1957) az *E. coli*-val tudta ezt a reakciót megvalósítani. Szerinte az antranilsav az 5-foszforibozil-1-pirofoszfáttal (PRPP) egyesül és indol-3 glicerofoszfát keletkezik.



EDDY (1955a, és 1955b) a *S. cerevisiae* néhány TTP igényes mutánsában mutatta ki az antranilsav $\longrightarrow$ indolreakciót. EDDY vizsgálatai is alátámasztották azt a feltevést, hogy az indol mennyiségének csökkenése 72 órás inkubáció után TTP szintézissel magyarázható. EDDY vizsgálatai viszont keveset mondanak az indolváz szintézise szempontjából. Vizsgálatait egy TTP igényes mutánson végezte, tehát a mutáns nem volt TTP autotrof, ami a szóban forgó reakció könnyebb tanulmányozását tette lehetővé, hiszen a keletkező indol, TTP szintézis hiányában felszaporodhatott, EDDY nem ad feleletet arra a kérdésre sem, hogy a szintetizálódott indolból mi keletkezik.

2. A triptofán bioszintézise

Teljes tápoldatban, prekursorok jelenlétében nevelt élesztőtörzsek TTP szintetizáló képességében különbségek mutatkoztak.

a/ A törzsek egyik csoportja indol és szerin tartalmú tápoldatban nevelve, közel annyi össz- és kötött-triptofánt tartalmaztak, mint prekursorok nélküli teljes tápoldatban nevelve. Ezek: a *Candia utilis*, *Kloeckera apiculata*, *Parathorulopsis pseudaria* és a *Rhodothorula rubra* törzsek. Ez a tény nem jelenti azt, hogy nem rendelkeznek triptofán-szintetáz enzimrendszerrel, csupán azt, hogy ez az enzimrendszer jóval

kisebb intenzitással szintetizálja a TTP-t mint a b/ pontban felsorolandó törzsekben. Hogy ezek a törzsek is rendelkeznek triptofán-szintetáz rendszerrel, és hogy számukra is az indol és szerin a TTP prekursor, bizonyítja a szabad TTP mennyiségi változása, prekursorok jelenlétében és anélkül. Pl. a *Candida utilis* tenyészetben a prekursorok hozzáadása utáni első napon, az indolt és szerint tartalmazó tápoldatban és a kontrollban egyaránt, 10 γ /ml TTP-t lehetett kimutatni. Az inkubálás 2. napján a kontrollban már nem volt TTP, míg prekursorok jelenlétében a TTP-szint mindig 10 γ /ml volt, végül a 3. napon már itt sem volt mérhető mennyiségben. Még szembetűnőbb a jelenség a *Pseudaria* tenyészetben, ahol a prekursorokat tartalmazó tápoldatban végig magasabb (kb. 5-16 γ /ml) a TTP-szint, mint a kontroll tápoldatban. A prekursorokat tartalmazó tápoldat még az inkubáció 6. napján is 40 γ /ml TTP-t tartalmazott. Ha tekintetbe vesszük a *P.pseudaria* intenzív IES szintetizáló képességét, még magasabb szabad TTP szinttel kell számolnunk, hiszen annak egyrésze az IES szintézisére használódott el.

A *Rh. rubra* TTP szintetizáló képessége különbözött más élesztőtörzsekétől. Össz- és kötött-triptofán tartalma közel azonos értékű az időfüggvényében - mind a prekursorokat tartalmazó és prekursor nélküli tápoldatban - viszont a szabad TTP-szint a kontroll tápoldatban a 2. inkubációs napon kulminál, (50 γ /ml, 19. ábra), majd a 4. naptól kezdve az indolt és szerint tartalmazó törzsek szabad TTP mennyiségével azonos. A prekursorokat tartalmazó tápoldatban a maximum hiányzik.

Ezt a jelenséget úgy magyarázzuk, hogy az indolra a

Rh. rubra érzékenyebb mint a többi törzs, és a triptofán-szintetáz rendszer működésében átmeneti gátlás következik be. A Rh. rubra triptofán-szintetáz rendszerének aktivitása egyébként minimális, mert prekursorok jelenlétében sem képes annyi TTP-t szintetizálni, hogy a felesleget saját fehérje rendszerébe beépítse, így kötött-triptofán mennyisége alig változik.

b/ Ebbe a csoportba azon élesztőtörzsek sorolhatók, amelyekben a prekursorok hatására nemcsak a szabad- hanem a kötött-triptofán mennyisége is megemelkedik. Triptofán-szintetáz rendszerükről elmondhatjuk, hogy intenzívebb mint az a/ csoportba sorolt törzseké. Erre mutat az a körülmény, hogy a kötött-triptofán mennyisége is megemelkedik, valószínűleg azért, mert ezek a törzsek az indolból és szerinből főlős mennyiségű triptofánt képesek szintetizálni és ennek egyrészét saját fehérje rendszerébe építi be, másik részéből pedig több életfontosságú vegyületet szintetizál. A csoport szabad-triptofán tartalma is magasabb, illetve az inkubációs idő eltelte után is kimutatható. E megállapításnak látszólag ellentmond az a tény, hogy az E. fibuliger szabad-triptofán tartalma bár az első inkubációs napon még 20 γ /ml (13. ábra), a 2. napon már nem mutatható ki, holott a kötött- és az össz-triptofán tartalom az inkubálás során lassan emelkedik. A magyarázat az E. fibuliger kiugróan legmagasabb IES szintetizáló képességében keresendő.

A szabad triptofán mennyiségét illetően a F. fragilis a többi törzstől különbözik (14. ábra). Hasonló a helyzet a S. cerevisiae és a Sch. pombe-nél azzal a különbséggel, hogy

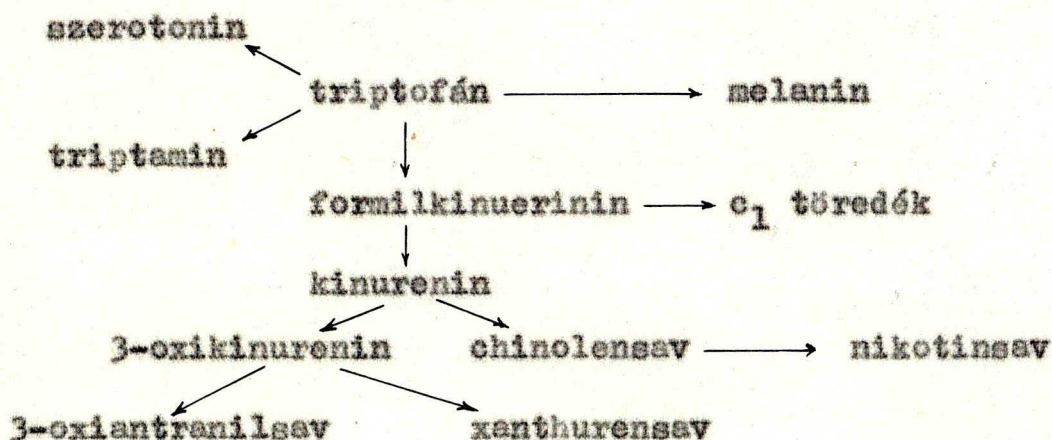
a két utóbbi törzs indol és szerin tartalmú tápoldatában már az első inkubációs nap után megjelenik a szabad-triptofán, de a maximumot csak a 4. napon lehet mérni (20. és 21. ábra). Ez az eltolódott maximumot úgy magyarázzuk, hogy az említett törzsek triptofán-szintetáz rendszere igen aktív, illetve a *Fabospora fragilis* a szintetizálódott TTP-ből keveset épít be saját fehérjerendszerébe, inkább más vegyületek szintézisére használja fel.

A megvizsgált tíz élesztőtörzsben a szabad- és kötött-triptofán tartalom 96 órás inkubáció után a következőképen alakul.

6. táblázat: Élesztőtörzsek szabad- és kötött-triptofán tartalma teljes tápoldatban. (A teljes tápoldat triptofán prekursorokat nem tartalmazott.)

	szabad tript. γ/ml	kötött tript. γ/ml	összes tript. γ/ml
<i>Candida utilis</i>	10	107	125
<i>Endomycepsis fibuliger</i>	17	140	165
<i>Fabospora fragilis</i>	10	62	75
<i>Geotrichum candidum</i>	12	144	162
<i>Hansenula anomala</i>	29	189	210
<i>Kloeckera apiculata</i>	19	140	160
<i>Parathorulopsis pseudaria</i>	40	159	180
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	27	180	210
<i>Schizosaccaromyces pombe</i>	19	210	225
<i>Rhodotorula rubra</i>	20	75	110

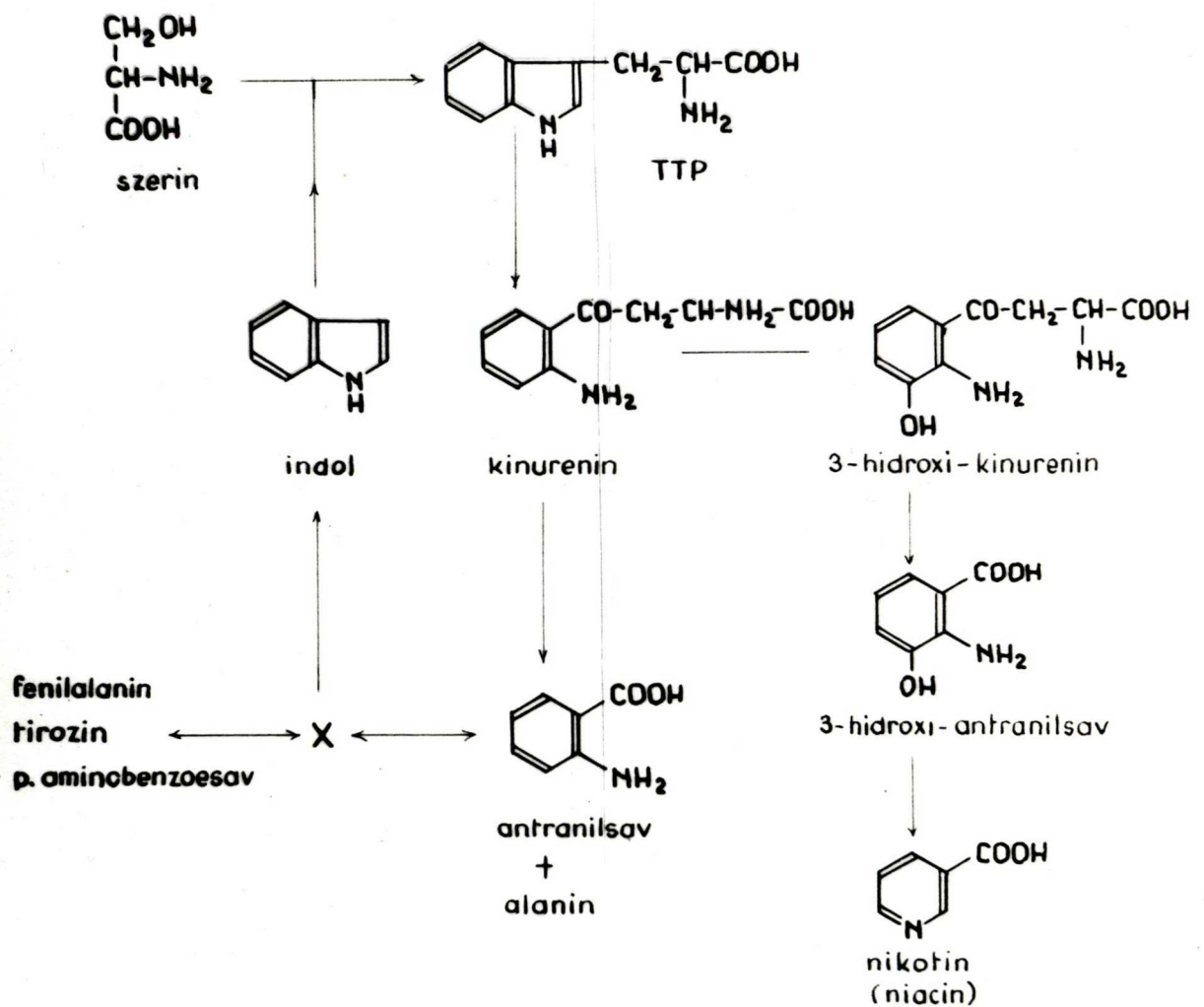
A kapott adatok értékelése meglehetősen nehéz, mivel a TTP-nak átalakulási lehetősége sokféle, amint azt az alábbi szkéma mutatja.



A triptofán-szintetáz optimális pH intervallumának megállapítására végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az pH 5,5-6,0 között van. Ez a megállapítás egyezik MADHUSUDANAN, NAIR és VAIDYANATHAN (1961) adataival, amelyek szerint a csicseri borsóban a TTP szintézis optimális pH-ja 5,5 körüli. Ezek az adatok igen valószínűvé teszik azt a gondolatot, hogy egy magasabb szervezettségű növényben és az élesztőkben közel azonos a triptofán-szintetáz rendszer pH optimuma.

A szintetizálódott TTP teljes mennyisége nem épül be az élesztők fehérje rendszerébe, hanem felhalmozódik a tápoldatban, vagy prekürzora lesz más élettanilag fontos vegyületnek. Összehasonlítva a 3. táblázat adatait azt tapasztaljuk, hogy a prekürzorok jelenlétében az alanin, valin és a triptofán mennyisége megemelkedett, és azok legnagyobb mennyisége a tápoldatban található meg.

Triptofán jelenlétében mind a 10 törzs igen sok szabad alanint és valint tartalmazott (3. táblázat). Az alanin valószínűleg a TTP-ből keletkezik. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy bőséges TTP jelenlétében egyes állati és növényi szövet-

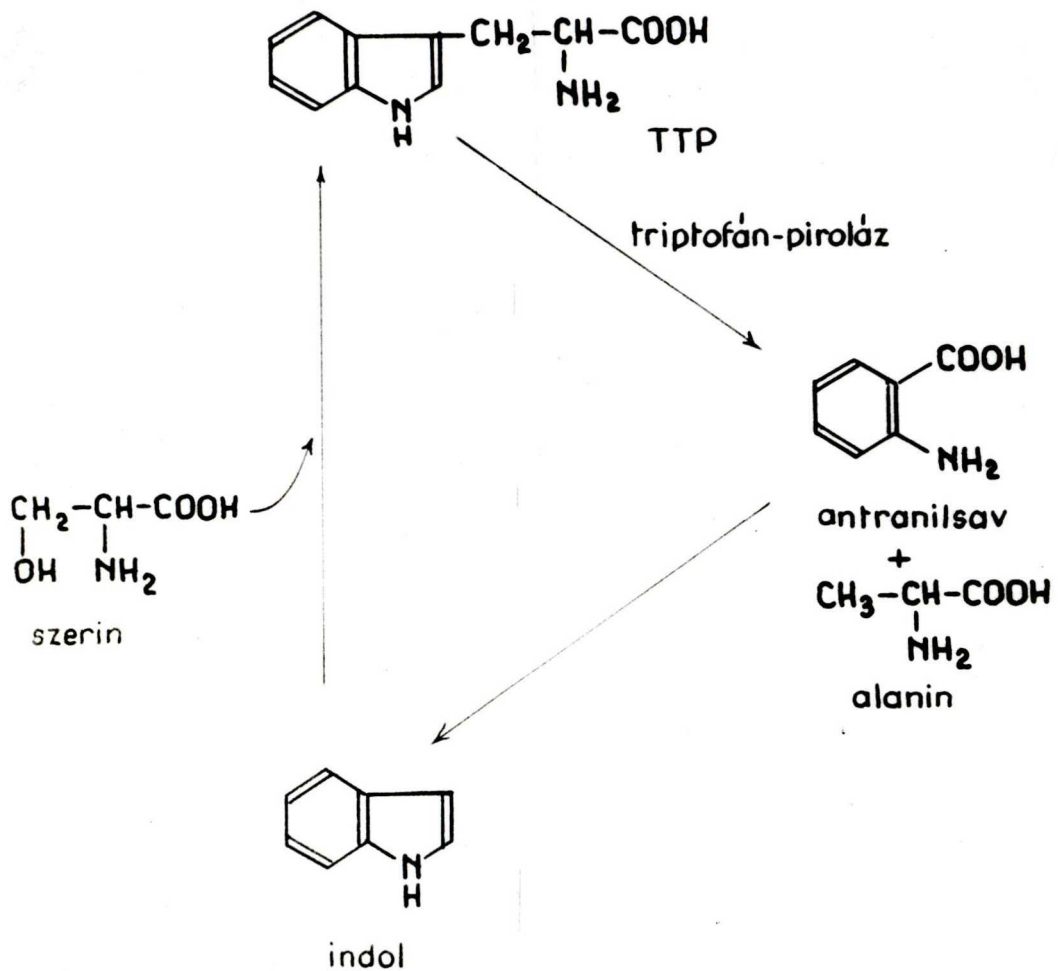


43. ábra: A triptofán szintézise és lebontása (HARRIS 1958).

tekben magasabb alanin és antranilsav tartalom mutatható ki, mint a normális TTP szint esetében. HARRIS (1958) elgondolása szerint (43. ábra) a nagyobb mennyiségű alanin keletkezésére feleletet kapunk. Tekintve, hogy az indol és szerint tartalmú tápoldatban több szabad TTP van, mint a kontroll tenyészetekben, feltehető, hogy a triptofán-piroláz enzim hatására emelkedik az alanin mennyisége is. A szkéma szerint antranilsav is keletkezik, amely a már ismert reakció útján indollá alakul, viszont az indol és a szerin TTP-ná szintetizálódik.

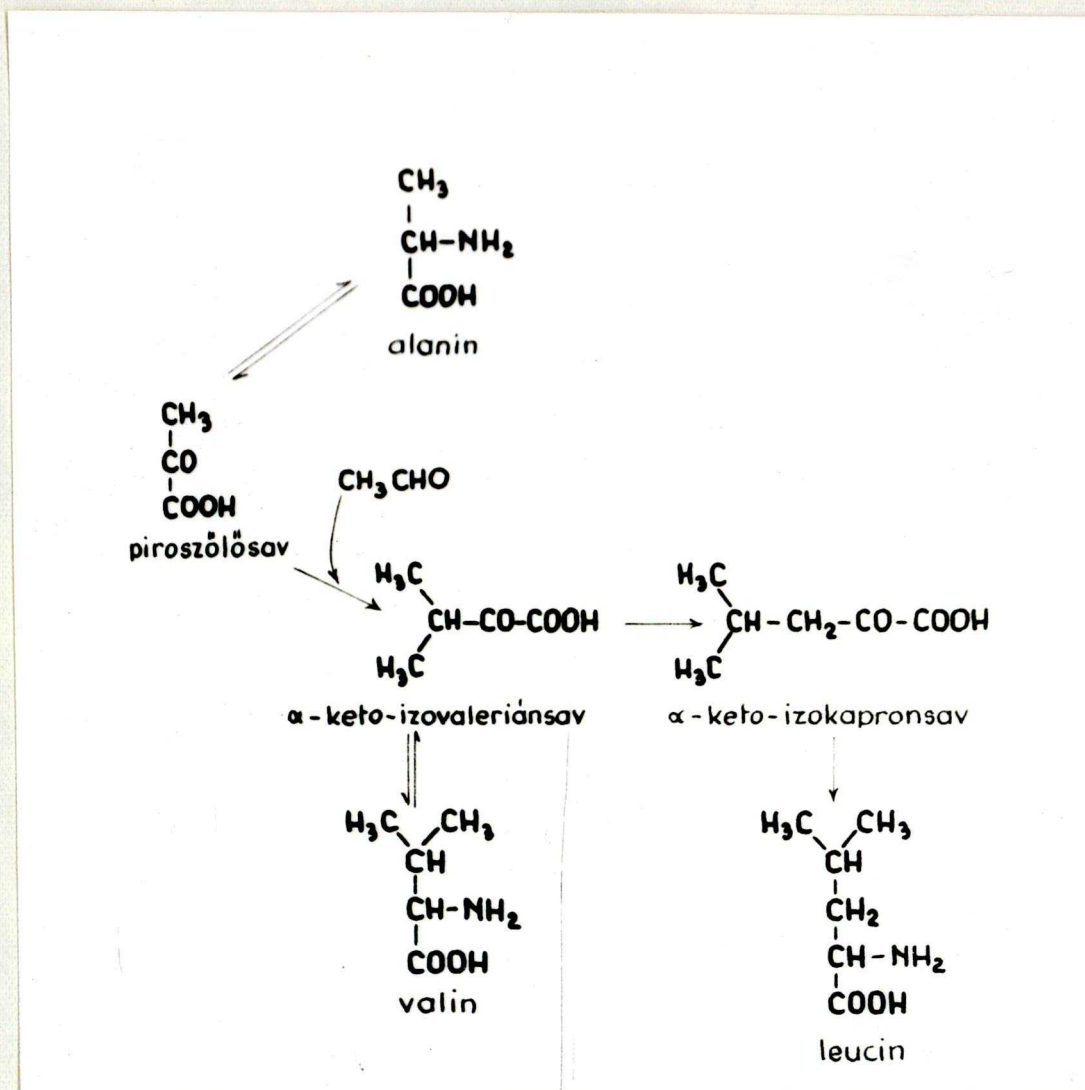
Az említett kísérleti adatokból és a HARRIS szkémájából igen valószínű, hogy a TTP szintézise és elbomlása az élesztősejtekben ciklikus, vagyis a triptofán-piroláz enzim, ha elegendő szerin van jelen a sejtben vagy a tápoldatban egy rövid cikluson keresztül ismét triptofánt szintetizál. Tehát tulajdonképpen egy szerin $\longrightarrow$ alanin átalakulásról van szó. Ezen folyamat szerint triptofán-piroláz enzim jelenlétében a TTP szint fenntartásához nem szükséges a tápoldatba fölös mennyiségű indolt bevinni, mivel az úgyis reszintetizálódik, viszont nagyobb mennyiségű szerinnel a reakciót a TTP irányába eltolhatjuk. Az inkubálás folyamán a tápoldatban a szerinkészlet fogy, az alanin mennyisége emelkedik, és mindkettő mennyisége végig korrelációban marad. A szerin $\longrightarrow$ alanin átalakulásnak az indolváz szintézist és lebontást mintegy folyamat biokatalizátornak foghatjuk fel. (43/a ábra)

A kromatogram harmadik intenzív foltját a valin képezi. A valin másodlagos reakció útján az alaninon keresztül szintetizálódik.



43/a ábra: Szerin $\longrightarrow$ alanin átalakulás.

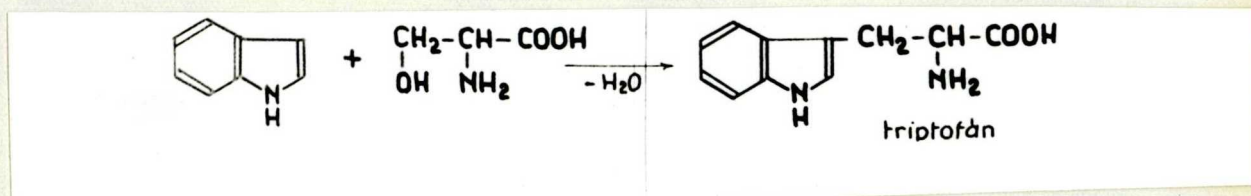
tén a TTP-ből keletkezik. A valin szintézisét alaninból HARRIS (1958) a következőképpen foglalja össze (44. ábra).



44. ábra: A valin szintézise alaninból (HARRIS 1958).

A vázlat feltételezi a nagyobb mennyiségű TTP jelenlétében az alaninon keresztüli valinképződést a prekursorokat tartalmazó élesztőtörzsek tápoldatában.

Az eredményeket összegezve megállapíthatjuk, hogy az élesztőtörzsek bár nem egyforma intenzitással, képesek az indol és szerin kondenzációs reakcióra, amely reakció maximuma pH 5,5-6,0 között van.



Ezen szintézis mechanizmusát TATUM és SEMIN (1954) izotoptechnikával igazolták. A TTP bioszintézisének ezt a formáját GUGGENHEIM (1944) a *Neurospora*-ban, WILDMANN, FERRI és BONNER (1947) *Neurospora* mutánsokban igazolták. TAYLER és SCHWARTING (1954) a *Claviceps purpurea* szubmerzus tenyészetében tudott indolból és szerinből TTP-t szintetizálni. Megállapításaik szerint rendkívül intenzív TTP szintetizáló rendszert tartalmaz az anyarozs, amelyben a prekursorok elméletileg 94%-ban TTP-ná alakultak. Ez a rendkívül erőteljes TTP szintézis főleg az ergot-alkaloidok bioszintézisénél érdekes.

3. A β -indolil ecetsav bioszintézise

Az a tény, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő pékélesztő IES-at tartalmaz, alapot ad annak feltételezéséhez, hogy az élesztők is szintetizálhatnak IES-at. Ezt a feltevést alátámasztják az élesztőkön végzett vizsgálataim is, mivel egyes

törzsek IES szintetizáló képessége TTP jelenlétében igen magas volt. E tekintetben az általam megvizsgált törzsek a következő sajátságokat mutatták.

A hiányos tápoldatban nevelt pékélesztő, amely már eredetileg is tartalmazott 10 Y/ml IES-at, TTP jelenlétében az inkubációs idő előrehaladtával gyarapítja a tápoldat IES mennyiségét. A teljes tápoldat steriltenyésztésben a *Hansenula anomala* és *Endomycopsis fibuliger* törzsek termeltek IES-at kémiai módszerekkel kimutatható mennyiségben. Ha a tápoldathoz IES prekursoraként TTP-t adtam, akkor további öt törzs tápoldatából volt kimutatható bizonyos inkubációs idő után az IES: nevezetesen a *P. pseudaria*, *H. anomala*, *C. candidum*, *E. fibuliger*, és *Sch. pombe* törzsekben. Viszont még TTP jelenlétében sem képesek IES-at szintetizálni kimutatható mennyiségben a *D. fragilis*, *Rh. rubra*, *K. apiculata*, és *C. utilis*.

A pékélesztő már IES-at tartalmaz a hiányos tápoldatban való szuszpendálás és ráztatás előtt is. Az IES-szintézis tekintetében éles határt kell vonnunk a pékélesztő (ami nagyrészt *S. cerevisiae*-t tartalmaz) és a tápoldatban sterilen tenyésztett *S. cerevisiae* között. Amennyiben a TTP tartalmú hiányos tápoldatban ráztatott pékélesztő 5 napos inkubáció után 55 Y/ml IES maximumot, a TTP tartalmú teljes tápoldatban nevelt *S. cerevisiae* 46 Y/ml-t, a peptonos tápoldatban nevelt pedig 17 Y/ml IES maximumot mutatott. Mindhárom esetben a szárazsúly a vizsgált egységenként azonos volt. Ha a teljes tápoldatban sterilen nevelt *S. cerevisiae* inkubációs idejét növelte az IES maximum elérése után is, úgy az IES mennyisége csökkent, míg a

szárazsúly emelkedett. Tehát a *S. cerevisiae* steril körülmények közötti alacsonyabb IES produktuma nem a szárazsúllyal függ össze. Ismerve viszont az élesztőgártás folyamatát, feltelezhető, hogy a pékélesztő tartalmaz olyan organizmusokat, amelyek intenzívebb IES szintézisre képesek, avagy erre serkentik a *S. cerevisiae*-t.

Teljes tápoldatban TTP jelenlétében nevelt élesztőtörzsek a termelt IES mennyiségére nézve eltérő viselkedésűek. Az *E. fibuliger* és a *Sch. pombe* az ötödik inkubációs napon 300 γ /ml, illetőleg 160 γ /ml IES-at adtak. A többi törzsnél is az ötödik napon következik el (a *P. pseudaria* kivételével) az IES maximum, azonban csak 70-25 γ /ml értékkel. Mivel az *E. fibuliger* és a *Sch. pombe* tápoldata is csak 100 γ /ml triptofán tartalmazott, az IES produkciót magyaráznunk kell. E tekintetben azonban jelenleg csak hipotéziseink vannak.

A probléma érdekességét még az is fokozza, hogy a két törzs közül az *Sch. pombe* nem termelt IES-at, a TTP nélküli teljes tápoldatban, viszont az *E. fibuliger* 35 γ /ml maximumot ad hasonló körülmények közt. Tehát ha a két törzs IES szintézisét más körülmények közt vesszük vizsgálat alá, egészen eltérő viselkedést mutatnak. Ha meggondoljuk, hogy a *Sch. pombe* a tápoldatban jelenlévő triptofánból milyen nagy mennyiségű IES tud szintetizálni, ugyanakkor az aránylag magas saját szabad TTP készletéből nem, vagy csak minimális mennyiséget, fel kell tételeznünk, hogy a kívülről bevitt TTP hatására az egyes indolgyűleteket szintetizáló és lebontó enzimrendszerek egyensúlya az IES szintézise felé tolódik el.

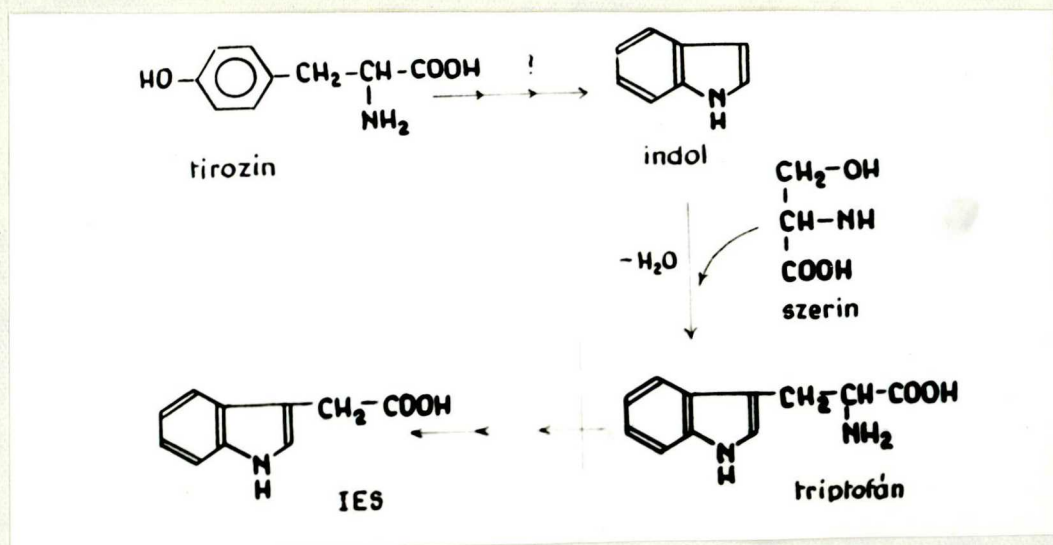
Peptonos teljes tápoldatban mindazok az élesztőtörzsek mutatnak IES szintézist, melyek TTP jelenlétében (a peptonok aminosav kromatogramján mindig megtalálhatjuk a triptofán foltját is), azonban a pepton tartalmú tápoldatban nevelt élesztők IES produkciója jóval kisebb mint TTP jelenlétében, teljes tápoldatban. Az IES maximumok nem határozottak és időben eltolódnak. A peptonban jelenlévő nagymennyiségű aminosav tehát gátolja az IES szintézisét. Ez a gátlás eredhet a peptonban jelenlévő olyan vegyületektől, amelyek az indolvázias vegyületek szintézisét más irányba tolják el.

Tirozin tartalmú teljes tápoldatban magasabb IES szintet lehet kimutatni, mint a kontroll tenyészetben, de közel sem olyan nagy mennyiséget, mint a triptofán jelenlétében. Tény az, hogy a tirozin valamilyen úton elősegíti az IES szintézist. Már 1934-ben KÜGL és KOSTERMANS leírta, hogy élesztőt különböző összetételű tápoldatban nevelve és a növekedési anyagokat Avena teszttel mérve, abban az extraktumban észlelték legnagyobb Avena növekedést, amely tirozint tartalmazott. Ők azonban a növekedési anyagot nem azonosították az indol-auxinnal. Saját vizsgálataim szerint tirozin jelenlétében az IES folt intenzívebb, mint anélkül. Tehát a KÜGL és KOSTERMANS növekedési anyag, tirozinos tápoldatban, indolauxinnal azonos.

Áttanulmányozva DAVIS (1955), POLJANOWSKI (1959) és ZOBERST ábráit, melyeken az arómas aminosavak szintéziseinek lehetséges útjai vannak feltüntetve, nem kapunk magyarázatot arra, hogy tirozin jelenlétében miért emelkedik, illetve indul meg az IES szintézise. Mindhárman megegyeznek abban, hogy

a tirozin keletkezését a prefensavból vezetik le, mégpedig irreverzibilis reakcióval. Ha ez a reakció irreverzibilis, akkor nehezen képzelhető el, hogy a tirozin mennyiségének emelésével a Z_1 intermediereken keresztül az indolvázások szintézise arányában tolódná el a reakció.

Bár a tirozinos tápoldat auxin kromatogramján egy meglehetősen intenzív indolfoltot lehetett azonosítani, azonban erről az indolról nem lehet megállapítani, hogy a tirozimból szintetizálódott-e, vagy lebomlási termék. Az első eset valószínűbbnek látszik, mivel az indolfolt valamivel aktívabb, mint TTP prekursor adagolása esetén. Egyes szerzők beszámolnak arról, hogy az élesztőszervezetekben a tirozin indollá alakulhat. Ha a tirozin $\rightarrow$ indolreakció az élesztőkben is megvalósulhat, akkor tirozinos tápoldatban a magasabb IES szintet a következő szintézist magyarázhatja:



A fenti reakciósor értelmében tehát a tirozin valamilyen ismeretlen (csak izotopos vizsgálattal eldönthető) reakcióúton indollá alakul, az indol az élesztő szabad szerin tartalmával

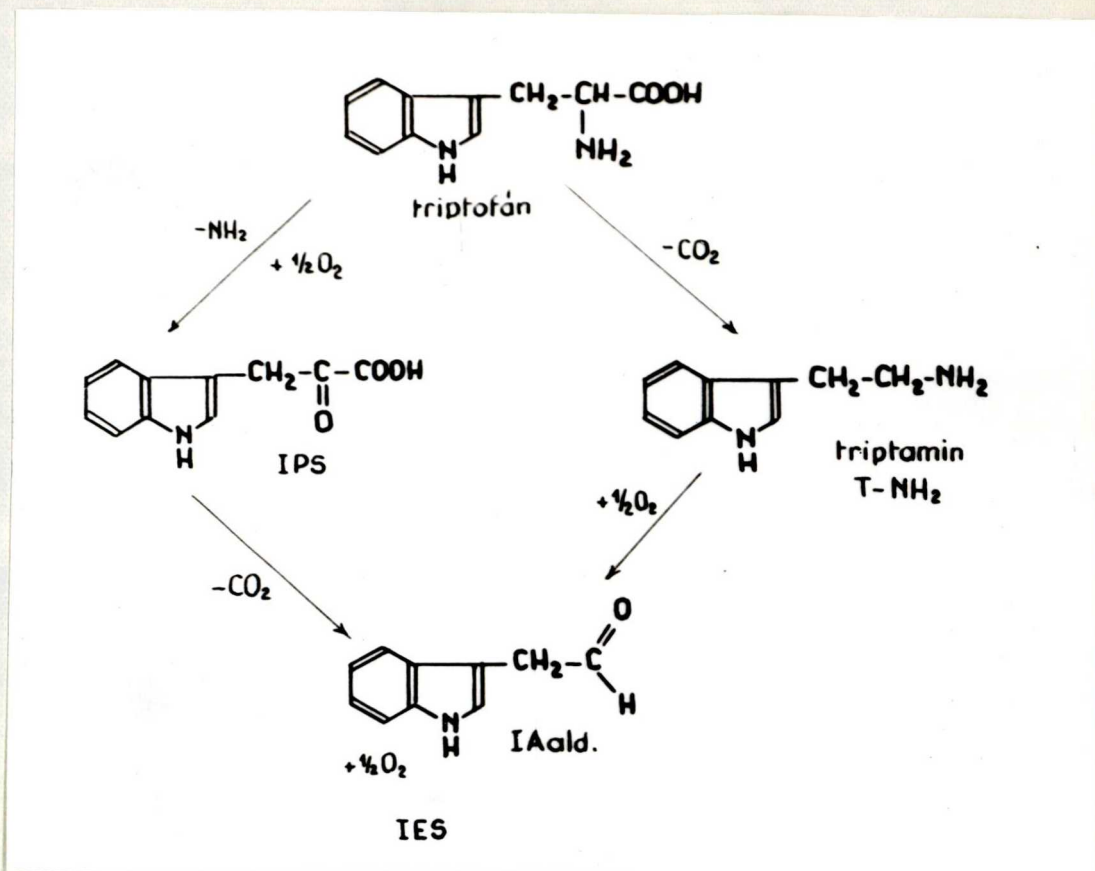
TTP-ná kondenzálódik és ebből a már ismert úton IES keletkezik. Valószínű, hogy a tirozin $\rightarrow$ indolreakcióhoz más vegyület jelenléte is szükséges. A tirozin $\rightarrow$ indolreakció létének bizonyítása úgy lehetséges, hogy jelzett tirozin, vagy fenilalanin jelenlétében nevelt élesztőtörzsek aminosav-kromatogramján a triptofán, auxinkromatogramján pedig az indol és az IES jelzettségét megállapítjuk. Amennyiben az említett vegyületek aktívak, úgy a reakció út nem kétséges.

IES-at termelő törzsek auxinkromatogramjának értékelése.

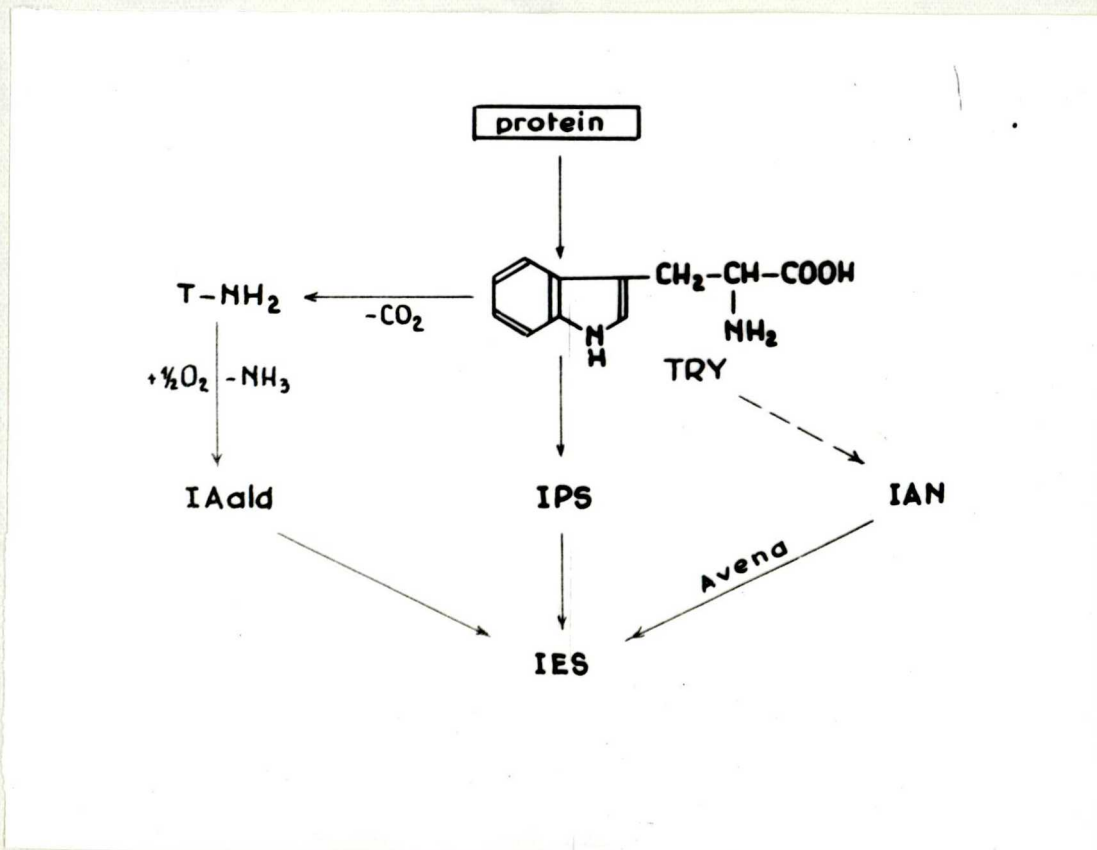
Indol és szerint prekursor adagolásakor intenzívebb indolfoltot, triptofán tartalmú tápoldatban viszont intenzívebb IES foltot kapunk. Az IES-at szintetizáló törzsek auxinkromatogramján 0,75 R_F -értékű, barna színű folt kétségtelenül a triptamin foltja. Triptamin jelenlétét bizonyítja a triptofán dekarboxilációjának mérése is. Mivel a triptamin jelenléte több oldalról is bizonyított az IES-at szintetizáló törzsek tápoldatában, úgy az azonosítatlan foltok az IES szintézisében intermediereként valószínűleg nem szereplnek.

Tekintve, hogy az élesztőtörzsek indolauxin-kromatogramja - a triptaminon kívül - más IES intermediert kimutatni nem sikerült, IES intermediereként csak a triptamin jöhet számításba.

Áttanulmányozva JONES, METCALPE, SEXTON (1949) (45. ábra), THIMANN (1955) (46. ábra), GORDON (1956) (47. ábra), FAWCETT (1961) (48. ábra) vázlatait, melyekben az IES bioszintézisének lehetséges útjai vannak feltüntetve, megállapíthatjuk, hogy a triptaminból IAald-en keresztül juthatunk el az IES-hoz. Deára, hogy az IAald-et nem tudtam kimutatni, teljes

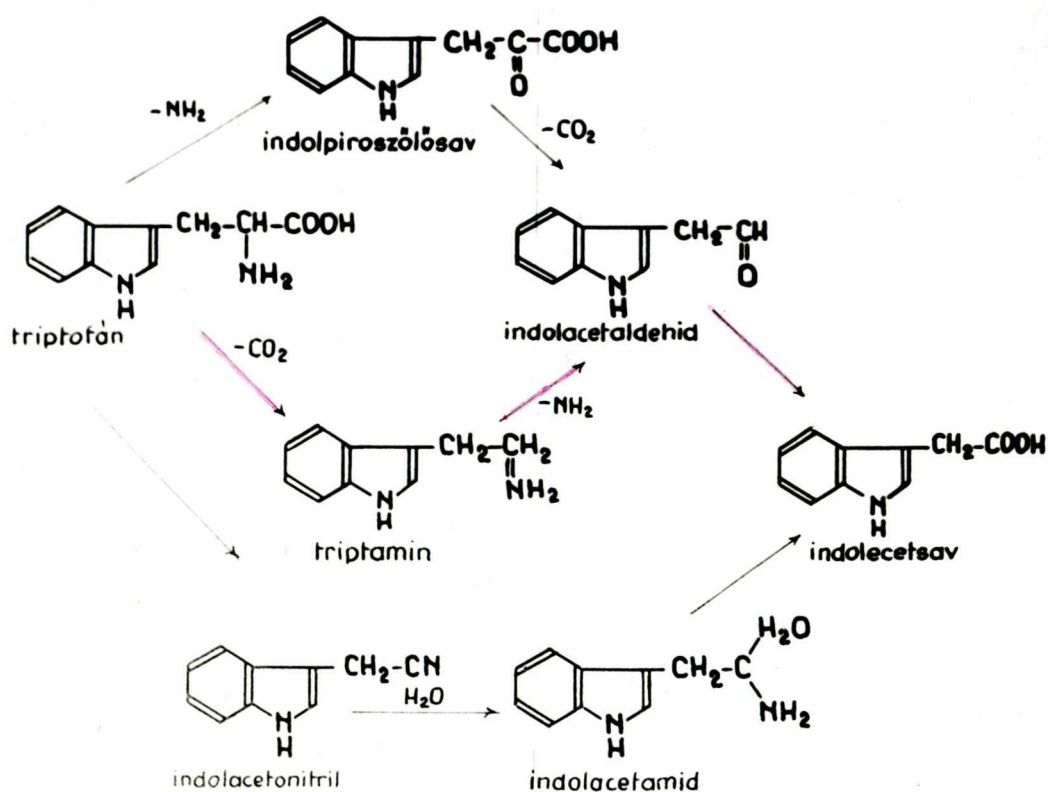


45. ábra: A β -indolil ecetsav bioszintézise (JONES, METCALPE, SEXTON 1949).

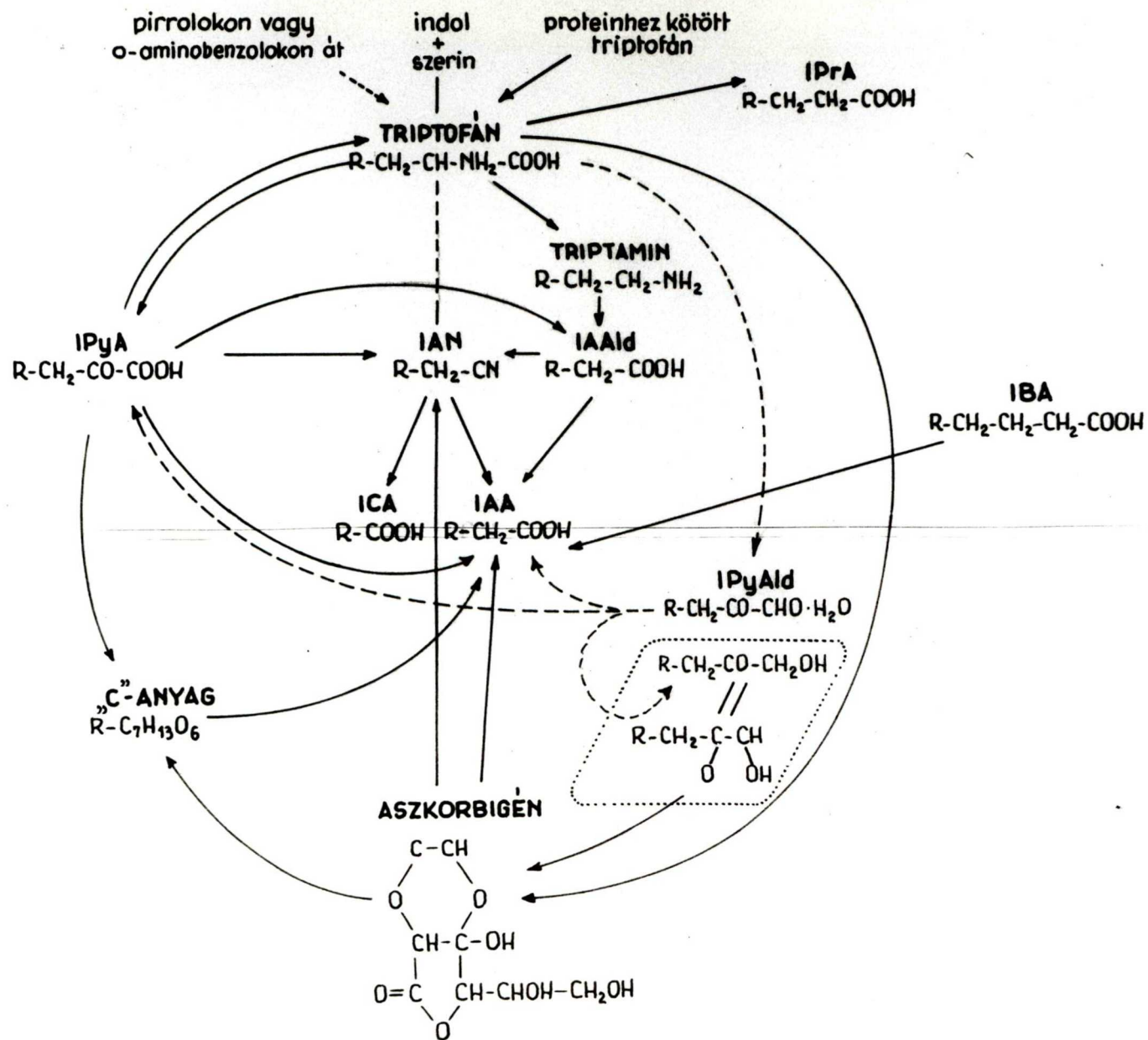


46. ábra: A β -indolil ecetsav bioszintézise (THIMANN 1955).

biztonsággal megállapíthatjuk, hogy az élesztőkben a β -indolilecetsav bioszintézise a következő uton történik:



47. ábra: A β -indolil ecetsav bioszintézise (GORDON 1956).



48. ábra: Indolauxinek egymásba alakulása a növényekben /PAWCETT 1961/.

Mivel az IES-at termelő hat törzs tápoldatában megtalálható a triptamin, úgy ezen törzsek IES szintézise is feltehetően a triptaminon keresztül történik, és igen nagy valószínűséggel elmondhatjuk, hogy valamennyi az IES szintézisére képes élesztőtörzs triptaminon keresztül szintetizálja a β -indolil-acetsavat. Ezt az elképzelést az a tény is támogatja, hogy a vizsgált törzsek más-más családba tartoznak. Természetesen ez nem zárja ki azt, hogy egyes mutánsokban, avagy bizonyos körülményekhez adaptált törzsekben az IES bioszintézise más utat ne követhetne.

Sajnos az egyszerűbb szervezetű növények IES bioszintézisével kevesen foglalkoztak. Az a néhány ismert adat - így WOLF-nak (1956) a *Gymnosporangium juniperi-virginiae* IES bioszintézisére vonatkozó közleménye - szintén a triptamin hipotézist támogatja. Amíg a magasabb szervezettségű növényekben az indolanyagcsere fontos biokémiai és fiziológiai folyamatokkal van kapcsolatban, mint a fotoszintézis, respiráció, differenciálódás, növekedésszabályozás, stb., addig az egyszerűbb szervezettségű növényekben ilyen széles skálájú összefüggésekről nem beszélhetünk.

Tehát nem véletlen az, hogy a magasabb szervezettségűekben a törzsfejlődés folyamán az indolauxin bioszintézisnek sokirányú, változatos formája alakult ki (48. ábra), míg az alacsonyabb szervezettségűekben az IES bioszintézise valószínűleg csak a triptaminon keresztül valósul meg.

A triptamin, mint intermedier, megtalálható egyes magasabb szervezettségű növények IES szintézisében is, hiszen a

triptofán egy molekula széndioxid vesztesével triptaminná alakul át. Ezt az átalakulást SKOOG (1937) a zab szövetében, PILET és ATHANASIADES a lencsében, DANNENBURG, LIVERMANN és WHITE a görögdiannyében, GARDI és WOLF (1957) a gombákban, WEINTRAUB (1951), LARSEN (1951), HEMBERG (1958) szintén igazolták. Kísérleteimben a *S. cerevisiae*-ben WARBURG-metódussal igazolni tudtam, hogy az IES bioszintézise triptaminon keresztül történik. A dekarboxiláció közben felszabaduló széndioxid kiváltotta nyomásemelkedés mérhető volt. Ez a vizsgálat egyben fényt derített az élesztőkben működő triptofán dekarboxiláz rendszer léteire. Ez az enzim meglehetősen kis aktivitású, ami a triptofán rossz oldódásának tulajdonítható. Az intermediér a triptamin létét az élesztő triptofán tartalmú tápoldatában harmadik oldalról is igazoltam. Elfo-analizkor a kromatogram barna foltja a katód felé vándorolt, ami pozitív töltésű, amin jellegű vegyületre utal (41. ábra).

Az indolacetaldehid keletkezése a triptaminból deaminációval egybekötött oxidációs folyamat.

CLARKE és MANN (1957) borsócsíranövényekből származó tisztított amino-oxidázzal igen nagy mennyiségű triptamint tudtak indolacetaldehiddé alakítani. Ezen reakció enzim rendszere ismert és minden valószínűség szerint az élesztő is rendelkezik hasonló enzimrendszerrel.

Az indolacetaldehidnek IES-vá alakulását valószínű a SCHARDINGER enzim végzi. Ez az oxidáló enzim az élesztőkben is megtalálható. Az IAald $\rightarrow$ IES átalakulást több kutató leírta magasabb szervezetségű növényekben, így pl. GORDON, SANCHEZ és NIVEA (1949) az ananászban, YAMAKI és NAMAKURA a

kukoricában. A reakciót kimutatták zabkoleoptilekben is. A mikroorganizmusok köréből ilyen adatok nem ismertek.

4. Az IES hatása az élesztők endogén légzésére és az IES-oxidáz

Felmerülhet még egy kérdés, vajjon milyen fiziológiai és biokémiai szerepe van az IES-nak az élesztőkben? E tekintetben igen keveset tudunk.

Ujabb vizsgálatok szerint a plazma duzzadását okozzák, ennél fogva növeli annak vízzel való átjárhatóságát. ANAKER (1949) az élesztősejtek oxigén fogyasztását IES jelenlétében megmérve megállapította, hogy az élesztőszuszpenzió endogén légzése megemelkedett, ha a manométereredény oldaledénykéjéből az etanolban oldott IES-at a fő térbe vitte. Saját vizsgálati eredményeim nem támogatják ANKER megállapítását, az IES az élesztők endogén légzését nem befolyásolta. ANKER metodikai hibát követett el, amikor az IES-at etanolban oldva vitte a manométereredénybe, mivel az etanol okozta a légzés megemelkedését. Emellett szól az a kísérleti adat is, hogy a szintetizálódott IES nagy része a tápoldatban található, nem pedig az élesztősejtekben. Ezidőszereint annak kijelentése indokolt, hogy az élesztő a szintetizálódott IES-at mint anyagszerepro-
duktumot a környező médiumba kiválasztja.

Az indol és származékainak kísérleteim alapján feltételezett bioszintézisét a 49. ábrában foglaltam össze.

Megoldatlan marad ellenben az a kísérleti tény, hogy az élesztő törzsek termelte IES mennyisége, hogyan csökken, miután IES-oxidáz rendszert kimutatnom nem sikerült.

Ö s s z e f o g l a l á s

Az indolvázias vegyületek bioszintézisének tanulmányozására rázatott élesztőszuszpenziókat, analizálásra papirkromatográfiát, elfo-analizist és kolorimetrikus meghatározásokat használtam. Megállapítottam, hogy a triptofán adagolására egyes törzsek IES szintézise emelkedett. Kimutattam a triptofán szintézisét indolból és szerinből. Antranilsav hozzáadására egyes törzsek tápoldatában megemelkedett az indol mennyisége. WARBURG módszerrel kimutattam a triptofán dekarboxilációját, papirkromatográfiával és elfo-analizissel a triptamint. Megállapítottam, hogy tirozin adagolásra a tápoldat az IES mennyisége megemelkedik. Ez a reakció a tirozin → indolreakció létét igazolja.

Ezen eredmények a következő szintetikus reakciókat mutatják:

antranilsav	————→	indol
indol+szerin	————→	triptofán
triptofán	————→	triptamin
triptamin	————→	indolacetaldehid
indolacetaldehid	————→	β-indolil ecetsev

A 49. ábrán foglalom össze az indolszármazékok és származékainak bioszintézisét és lebontását az élesztőkben.

I r o d a l o m

1. ANKER, L. (1951): On the mechanism of auxin actions. II. The influence of indoleacetic acid on the respiration of starved *Avena* coleoptile sections. Proc. Kon. ned. Akad. Wet. 54: 525-532.
2. AVERY, G.S. - J. BERGER (1943): Tryptophan and phytohormone precursors. Science. 98: 513-515.
3. BONDE, E.K. (1953): Auxins and auxin precursors in acid and nonacidic fractions of plant extracts. Bot. Gaz. 115: 1-15.
4. BONNER, J. and R.S. BANDURSKI (1952): Studies of the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxins. Ann. Rev. Plant. Physiol. 3: 59-86.
5. BOYSEN - JENSEN, P. (1932): Über die Bildung und biologische Bedeutung des Wachstumsregulators bei *Aspergillus niger*. Biochem. Z. 250: 270-280.
6. BRAUNSTEIN und SCHEMIKIN (1953) cit in: K. H. KÖHLER (1960): Untersuchungen sowjetischer Biochemiker und Pflanzenphysiologen über die Biosynthese von Aminosäuren in höheren Pflanzen. Wissenschaftliche Zeitschrift. Der Ernst - Moritz - Arndt - Universität. Greifswald. 3/4, 1959/60.
7. CLARKE, A. J. - P. G. MANN (1957): The oxidation of triptamine to 3-indolylacetaldehyde by plant amine oxidase. Biochem. J., 65: 763-774.
8. CRAM, D. J. - M. J. TISCHLER (1948), GRUEN után 1959: Am. Chem. Soc. 70: 4238-39.
9. DANNENBURG, W.N. - LIVERMANN, J. L. (1957): Conversion triptophan-2-C¹⁴ to indoleacetic acid by watermelon tissue slices. Plant. Physiol. 32: 263-269.
10. DAVIS, B. B. (1955): Biosynthesis of the aromatic amino acid. In: Amino acids Metabolism. pp. 799-811. W.D. McELROY and B. GLASS, editors. Baltimore: Johns Hopkins Press.
11. DOBY, G. (1959): Növényi biokémia. Akadémiai Kiadó, Bp.
12. EDDY, A. A. (1955): HARRIS után 1958. Gen. Mikrobiol. 13: 123-139.

13. FAUCETT, C. H. (1961): Indole-auxins. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 12: 345-
14. FERENCZY, L. (1959): Összehasonlító auxin vizsgálatok Indolil-3-acétsav és 2,4 dichlorphenoxyecétsav prekursorokkal. Kandidátusi értekezés.
15. FERENCZY, L. - STEFANDEL, I. (1958): *Acta Agronomica* 8: 167-170.
16. FISCHER, A. (1954): Über die papierelektrophoretischer Trennung von Indolderivaten. *Planta*, 43: 288-314.
17. FRIES, N. (1950): Growth factor requiermentes of some higher fungi. *Sv. bot. Tidskr.* 44: 380-386.
18. GALSTON, A. W. - W. K. PURVES (1960): The Mechanism of action auxin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 11: 239-276.
19. GORDON, S. A. - F. SANCHEZ NIEVA (1949): The biosynthesis of auxin in the vegetative pineapple. I. *Arch. Biochem.*, 20: 356-366.
20. GORDON, S.A. - F. SANCHEZ NIEVA (1949): The biosynthesis of auxin in the vegetative pineapple. II. *Arch. Biochem.*, 20: 367-385.
21. GORDON, S. A. (1956): The biogenesis of natural auxins. *The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances.* (Ed. R.L. Wain and F. Wightman) Butterworths Sci. Publ. London, p. 65-75.
22. GORDON, S. A. (1954): Occurrence, formation and inactivation of auxins. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 5: 314-378.
23. GRUEN, H. E. (1957): Growth and Curvature of *Phycomyces sporangiophores*. Doctoral thesis, Havard Univ. Cambridge, Mass.
24. GRUEN, H. E. (1959): Auxin and Fungi. *Ann. Rev. Plant, Physiol.* 10: 405-440.
25. GUGGENHEIM, M. (1951): *Die biogenen Amine.* 4. kiad. Karger Basel.
26. HAIS, I. M. és K. MACEK (1961): A papirkromatográfia kézikönyve. Akadémiai Kiadó. Bp.
27. HAINS és FRANK cit in: HAIS, I. M. és K. MACEK (1961): A papirkromatográfia kézikönyve. Akadémiai Kiadó. Bp.

28. HARLEY-MASON, J. (1954): Mechanism of tryptophane biogenesis and decomposition. *Experientia*. (Basel) 10: 134.
29. HARRIS, G. (1958): Nitrogen Metabolism in the Chemistry and Biology of Yeasts. Edited by A. H. COOK.
30. HEIDELBERGER, C., E. P. ABRAHAM and LEFKOVSKY (1949): Tryptophan metabolism II. Concerning the mechanism of the mammalian conversion of tryptophan into nicotinic acid. *J. of Biol. Chem* 179. 151-155.
31. HEMBERG, T. (1958): Auxins and growth inhibiting substances in maize kernels. *Physiol. Plantarum*. 11: 284-311.
32. HEYN, A. N. J. (1936): Auxine. *Handb. biol. Arbeitsmeth.* 5. 823-861.
33. INGRAM, M. (1955): On introduction to the biology of yeasts. Pitman and Sons. London.
34. JONES, R. L. - METCALFE, T. P. - SEXTON, V. V. A. (1949): The relationship between the constitution and the effect of chemical compounds on plant growth. *Biochem. J.* 45: 143-149.
35. JUMP, J. A. (1938): GRUEN után 1959. *Phytopathology*. 28: 798-811.
36. KREBS, H.A. - M. M. HAFEZ, and N. EGGLESTON (1942): Indole formation in *Bacterium colicomune*. *Biochem. J.* 306-309. 39:
37. KÜGL, F. - A. J. HAAGEN-SMIT (1931): Über die chemie des wuchsstoffs. *Proc. Kon. ned. Akad. Wet.* 34: 1411-1416.
38. KÜGL, F. - A. J. HAAGEN-SMIT and H. ERKLEBEN (1933): Preparation of pure auxin from human urine. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 214:241-261.
39. KÜGL, F. - D. G. R. KOSTERMANS (1934): Heteroauxin als Stoffwechselprodukt nieder pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. *Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.* 228: 113-121.
40. LARSEN, P. (1951): Formation, occurrence and inactivation of growth substances. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 2: 168-198.
41. LARSEN, P. (1955): Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. III. Band., 565-625.

42. LIVERMAN, J. L. - W. N. DANNENBURG (1957): Conversion of tryptophane and indoleacetonitrile to indoleacetic acid by *Avena coleoptile* tissue. *Plant. Physiol.* (Supp.) 32: XVIII.
43. MADHUSUDANAN NAIR, P., C. S. VAIDYNATHAN (1961): Tryptophan synthetase in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 262-266.
44. MANN, P. J. G. - W. R. SMITHES (1955): Plant Enzyme Reactions Leading to the Formation of Heterocyclic Compounds. *Biochem. J.* 61: 101-105.
45. MANNING, D. T. - A. W. GALSTON (1955): On the nature of the enzymatically catalyzed oxidation products of indoleacetic acid *Plant. Physiol.* 30: 225-231.
46. MEHLER, A. H (1955): Metabolism of Tryptophan. In: W. D. Mc ELROY and B. GLASS, *Amino acid metabolism*, S. 882-908 Baltimore.
47. MITCHELL, H. K. - J. F. NYC (1948): Hydroxyanthranilic acid as a precursor of nicotinic acid in *Neurospora*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 34: 1-5.
48. NIELSEN, N. (1931): Untersuchungen über einen neuen wachstumsregulierenden Stoff: Rhizopin. *Abh. wiss. bot.* 73: 125-191.
49. NYC, J. F., H. K. MITCHELL, E. LEIFER And W. H. LANGHAM (1949): The use of isotopic carbon in a Study of the metabolism of anthranilic acid in *Neurospora*. *J. of Biol. Chem.* 179. 783-787.
50. PAECK, K. - M. V. TRACEY (1955): *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. III. Band.* Springer Verlag. Berlin. Heidelberg-Göttingen 565-625.
51. PARKS, L. W., and H. C. DOUGLAS (1957): N-Fructosyl anthranilic acid as a possible intermediate in the synthesis of indole by *Saccaromyces*. *Biochem. et Biophysica Acta* 23. 207-208.
52. POLJANOWSKI, O. L. - KRETOWITSCH, W. L. (1957): Über die quantitative Bestimmung und die Biosynthese des Tryptophans in Pflanzen. *Doklady Akad. Nauk. SSSR.* 1082.
53. POLJANOWSKI, O. L. (1959): Die Biosynthese von Tryptophan in der Weizenähre. *Izvest. Akad. Nauk. SSSR. Biol. Ser.* 428-430.

54. RAFELSON jr., M. E. (1955): Conversion of radioactive glucose and acetate to tryptophan by *Aerobacter aerogenes*. J. of Biol. Chem. 213, 479-486.
55. ROBINSON, T.W. - T. I. B. STIER (1941): Formation of auxin in yeast cultures. J. gen. Physiol. 24: 765-769.
56. ROTH, H. (1939): Die Bestimmung der freien und gebundenen Triptophans in Pflanzen. Angew. Chem. 52: 149-151.
57. SEN, S. P. - A. C. LEOPOLD (1954): Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. Physiol. Plant. 7: 98-108.
58. SCHRÖTER, H. B. (1958): Handbuch der Pflanzenphysiologie. VIII. Band Berlin, Verlag 844-888.
59. SCHWEIGERT, B.S. (1947): The role of vitamin B₆ in the synthesis of triptophane from indole and antranilic acid by *Lactobacillus arabinosus*. J. of Biol. Chem. 168: 283
60. SHAW, M., and HAWKINS, A. R. (1958): Can. J. Botany. 36, 1-16. idézi: GRUEN (1959).
61. SKOOG, F. (1931): A deseeded *Avena* test method for small amounts of auxin and auxin precursors. Jour. Gen. Physiol. 20: 311-334.
62. SNELL, E. E. (1943): Growth promotion in triptophane deficient media of o-aminobenzoic acid and its attempted reversal with orthanilamide. Arch. of Biochem. 2: 389-394.
63. SUKHORUKOV, K. - B. STROGONOV (1945): Compt. rend. Acad. Sci. U.R.S.S. 47: 593-596. idézi: GRUEN 1959.
64. SZALAI, I. (1959): Tryptophane Contents of New Potato tubers foreld by Rindite in the Different Phases of the Germination. Physiol. Plant. 12, 155-161.
65. SZALAI, I. (1959): Quantitative Changes of Growth-Promiting and Jubiliting Substances in the Potato tubers treated with Rindite. Physiol. Plant. 12, 237-244.
66. SZALAI, I. (1949): Ergebnisse der Untersuchungen über die stoffwechselphysiologische Grundlagen des Aktivitätwechsels der Kartoffel. Acta Univ. Szege. 5, 35-47.
67. SZALAI, I. (1962): Növényélettan. I.-II. Felsőoktatási Jegyzetellátó V. Bp.

68. SZALAI, I. - FRENÝÓ, V. (1962): Növényélettani kísérletek. Tankönyvkiadó. Bp.
69. TATUM, E. L. - D. BONNER, G. M. BEADLE (1943): Antranilic acid and the biosynthesis of indole and tryptophan by *Neurospora*. Arch. of Biochem. 3: 477-478.
70. TATUM, E. L. - D. BONNER (1944): Indole and serine in the biosynthesis and breakdown of tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. 30: 31
71. TATUM, E. L. - S. SHEMIN (1954): Mechanism of tryptophan synthesis in *Neurospora*. J. of Biol. Chem. 209: 671-675.
72. TEAS, H. J. - ANDERSON, E. G. (1951): Proc. Natl. Sci. U. S. 31: 645. idézi: DOBY 1959.
73. THIMANN, K. V. (1935): On the plant growth hormone produced by *Rhizopus stolonatus*. J. Biol. Chem. 109: 279-291.
74. THIMANN, K. V. (1954): The physiology of growth in plant tissues. Amer. Scientist. 42: 598-606.
75. TYLER, V. E. - A. E. SCHWARTING (1951): The Cultures of *Claviceps purpurea*. III. Tryptophan Metabolism. J. of Amer. Pharm. Assoc. 18: 207-211.
76. TYLER, V. E. - A. E. SCHWARTING (1953): Tryptophan Synthesis in *Claviceps purpurea*. Science. 118: 132-133.
77. ULRICH, J. M. (1960): Auxin production by Mycorrhizal Fungi. Physiol. Plant. 13: 429-443.
78. UMBREIT, W. W. - W. A. WOOD I. C. GUNSALUS (1946): The activity of pyridoxal phosphate in tryptophan formation by cell-free enzyme preparations. J. of Biol. Chem. 165: 731-732.
79. VARGA, M. B. - FERENCZY, L. (1956): Effect of Rindite on the development of the growth substances in potato tubers. Nature. 179: 1075.
80. VARGA, M. B. - FERENCZY, L. (1957): Quantitative Changes in growth-promoting and growth-inhibiting substances in Rindite-treated and untreated potato tubers. Acta Bot. Hung. 3: 111-121.
81. Vámos, E. (1959): Kromatográfia. Műszaki Könyvkiadó. Bp.
82. WATANABE, T. (1957): Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 22: 123-147. idézi: GRUEN 1959.

83. WILDMAN, S. G. - M. G. FERRI, P. BONNER (1947): The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. Arch. of Biochem. 13: 131-144.
84. WOLF, P. T. (1952): Production of indoleacetic acid by *Ustilago zeae*, and its possible significance in fumar formation. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 38: 106-111.
85. WOLF, P. T. (1956): The production of indole acetic acid by the Cedar Apple Rust Fungus and its identification by paper Chromatography. Phytopat. Zeitscht. 26: 219-223.
86. YANOFSKY, C. (1952): Tryptophan desmolase of *Neurospora*. Partial purification and properties. J. of Biol. Chem. 194: 279-286.
87. YANOFSKY, C. (1955): On the conversion of antranilic acid to indole. Science (Lancaster, P.a) 121: 138-139.
88. YANOFSKY, C. (1956): Indole-3 glycerol phosphate, an intermediate in the biosynthesis of indole. Biochem. et. Biophysica Acta 20: 438-439.
89. YANOFSKY, C. (1957): Enzymatic studies with a series of tryptophan antotriops of *Escherichia coli*. J. biol. Chem. 224: 789-792.
90. ZOBBERST, W. (1958): Oxidationfermente mit unbekannter Wirkgruppe. In: W. RUHLAND ed Handbuch der Pflanzenphysiologie XII/1 456-477. Springer-Verlga. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
91. ZSOLT, J. - PAZONYI, B. - NOVÁK, E. - PELC, A. (1961): Az élesztők. Akadémiai Kiadó. Bp.

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Szalai István Professzor Urnak, akitől disszertációm témáját kaptam és aki munkámat a kísérletek megtervezésétől a dolgozat megformálásáig a leghatékonyabban támogatta. Ezen túlmenően az általa vezetett Intézetben tanultam meg a tudomány szeretetét, ott értettem meg az elméleti munka gyakorlati jelentőségét, a termelő munkában és a társadalom fejlődésében betöltött szerepét. Ugy érzem, egész további pályámra döntő befolyást gyakorolt az Intézetben eltöltött idő és mindezért elsősorban Szalai István Professzor Urnak tartozom köszönettel.

Továbbá köszönetet mondok dr. Zsolt János tudományos kutatónak az élesztők anyagcseréjének vizsgálatában nyújtott nagy segítségéért. A növekedési anyagok vizsgálatánál sok hasznos tanácsot kaptam dr. Varga Magdolna docenstől és dr. Ferenczy Lajos adjunktustól, amit ezúton köszönök meg.

Köszönetemet fejezem ki dr. Udvardy Nagy Istvánnénak, aki a vezetése alatt álló kutatólaboratóriumban a legmesszebbmenő támogatást nyújtott kísérleteim zavartalan végzéséhez, valamint Wack Géza mikrobiológus sok segítségéért.

Ciczó Tibor vegyésznek a fényképek elkészítéséért, dr. Martonosi Istvánnénak a gépelésért, valamint dr. Havass Zoltánnak a rajzok elkészítéséért mondok köszönetet.

