

Dr. VERESNÉ, LANTOS JUDIT

Redox rendszerek hatása mikroorganizmusok
anyagcseréje.

Doktori értekezés.

Szeged, 1958.

Diss. B 643

Diss. B 643

REDOX RENDSZEREK HATÁSA
MIKROORGANIZMUSOK
ANYAGCSERÉJÉRE

Doktori dolgozat

Írta:

Dr. Veresné, Lantos Judit

Benyújtotta

a Szegedi Tudományegyetem Matematika- és Természet-
tudományi Karához

1958



Diss. B 643



Az élő sejt az élet fenntartásához, anyagcseréjéhez és szaporodásához szükséges energiát a benne és környezetében lejátszódó kémiai átalakulásokból fedezi. A sejt, miközben életfontosságú anyagait felépíti, illetve a tápanyagokat lebontja, munkát végez és szabadenergiája megváltozik. Különösen jól tanulmányozható a sejtek szabadenergia viszonya mikroszervezetek tenyésztéseiben, ahol a környezet nem más, mint a sejtektől elkülöníthető, kémiailag definiálható és összetételében tetszés szerint változtatható tápoldat, s így a sejt-tápoldat komplexum termodinamikailag izolált rendszerként fogható fel. Miután a tenyésztetekben a kémiai folyamatok gyakorlatilag atmoszferikus nyomáson játszódnak le, alkalmazható rájuk az izobár folyamatokra megállapított termodinamikai függvény:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

ahol G a szabadenergia változást, vagy termodinamikus potenciált, H a hőtartalmat, S az entropiát jelenti. Mivel a tenyésztetekben végbemenő kémiai változások végeredményben oxido-redukciós folyamatokra vezethetők vissza, ezért a szabadenergia változás mértéke az elektrometriásan mérhető redoxpotenciál $/RP/$. Ennek állandó pH mellett észlelt értékét a termodinamikailag levezetett alábbi egyenlet fejezi ki:

$$E = E_0 + \frac{0.06}{n} \log \frac{ox}{red}$$

ahol E_0 a rendszer oxidált és redukált alakjának azonos koncentrációja esetén mért potenciált, ox és red pedig az oxidált, illetve redukált alak koncentrációját jelenti.

A baktérium tenyészetekben észlelt RP jellemzően követi a baktérium növekedési fázisait, azonban a tenyészetekben kifejlődő RP szükségsszerű eredetének megértéséhez ismernünk kell a tenyészetben lejátszódó anyagcserefolyamatok mechanizmusát.

Ismeretes, hogy a friss táptalajra oltott baktériumok szaporodási folyamatában az aktív szaporodási fázist egy úgynevezett lag /nyugalmi/ fázis előzi meg. E periódusban a sejtszámban nincs gyarapodás, vagy csak igen minimális. Az a táptalaj ugyanis, amelybe a frissen oltott tenyészet kerül, túlságosan oxidáló hatású ahhoz, hogy a sejtek növekedése és szaporodása megkezdődjék. A baktériumnak bizonyos mértékben meg kell változtatnia környezetét, hogy normális anyagcsereje meginduljon. De nemcsak környezetét kell megváltoztatnia, hanem saját enzimjeinek is alkalmazkodniuk kell a megváltozott körülményekhez. Ebben a szakban történik meg a fermentrendszer átcsoportosítása, esetleg újak építése. A táptalaj redox viszonyait figyelembe véve, e jelenség magyarázata a következő: a táptalaj RP-je nem felel meg a tenyészet RP-optimumának; azonos összetételű táptalajok esetén az RP a különböző mértékben oldott oxigéntől

függ, s mivel a táptalaj redox-kapacitása csekély, ezért az jelentősen különböző lehet. A tenyészetek azonban a táptalaj csekély redoxkapacitását kimerítik és az RP-t számukra kedvező szintre állítják be.

Amikor a baktériumtenyészet az RP-viszonyokat már alkalmassá tette anyagcseréje számára, akkor indul meg az aktív szaporodási szakasz, az ugynevezett logaritmikus fázis. Ilyenkor a baktériumok száma mértani haladvány szerint nő. A gyors növekedéshez és anyagcserefolyamatokhoz energiára van szükség. Ehhez legegyszerűbb energiaforrás a tápanyagok oxidálása. A tápanyagok elégetése igen sok lépésben történik, s ennek keresztülviteléhez igen sok enzim pontosan definiált körülmények közötti működése szükséges. A redoxszintet eszerint befolyásolják mindazok az enzimek, amelyek a tenyészetben működnek.

A növekedés logaritmikus fázisát egy stacionárius, majd csökkenő szakasz követi. A szaporodás egyre kisebb mértékű, a sejt pusztulásnak indul. E két folyamat egyideig egyensúlyban van, majd az autolízis sebessége túlnő a szaporodási sebességen és az élő sejtek száma egyre csökken. Ez azonban csupán statisztikai kép, de arra nem ad felvilágosítást, hogy a sejtben mi történik. Sok esetben számunkra igen érdekes anyagcseretermékek képződése éppen ebben a szakaszban játszódik le. A táptalajszűrlet kémiai összetétele ebben a szakaszban jelentősen megváltozik, s feltehető, hogy egyes sejtenzimek még akkor is aktívan működnek,

amikor a sejt strukturája felbomlott./1/ A stacionárius szakaszban az RP-t kialakító tényezők a következők:

- 1/ a levegő lassan bediffundál a tápoldatba,
- 2/ egyes ektoenzimek, s az anyagcsere folyamán képződött metabolitok megváltoztatják a tápoldat kémiai összetételét,
- 3/ az elektródok felületére tapadt sejtek és metabolitok a potenciálértékben eltolódást okoznak.

E tényezők eredőjeként a potenciál emelkedik.

Az RP időbeli lefolyását jelző ugynevezett redoxgörbe figyelembevételével a tenyészet életműködése során háromféle szakaszt különböztethetünk meg. Az első szakaszt, amelyet a fokozott táptalaj felhasználás és a tenyészet növekedése jellemez, növekedési fázisnak, a második szakaszt, amelyben a metabolitok termelése a legintenzívebb, termelési fázisnak nevezhetjük. A harmadik fázisban, amikor az RP állandóvá válik, a tenyészetben látszólagos egyensúlyi állapot áll be, azonban e szakaszban a metabolitok lebontása fokozottabbá válik. Az RP tehát a növekedési fázisban csökken, a termelési fázisban emelkedik, a harmadik, az RP szempontjából egyensúlyi fázisban állandó vagy csökken. E megállapításokból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ha valamely anyagot mikrobiológiai úton termelünk, a hozam, illetve a tenyészet kihasználása annál gazdaságosabb, minél rövidebb a növekedési fázis és azonos termelési viszonyok mellett minél hosszabb a termelési fázis. A

növekedési fázis ideje az optimális táptalaj alkalmazása mellett növekedési faktorok bevitelével csökkenthető, míg a termelés meghosszabbítására a tenyészet RP-jét megváltoztató tényezők alkalmazása nyújt lehetőséget /2/.

Hangsúlyozni kell, hogy a redox egyenletek levezetése azon a feltevésen alapul, hogy a rendszer egyensúlyban van. Kérdés, hogy élő szervezeteknél hogyan értelmezhető az egyensúlyi állapot. Legfeljebb olyan nyugalmi állapotról beszélhetünk, amelyben a sejt és a tápoldat komponensei között dinamikus egyensúly áll fenn.

Ahhoz, hogy különböző redoxrendszereknek a tenyészet RP-jére kifejtett hatását áttekintsük, utalni kell a redoxkapacitás fogalmára. A puffer rendszerekkel analóg módon egy redoxrendszer potenciálja kizárólag a komponensek arányától függ, a redoxkapacitás viszont csakis a komponensek abszolút mennyiségének függvénye. Minél nagyobb valamely rendszer redoxkapacitása, annál nagyobb annak az oxidáló vagy redukáló anyagnak a mennyisége, amely a rendszer RP-jét egységnyi értékkel megváltoztatja.

Ha egy bakteriumtenyészetbe a sejt anyagcserétől idegen redoxrendszer kerül, akkor az a tenyészet RP-jét különféle módon befolyásolhatja. A változás létrehozásában lényeges és döntő szerepe van mind a tenyészet, mind a hozzáadott rendszer redoxkapacitásának és redoxszintjének.

Feltételezhető, hogy a tenyészethez adott redoxrendszer olyan kis mennyiségű, hogy a tenyészet redoxkapacitását nem meríti ki, s így annak RP-jét sem befolyásolja lényegesen. Ha az idegen rendszer redox szintje távol esik a tenyészet redox szintjétől, akkor gátolhatja a tenyészet anyagcseréjének oxidációs, vagy redukációs folyamatait azáltal, hogy előbb ő maga oxidálódik vagy redukálódik. Az idegen rendszer redox szintjétől, illetve redox kapacitásától függ, hogy milyen irányban tolódik el a tenyészet RP-je. Ha a tenyészet redox kapacitása olyan nagy, hogy más redoxrendszert teljesen redukál vagy oxidál, vagyis kipufferol, akkor a potenciál kiegyensúlyozódik és lényeges potenciálváltzást nem észlelünk.

A mérés útján kapott RP-érték jellemző a tápoldat és a sejtek között végbemenő anyagcserére, valamint a tenyészet és az esetleg hozzáadott idegen redoxrendszer közötti kölcsönhatásra. Miután a tenyészetben számos oxido-redukációs folyamat játszódik le, a mért RP-érték ezeknek eredőjét fejezi ki, s a tenyészettről egy általános képet ad.

Az RP-mérések alkalmazása igen elterjedt a biológiai rendszerek vizsgálatában, mivel e kényelmes és gyors módszer segítségével mindig biztosan lehet következtetni a rendszer állapotára. Mikroszervezetek tenyésztéseiben mért redox görbe hasznos felvilágosítást nyújt a fejlődési fázisok időtartamáról, s a képződött anyagcseretermékek mennyiségi viszonyáról.

E dolgozatban leírt vizsgálatok célja annak felderítése volt, hogy lehetséges-e bizonyos mikroorganizmusok anyagcseréjében - a sejthez kapcsolt redox rendszerek alkalmazásával - irányítható változtatásokat létrehozni. A kérdés eldöntéséhez különösen a kísérleti anyagok könnyű hozzáférhetősége és a kísérleti eredmények jó reprodukálhatósága szempontjából az élesztő-hemin komplexum bizonyult legalkalmasabbnak.

Hemin típusu vegyületek biológiai fontossága az irodalomból már régóta ismert. Biológiai jelentőségükre először Grossberger /3/ mutatott rá, aki megfigyelte, hogy a hemin számos mikroorganizmus növekedéséhez elengedhetetlenül szükséges. Később Davis /4/ kimutatta, hogy a *Haemophilus influenzae* bacilus növekedéséhez két faktorra van szükség, amelyet Thjötta /5/ javaslatára X és Z faktornak neveztek. Az X faktorról kiderült, hogy a hemoglobinban fordul elő és vastartalmu származékának alakjában, amely heminnel bizonyult, sokkal hatásosabb mint a hemoglobin. Iwoff /6/ kutatásai szerint a hemin fontos szerepet játszik bizonyos baktériumok tápanyag szükségleteiben és egyes tripanosomák növekedéséhez is elengedhetetlenül szükséges. A hemin vasatomja autoxidálható és a vas vegyértékváltozása következtében képes az oxigén átvitelt katalizálni. Kuhn és Meyer /7/ megkísérelték, hogy számos biológiailag fontos anyag oxidációját heminnel katalizálják. Ez sikerült is telített zsírsavak, karotin típusu polién festékek és ergosterin ese-

tében. A szénhidrátok oxidációját a hemin nem befolyásolja, s hogy a szervezet mindezeket mégis képes oxidálni, Kuhn véleménye szerint úgy magyarázható, hogy a sejtek a szénhidrátokat egy előkészítő lépésben telítetlen kötésűvé alakítják, és így teszik hozzáférhetővé a hemin által katalizált oxidációnak. E feltevés helyességének bizonyítására kimutatták, hogy a piroszőlősav, amely alkalikus milióban enolós alakban van jelen, oxigént vesz fel, s ezt a reakciót a hemin gyorsítja. Kuhn véleménye szerint tehát a katalitikus hatás kifejtéséhez telítetlen kötésekre van szükség. Warburg /8/ a hemin katalitikus hatását mag nélküli eritrocitákon vizsgálta. Mivel bennük csak a glikolízis folyamatai játszódnak le, így a felületük az oxidációra nincs teljesen kihasználva, tehát itt a legvalószínűbb volt a hemin oxidációt katalizáló hatása. Azt találta, hogy egyes - a klorofill lebontása folytán nyert, s ő általa piroheminnek, és zöld heminnek nevezett - hemin típusu anyagok a vörös vértestek légzését huszszorosra is képesek fokozni. A katalízis maga nemében felületi, mert narkotikumokkal gátolható. A gátlás szénmonoxid hatására is létrejön. Miután a hemin a benne lévő vas vegyérték változása folytán képes oxidált és redukált alakban jelen lenni, egyes vasporfirin származékok éppen e tulajdonságuk miatt igen fontos szerepet játszanak a mikroorganizmusok oxidációs folyamataiban mint oxigén átvivő fermentek.

Kísérleteim első részében oxidációs katalizátorként klór-

hemint használtam. Ez a vegyület azonban vízben nem, csak alkalikus közegben oldódik. E kísérletek eredményei nem egyértelműek, s ez a molekula nagyfokú asszociációjának tulajdonítható. A vizoldékony c-heminnel /9/ nyert légzésfokozó és RP csökkentő hatás azonban még egyes anyagcsere termékek mennyiségi megváltozását is okozza. Későbbi vizsgálataimban olyan RP csökkentő anyagokkal kísérleteztem, amelyek egyszerűbb szerkezetűek, könnyen hozzáférhetőek és tartós RP csökkenést okoznak.

Először diphenyl-diszulfid-dicarbonsavat és más diszulfid vegyületeket próbáltam ki, de ezek tartós RP csökkenést nem okoztak. Megfelelőbbnek mutatkozott a tioglikolsav, amely az élesztőtenyészetek RP-jét hosszú ideig tartja alacsony szinten, sőt azt is megfigyeltem, hogy ergosterin termelését is fokozza. Éppen ezért tekintettel az ergosterin nagy gyógyszeripari jelentőségére, érdemesnek láttam a tioglikolsavnak az élesztősejtek anyagcseréjére gyakorolt hatását behatóan vizsgálni.

Az élesztő lipoid és sterin anyagcseréjével először Halden /10/ foglalkozott behatóan. Ő főleg a tenyésztési körülmények és az ergosterin tartalom között állapított meg összefüggéseket. E vizsgálatok főként azért érdekesek, mert kiderült, hogy a sterin anyagcsere fokozásával az ergosterin nincs egyenes arányban. Ha a sejtekben a sterin szintézis igen intenzív /a száraz anyag tartalom néhány százaléka/, a kísérő sterinek mennyisége a keletkezett ergosterinhez

viszonyítva aránytalanul magas. A kísérő sterinek felhalmozódása az ergosterinnek tiszta állapotban való izolálását megnehezíti, éppen ezért felvetődhet az a kérdés, hogy az ergosterin termelésre való tekintettel hol van az a határ, amelyen felül a sterin termelést már nem érdemes tovább fokozni? Neuberg /11/ vizsgálatai szerint az élesztő ergosterin tartalma a sejtek oxidációs tevékenységétől függ. Ezt a megállapítást Tausson /12/ és Zorkoczy /13/ azzal a gyakorlati megfigyeléssel egészítették ki, hogy az anaerob élesztőkből kivonható ergosterin mennyisége utólagos levegőztetéssel megnövelhető. Maguigan és Walker /14/ a táptalajba vitt különféle substrátumok hatását vizsgálták és megállapították, hogy a nátriumacetát csekély, az ascorbinsav jelentős mértékben fokozza a sterintermelést. A hidrolizált élesztő-glikogént hatástalannak találták, aminosavkeverékkel pedig, vagy tirozinnal gátlást észleltek. Bennett /15/ az élesztő ergosterin tartalmát nem toxikus oxidáló ágensekkel /perszulfát, peroxid, peracetát, metilénkék, indigókarmin/ növelte, amelyeket erősen levegőzött asszimilálható nitrogént nem tartalmazó táptalajban készült tenyészetekben alkalmazott.

A c-heminnel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az az élesztő légzését jelentősen befolyásolja, s mivel az ergosterin-termelés a sejtek oxidációs tevékenységétől függ, várható volt, hogy az élesztő ergosterin tartalma e heminkészítmény hatására emelkedik. Hutterer /16/ vizsgálatai

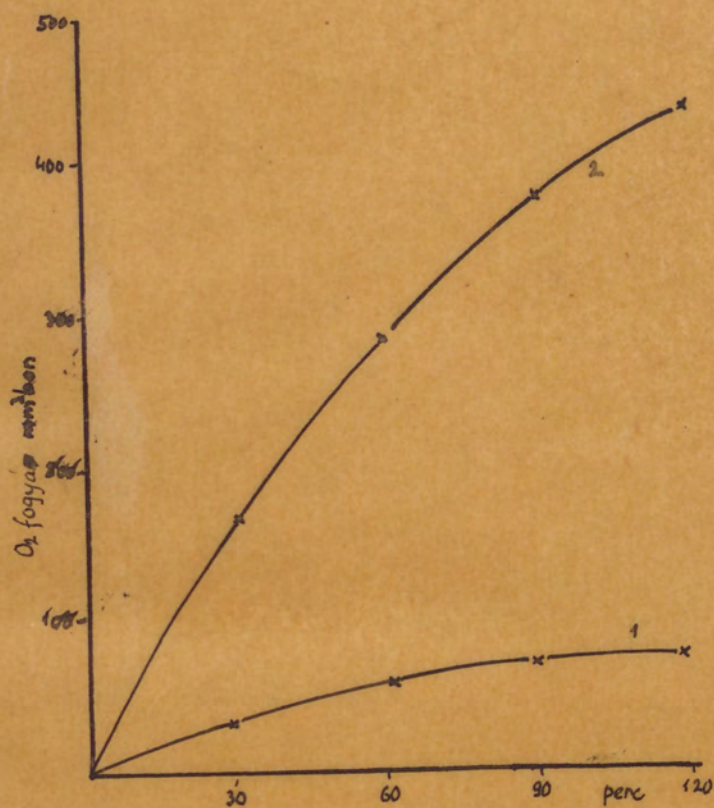
szerint levegőzött élesztő tényészetekben c-hemin hatására az ergosterin tartalom hat óras inkubáció után az eredetinek kétszeresére növekedett.

Kísérleti eredmények

1/ Az első kísérletsorozatban megvizsgáltam, hogy a c-hemin milyen módon befolyásolja az élesztő szuszpenzió légzését. Az élesztő-hemin rendszer oxigén fogyasztását összehasonlítva egy ugyanolyan körülmények között lévő, de c-hemint nem tartalmazó élesztő szuszpenzióval, azt találtam, hogy a hemin az élesztő légzését az első óra eltelte után majdnem tízszeresre emeli. /1. ábra/

2/ Az élesztő-hemin arány megváltoztatása a légzés sebességének megváltozását vonja maga után. Ha az élesztő: hemin arány 1 : 0,006, akkor már az első órában tízszeresre emelkedik az oxigén fogyás. Ha ez az arány 1 : 0,003-ra csökken, a légzésfokozás még mindig kimutatható. /2. ábra/

3/ Az élesztő légzése heminnel csak korlátolt ideig fokozható. Ennek magyarázatára megpróbáltam feleletet kapni arra, hogy milyen kapcsolat jön létre az élesztő és hemin között. A kísérlet alatt meghatároztam az élesztő által megkötött hemin mennyiségét és a kötődés körülményeit. Megállapítottam, hogy a kötés létrejötté számára a neutrális milliő a kedvező, mert savanyu közegben a hemin kvantitativ lehasad. A kötés az idő függvénye is, mert 36 óra múlva a megkötődött hemin mennyisége lényegesen lecsökken és az élesztőről le-



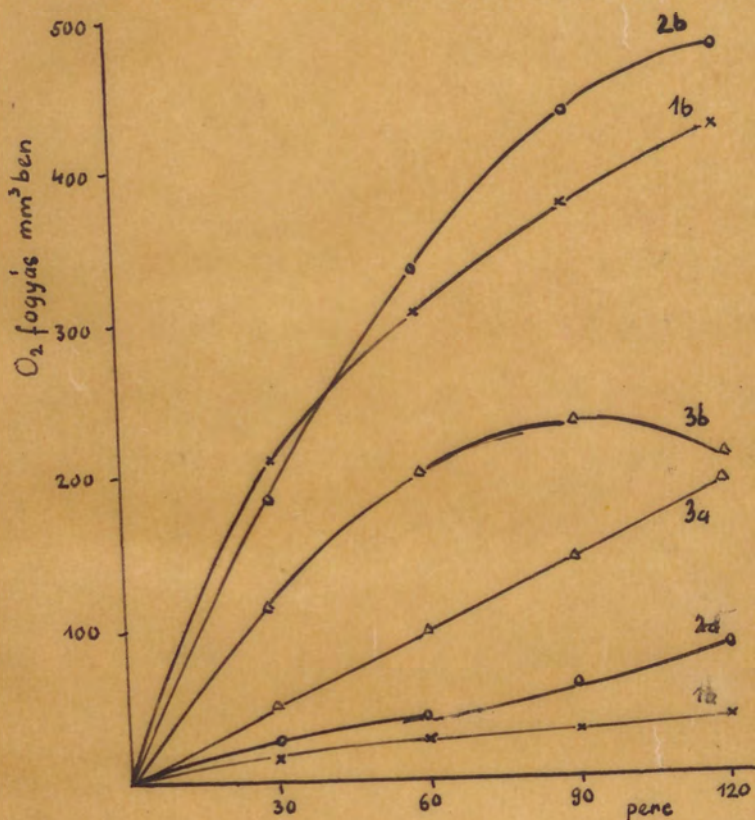
1. ábra

Az élesztő légzésének változása c-hemin hatására

1. Az élesztő endogén légzése.

2/ Az élesztő légzése 75 γ c-hemin hatására.

/Élesztő koncentráció: 0,012 g szárazanyag/3 ml tenyészet./



2. ábra

Különböző koncentrációjú élesztőtenyészetek légzése
c-hemin hatására

- 1.a. Az élesztő endogén légzése /0,006 g szárazanyag/3 ml tenyészet/
- 1.b. Légzésváltozás 75 γ c-hemin hatására.
- 2.a. Az élesztő endogén légzése /0,012 g szárazanyag/3 ml tenyészet/
- 2.b. Légzésváltozás 75 γ c-hemin hozzáadására
- 3.a. Az élesztő endogén légzése /0,024 g szárazanyag/3 ml tenyészet/
- 3.b. Légzésváltozás 75 γ c-hemin hozzáadására.

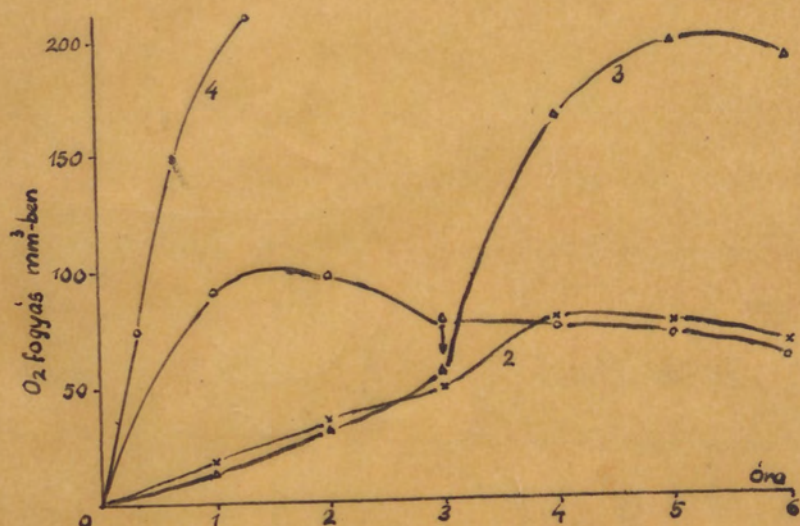
hasadt hemin az oldatban mutatható ki.

1 g élesztő által megkötött hemin mennyisége

pH : 7	pH : 4	36 óra múlva	%
374,5	-	90	28
368	-	79	22

4/ A következőkben vizsgálataimat abban az irányban terjesztettem ki, hogy az élesztő-hemin-komplexum légzése hogyan befolyásolható; inhibitorokkal milyen mértékben gátolható, illetve a hemin mennyire képes a gátlást reverzibilissé tenni. Ezirányban végzett gátlási kísérleteim felvilágosítást adnak arra vonatkozólag, hogy az élesztő-hemin-komplexum hogyan viszonylik az oxidációs fermentekhez. /Légzőferment, citokróom C/ E kérdés tisztázása céljából az élesztő légzését cianiddal gátoltam. Ha ugyanis a gátlást, amely a légzőferment megbénítása miatt jött létre, a c-hemin által képezett új komplexummal fel lehet függeszteni, akkor a kötés légzőferment típusának fogható fel.

E kísérletben először megállapítottam azt a káliumcianid-mennyiséget, amely a felhasznált tenyészetben a légzőferment működését éppen gátolta. Ilyen gátolt élesztőhöz hemint adva /mind a káliumcianidot, mind a c-hemint a kísérlet elején adtam az élesztőhöz/ a tenyészet oxigénfogyasztása nem fokozódott és csak a harmadik óra elteltével emelkedett az endogén légzés értéke fölé, amikor a káliumcianid gátló hatása már megszűnt. /3. ábra/



3. ábra

Élesztő-c-hemin komplexum légzésváltozása káliumcianid hatására

1. Az élesztő endogén légzése.
2. 10^{-3} Mol KCN-dal gátolt élesztő légzése
3. 10^{-3} Mol KCN-dal történt gátlás + 75 γ c-hemin hozzáadása utáni légzés
4. Élesztő-c-hemin komplexum légzése

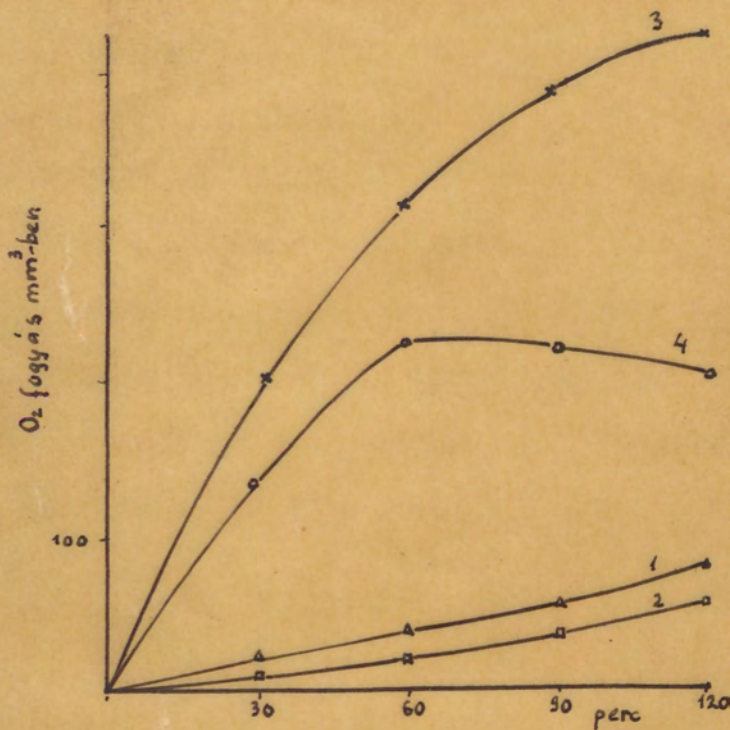
/Élesztő koncentráció 6,6 mg szárazanyag/3 ml tenyészet,

KCN koncentráció: 10^{-3} Mol.

Oxigén fogyas: mm³/3 ml tenyészet./

Monojódecetsavval végzett vizsgálataim azt mutatták, hogy a gátlás c-heminnel felfüggeszthető, sőt az endogénléghé-
hez viszonyítva nagymértékű fokozást tapasztaltam. /4. ábra/
A monojódecetsav az állati szövetben és az élesztőben is a
szénhidrát lebontásban szereplő triosefoszfátdehidras-
et gátolja /17/. A mérgezés következtében a triosefoszfátdehid-
rase substratjának a 3 foszfoglicerinaldehid és az ezzel
egyensúlyban lévő fruktose difoszfát pangásának kell bekö-
vetkezni. A kísérlet alapján valószínűnek látszik, hogy az
élesztő valamely fehérjéjének c-heminnel alkotott komplexuma
a triosefoszfátdehidras-
et képes helyettesíteni.

5/ A légzési kísérletekkel paralell megvizsgáltam, hogy c-
hemin hatására az élesztő szuszpenzió milyen RP-változást
sz szenved. Általában azt tapasztaltam, hogy a légzési kísér-
leteknél alkalmazott koncentrációk és élesztő: hemin arányok
mellett az RP-ben következetesen 100-150 mV esés következett
be. Ez a redox csökkenés a légzés intenzitásának növekedésé-
vel a legszorosabb összefüggésben van, s tartóssága a hozzá-
adott heminmennyiségtől függ. Amikor az élesztő szuszpenzió
potenciája hirtelen leesett és a heminkoncentrációtól függő-
en bizonyos ideig alacsony szinten is maradt, ugyanakkor ér-
te el a c-hemin légzésfokozó hatásának maximumát. A potenciál
emelkedő fázisában a légzés csökkenni kezdett s azonos idő
mulva ért el mindkettő egy-egy konstans értéket, amely a
kiindulási érték közelében van, azonban ennél néhány mV-tal
alacsonyabb, illetve a légzésben ennél magasabb.



4. ábra

Élesztő-c-hemin komplexum légzésváltozása
monojodecetsav hatására

1. Az élesztő endogén légzése
2. 10^{-3} Mol MJE-val gátolt élesztő légzése
3. Az élesztő-c-hemin komplexum légzése
4. 10^{-3} Mol MJE-val történt gátlás + 75 γ c-hemin hozzáadása utáni légzés.

/Élesztő koncentráció: 6,6 mg szárazanyag/3 ml te-
nyészet/
MJE koncentráció: 10^{-3} Mol

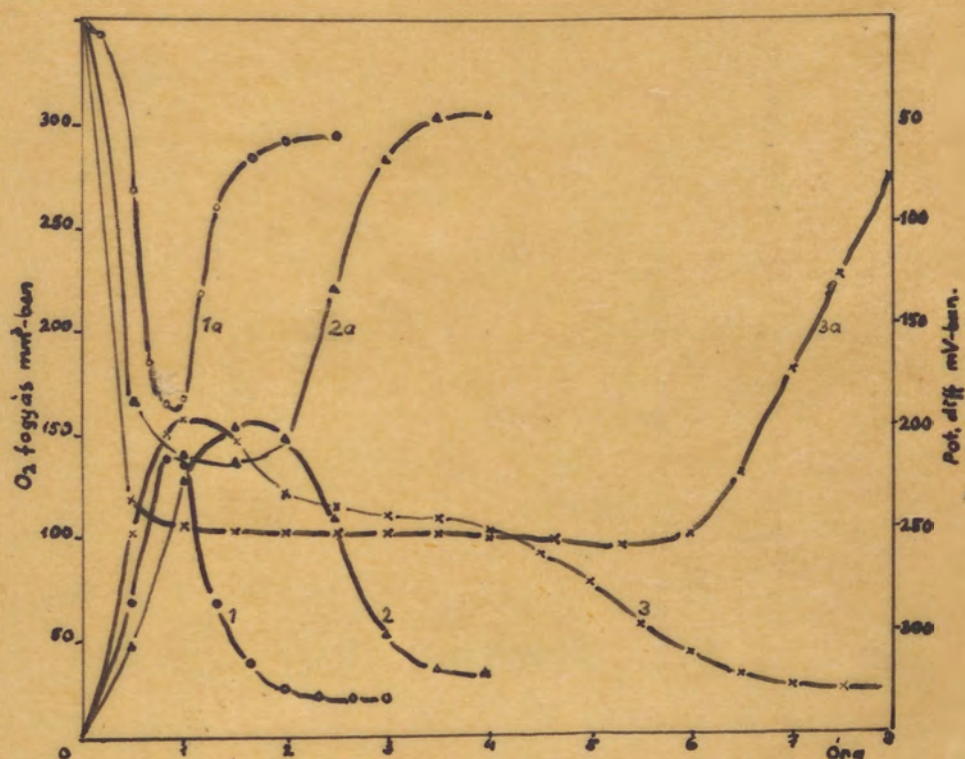
Oxigén fogyás: $\text{mm}^3/3$ ml tenyészet.

Az élesztő által megkötött hemin mennyiségét, annak lehasadását és egyidejűleg az RP változást vizsgálva, megállapítottam, hogy az RP emelkedés együttjár a hemin lehasadásával. Az élesztősejt a számára idegen redox rendszerrel szemben redox pufferként viselkedik. Ez a redox pufferhatás azonban korlátozott. Ha ugyanis növekvő mennyiségben adagolunk az élesztőhöz c-hemint, a légzésnek, illetve az RP-nek eredeti értékre való csökkenése, illetve emelkedése később következik be /5. ábra/.

A gátlási kísérletek redox eredményei is egybehangzóak a légzési görbékkel. A káliumcianiddal gátolt élesztő légzését a hemin nem volt képes felfüggeszteni, csak amikor a káliumcianid gátló hatása már megszűnt. Ugyanilyen körülmények és viszonyok között a káliumcianiddal gátolt élesztőhöz hemint adva, a jellemző redox csökkenés sem következik be. Ebből nyilvánvaló tehát, hogy az a feltevés, amely szerint a heminnak az élesztő valamely fehérjéjével alkotott komplexuma esetleg helyettesíteni tudja a káliumcianiddal gátolt légzőferment szerepét, - nem helytálló.

A monojódecetsavas gátlásnak a c-heminnel való felfüggesztése nemcsak légzésfokozásban, hanem az RP-nek gátlás nélküli körülmények között tapasztalt szintre való lecsökkenésében is kifejezésre jut /6. ábra/.

6/ A c-heminnel kapcsolatban Barkan és Schales feltételezték, hogy az esetleg a citokrom C hemin komponense lenne. Kromatográfiás eljárással kísérelték meg a tisztítását, de



5. ábra

Az élesztő légzésének és RP-jének változása különböző mennyiségű c-hemin hozzáadása után

1. Légzésváltozás 25γ c-hemin/3 ml élesztő tenyészet

1.a. RP változás " " " " "

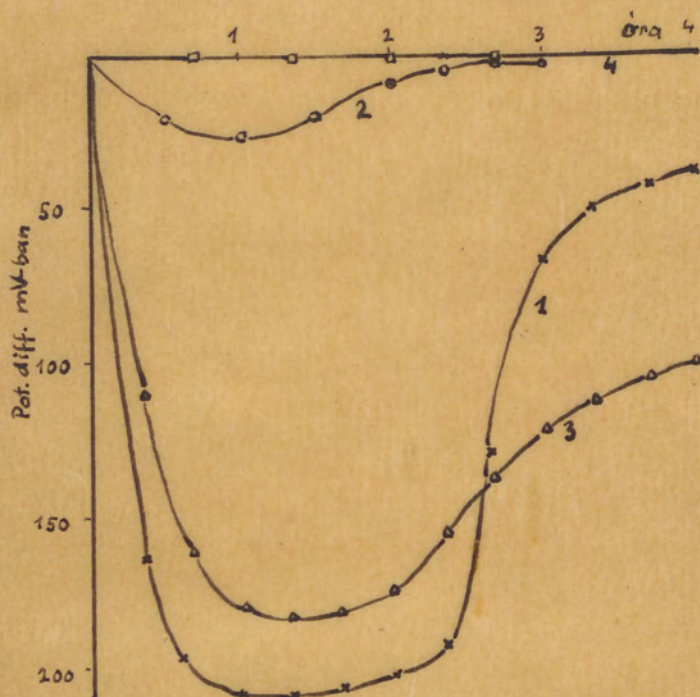
2. Légzésváltozás 100γ " " " " "

2.a. RP változás " " " " "

3. Légzésváltozás 200γ " " " " "

3.a. RP változás " " " " "

Élesztő koncentráció 6,6 mg szárazanyag/3 ml tenyészet.



6. ábra

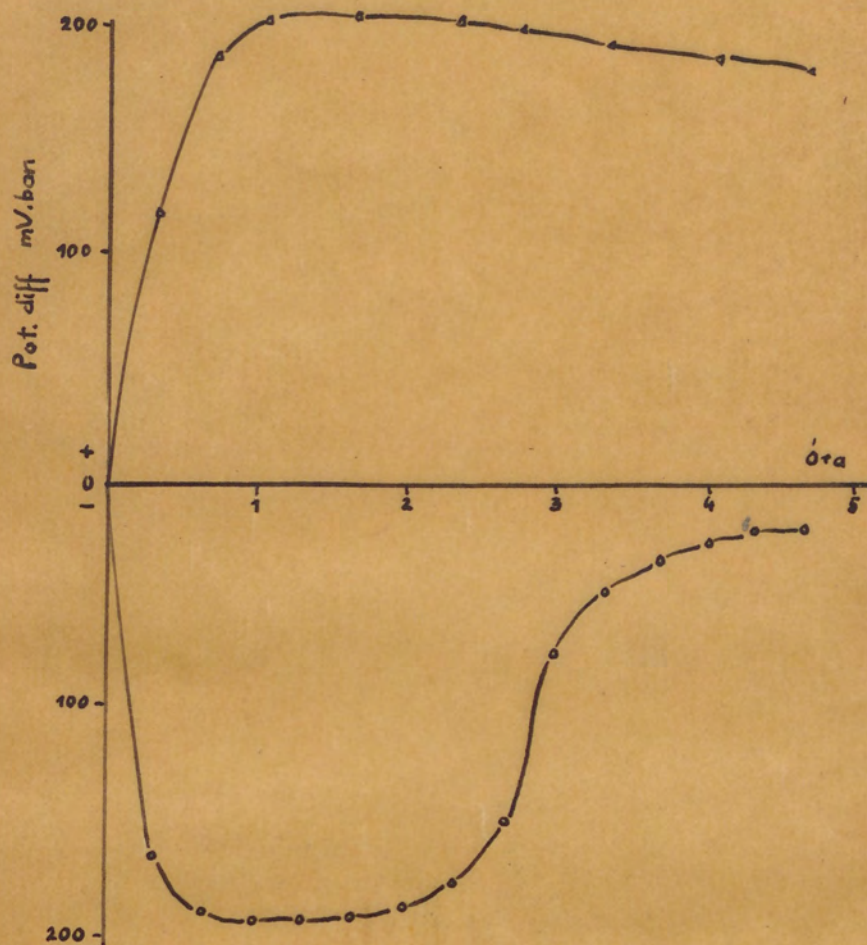
Élesztő-c-hemin komplexum RP változása káliumcianid és monoiodoecetsav hatására

1. Az élesztő RP változása c-hemin hatására
 2. 10^{-3} Mol KCN-dal gátolt élesztő RP változása c-hemin hatására
 3. 10^{-3} Mol MJE-val gátolt élesztő RP változása c-hemin hatására
 4. Az élesztő szűrlet RP változása c-hemin hatására
- /A használt élesztő tenyészet szárazanyag tartalma és a hozzáadott c-hemin mennyiség megfelel a 3. és 4. ábrán megadott viszonyoknak./

ezzel a módszerrel nem tudták biztonsággal eldönteni a két anyag azonos, illetve különböző voltát. Megvizsgálva a citokrom C-nek az élesztő szuszpenzióra kifejtett hatását, azt találtam, hogy légzése nem változik lényegesen, viszont az RP-ben nagyfokú emelkedés jön létre a c-heminel létrehozott redox csökkenéssel szemben. Ez a különbség tehát világosan bizonyítja, hogy két különböző anyagról van szó. A citokrom C-élesztő rendszer RP-je az élesztő-heminrendszerrel ellentétben hosszú ideig állandó marad, ami azt bizonyítja, hogy a sejt a számára testazonos porfirinrendszerrel szemben nem fejt ki redox puffer hatást./7. ábra/

7/ Az eddigi vizsgálatok alapján kiderült, hogy a c-hemin olyan módon fejt ki hatását, hogy a sejtekhez kapcsolódik. Ez a kapcsolódás azonban csak átmeneti, a c-hemin a sejtekről újra leválik, s a tenyészet eredeti RP-je ismét helyreáll. Eszerint a sejtekben végbemenő sterin szintézis a tenyészet alacsony RP-jéhez kötött folyamat és feltételezhető, hogy a táptalajba vitt RP-csökkentő anyagokkal a sterin-szintézis fokozható. A bevezetésben már említett tioglikolsav bizonyult e célra legmegfelelőbbnek.

Kísérleteimben azonos körülmények között tenyésztett élesztőkultúrákhoz változó mennyiségű tioglikolsavat adtam, s mértem az RP-változást és a keletkezett ergosterin mennyiségét. A tioglikolsavat általában az ötödik napon adtam a tenyészethez, amikor a jellegzetes növekedési görbe állandó értéket vett fel, s közelítőleg minden tenyészet RP-értéke azonos volt. Az egyes tenyészetek RP-értékei beoltáskor



7. ábra

Az élesztő RP változása c-hemin és citokrom c hatására

1. Élesztő RP változása 100γ c-hemin hatására

2. " " " " 100γ citokrom c "

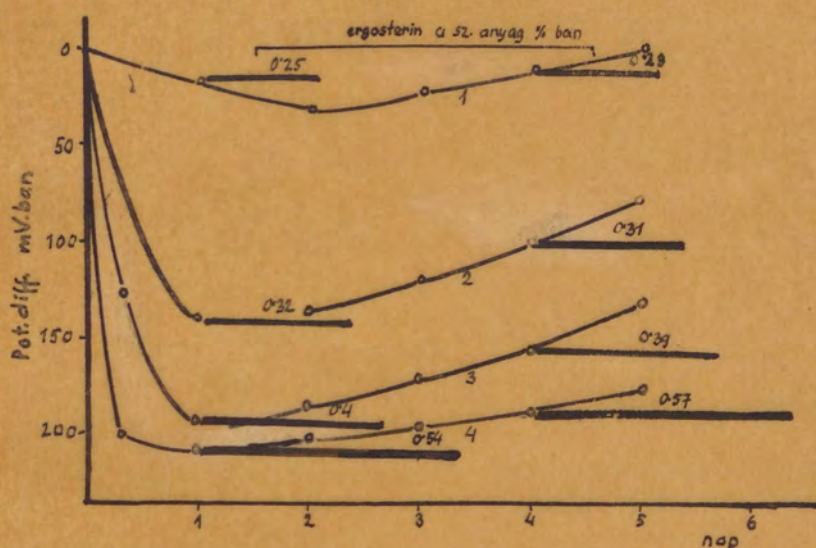
/Élesztő koncentráció 6,6 mg szárazanyag/3 ml
tenyészet/

egymástól igen eltérőek. Ennek oka, hogy a táptalajnak is van egy bizonyos RP-je, amely nagymértékben függ az elnyelt oxigén mennyiségétől. A szaporodó sejtek azonban kimerítik a táptalaj redox kapacitását és a tenyésztés ötödik napján az összes tenyészet RP-je azonos szintre áll be.

Tioglikolsav hatására a tenyészetek RP-je kb 200 mV-tal csökken. Ez a csökkent RP már igen csekély mennyiségű /10 gamma/ml tenyészet/ tioglikolsav hatására napokig állandó marad. A 8. ábrán a különböző mennyiségű tioglikolsav hatására kialakuló RP-görbék láthatók, a táblázat pedig a tioglikolsav bevitelét követő napon bekövetkező ergosterin termelést mutatja. A négy nap múlva vett mintákban az ergosterin tartalom nem változik, tehát a termelés már az első napon elérte a maximumot.

Élesztőtenyészetek ergosterintartalmának változása
különböző mennyiségű tioglikolsav hatására

Sor- szám	Tioglikolsav mg/100 ml tenyészet	Élesztő sz.anyag g/100 ml tenyészet	Ergosterintartalom mg/100 ml tenyészet		Ergosterin az élesztő sz.anyagára számítva
			1. nap	4. nap	
1.	0	0,32	0,8	0,9	0,28
2.	5	0,31	1,0	0,96	0,33
3.	50	0,34	1,36	1,35	0,40
4.	100	0,295	1,6	1,68	0,53



8. ábra

Klesztőtenyészet RP-jének változása tioglikolsav hatására

1. Kontrol tenyészet
2. 0,05 mg TGS/ml tenyészet hatására bekövetkező RP változás
3. 0,50 mg TGS/ml tenyészet hatására bekövetkező RP változás
4. 1,00 mg TGS/ml tenyészet hatására bekövetkező RP változás

/A megadott TGS-értékek azonos módon készült tenyészetek 1 ml-ére vonatkoznak. A görbéhez felrajzolt sávok a megfelelő ergosterin-tartalmat szemléltetik, az élesztő szárazanyagára számított %-ban kifejezve, a TGS-el történt közlés utáni 1., illetve 4. napon./

A kísérletekben alkalmazott metodika tárgyalása

Kísérleteimben először a budapesti Szesz- és Élesztőgyártól kapott III. generációju élesztővel dolgoztam. Az általában használt élesztő szuszpenziót ebből úgy készítettem, hogy 2 g-ot lemérve fiziológiás sóoldatban szuszpendáltam, majd lecentrifugáltam. E műveletet megismételve az esetleges szennyezéseket eltávolítottam. Az átmosott élesztőt ezután pH: 7 foszfát pufferral 100 ml-re egészítettem ki. Az ilyen módon és mindig frissen készített élesztő szuszpenziót használtam fel a légzési és redox vizsgálatokban. Az élesztő szuszpenzió koncentrációját nefelométerrel állítottam be. Különböző töménységű, illetve hígításu élesztő szuszpenziókat készítve, amelynek szárazanyag tartalmát külön-külön meghatároztam, standard görbét vettem fel. Ennek alapján a koncentráció beállítás könnyen és gyorsan történt. Így ismeretlen koncentrációju szuszpenzió szárazanyag tartalmát a mért áteresztőképesség alapján rögtön le lehetett olvasni.

A későbbiekben, főként az ergosterin anyagcsere vizsgálatoknál felső erjedésű *Saccharomyces cerevisiae* törzs néhány napos tenyészetét használtam, amelyet a következő táptalajon tenyésztettem:

glucose	10,0 g	NaCl	1,0 g
pepton	1,0 %	KNO ₃	0,8 "
KH ₂ PO ₄	2,0 "	MgSO ₄	0,25 "
/NH ₄ /2SO ₄	1,0 "	CaCl ₂	0,15 "

let szerint a szereplő anyag oxidált és redukált alakjának arányától függ. A normál H_2 elektródra mint standardra vonatkoztatott elektród potenciál értéke a következő egyenlettel fejezhető ki:

$$E = E_0 + \frac{0,06}{n} \log \frac{ox}{red}$$

Ebből nyilvánvaló, hogy a redox potenciál E függ E_0 -tól, amely a rendszernek állandója, és vizsgált anyag oxidált és redukált alakjának arányától. Minél magasabb az oxidált alak koncentrációja, annál magasabb és annál alacsonyabb, illetve negatívabb, minél több a redukált alak. E_0 konstans értéke akkor, ha az $ox = red$, vagyis, ha a rendszer 50 %-ban van oxidálva, éppen E -vel egyenlő.

Hangsúlyozni kell, hogy E az intenzitásnak és nem a kapacitásnak a mértéke. Mivel E értéke csak az anyag oxidált és redukált alakjának arányától függ, és nem az abszolút mennyiségektől, ezért nem ad felvilágosítást a rendszer redox kapacitásáról és független a kiegyenlítő hatástól. Különösen fontos ez biológiai rendszereknél, amelyek közül soknak jól definiált elektród potenciálja van, de nincs kiegyensúlyozva. A rendszer redox kapacitása a jelenlevő oxidált és redukált komponensek abszolút mennyiségeinek függvénye. Egységnyi redox kapacitású rendszernek célszerű azt az oldatot venni, amelynek 1 literre egy egyenértéksúlynyi redukáló vagy oxidáló szert képes oxidálni vagy redukálni. Ennek megfelelően több komponensű redox rendszer redox kapa-

citásának értéke az RP szinttől függően változhat. Általánosan a következő képlettel számíthatjuk ki:

$$r \cdot c_E = n \frac{x_m \cdot n}{x_r}$$

ahol rc_E az EmV-ra vonatkoztatott redox kapacitás, x_m a mérőoldat ml-ének száma, n annak normalitása, x_r a felhasznált vizsgálandó oldat ml-ét jelenti.

Ha egy redox rendszeren belül a $[H^+]$ változik, akkor az ion egyensúly megváltoztatásával az oxidációs és redukációs komponensek mennyiségében is eltolódás következhet be. Az RP megváltozása kiszámítható a tenyészetben uralkodó H_2 gáz parciális nyomásának és a $[H^+]$ -nak figyelembevételével. Az rH kifejezés bevezetésével, - amely a pH analógiájára a rendszerrel egyensúlyban lévő H_2 gáz parciális nyomásának negatív logaritmus, - a RP értéket kifejező egyenlet egyszerű összefüggést állapít meg az E, rH és pH között

$$E = 0,03 / rH - 2pH /$$

ebből rH értékét kifejezve:

$$rH = \frac{E - 58 \text{ pH}}{29}$$

A pH hatása a redox potenciálra változó és különböző más-más pH intervallumban. Annak ellenére, hogy ez a hatás komplex, nem szükségszerűen nagy, s a pH-kénti differencia hibahatáron belül esik, ha biológiai rendszerekkel dolgozunk.

A potenciál méréseket egy kalomel elektróddal szembekapcsolt sima Pt elektródon végeztem, Metrohm-féle titriszkóppal.

A kísérleti viszonyokat a légzés vizsgálatoknál alkalmazott viszonyokhoz hasonlóan állítottam be, s ezért nyitott rendszerrel dolgoztam, s levegőztetésről mágneses keverővel gondoskodtam.

A steril körülmények között tenyésztett élesztő esetén vattadugó segítségével építettem be az elektródokat a tenyészetbe. Erre a célra a Kovács-Matkovics ^{/18/} által leírt elektród megoldás volt a legalkalmasabb. E módszernél a kalomel elektród agar hidját olyan üvegcső helyettesíti, amelynek egyik végébe mázatlan porcellán lemez van beforrasztva, s e fölé 2 % agar-agar tartalmu, hidegen telített KCl-oldatot rétegeztem. Az így elkészített üvegcső a kalomel elektród befogadására szolgál. A kalomel elektród botalakú, s így mérés alkalmával az agar csőbe könnyen beleilleszthető. Az így összeállított elektródnál a porcellán mint diafragma szerepel a telített KCl-os agar és a mérendő táptalaj között. A porcellán diafragma megakadályozza a fertőző mikroorganizmusok táptalajba kerülését és a sterilizálásnál viszkózussá váló KCl-os agar táptalajba jutását. A botalakúra kiképezett elektródot csak a mérés idején visszük a mérendő rendszerbe, és a mérésen kívül telített KCl-oldatban tartjuk.

A mérések reprodukálhatósága szempontjából fokozott gondot kell a Pt elektródokat is előkészíteni. Kielégítő eredményeket kaptam, ha a Pt-elektródokat forró kénsavban tartottam egy óra hosszat és azután kétszer desztillált víz-

zel lemosva 24 óra hosszat kétszer desztillált vízben állni hagytam.

C-hemin előállítás

A c-hemin oldat készítéséhez defibrinált marhavért használtam, amelyet centrifugálással különítettem el a szérumtól. A vörösvértesteket két alkalommal 0,85 % NaCl-oldattal mostam, majd annyi víz hozzáadásával hemolizáltam, hogy a végtérfogat a kiindulásinak ötszöröse legyen. 500 ml 1:5 hígításu marhavér oldathoz 500 ml 0,8 % sósavban oldott 1 g pepszint adtam. Az enzimatisz lebontás elősegítésére 24 órára, 37°-os termosztátba helyeztem. A c-hemin leválasztása éteres kezeléssel történt. A normál hemin ugyanis az éteres fázisban ibolya színnel oldódott, a vizes fázis barna színű, s a fázis határon denaturálódott fehérje lebomlási termékek váltak ki. A különválasztott vizes fázis éteres mosását addig folytattam, amíg az éteres fázis színtelen maradt. A vizes fázis - megszabadítva az oldott étertől és a kivált normál hemin csapadéktól - alkalikus redukció és piridin hozzáadása után a szerzők által megadott hemochromogen spektrumot adta, jellemző maximummal 549 és 520 m μ -nál, amely lényegesen különbözik a normál hemin hemochromogen spektrumától. A c-hemin tisztítása Brockman alumínium-oxidon történt.

Metanol : 5 % piridin eleggyel, majd piridinnel eluáltam a szennyezéseket, a c-hemint 2 N ammoniumhidroxiddal oldottam le.

Vas meghatározás

A c-hemin oldat koncentrációját a benne lévő vas meghatározásával állapítottam meg. Erre a célra Foster De Snell/19/ módszerét használtam fel, amely a ferri ion o-phenantrolin létrehozott színreakciójának kolorimetriás mérésén alapszik. Standard oldatként pontos beméréssel készült 0,1 mg ferri ion/ml tartalmú ferriammonszulfát oldatot használtam. A standard görbe készítéséhez ebből az oldatból 20, 40, 60, 80, és 100 gamma ferri iont tartalmazó mennyiségeket mértem be egy-egy 50 ml-es lombikba, s esetenként 30 ml desztillált vizet és 1 ml 10 %-os hidroxilaminklórhidrátot adtam hozzá. 15 percnyi állás után 10 ml 0,25 %-os o-phenantrolin oldatot mértem bele, s 25 %-os natriumcitráttal a pH-t 3,5-re állítottam. Desztillált vízzel 50 ml-re kiegészítve, összeráztam és 30 percnyi állás után mértem. Kontrollként a használt reagensek ugyanolyan arányu oldata szolgált a ferri-oldat nélkül.

Pulfrich fotométerrel 10 mm-es küvettában s 50 szűrővel mértem.

A hemin oldat koncentrációjának meghatározása a vas-tartalom alapján a vas atomnak ferri ionná történő oxidálásával, illetve a hemin molekula elroncsolásával történt. A hemin oldat aliquot részéhez, amely 0,015 - 0,060 mg vasat tartalmaz, 0,5 ml 30 %-os hidrogenhiperoxid-oldatot adtam. Alapos összekeverés után legalább 3 óra hosszáig állt, majd 10 percig tartó 90°-os melegítés /a fölösleges H_2O_2 elbon-

tása céljából/ és lehűtés után 1 ml 1:15 hígítási HCl-al ismét 10 percig 90° -ra melegítettem. Lehűlés után 0,2 ml 50 %-os ammoniumacetát hozzáadásával pufferolt oldat-al-kalmas a standard görbe készítésénél leírt színreakció lét-rehozatalára.

Ergosterin meghatározás

Az ergosterinnek az élesztő sejtekből való kiszabadítása hidrolizissal történt. A tioglikolsavval kezelt és a kont-rolyanyagból egyidőben vett mintákat lecentrifugáltam és az élesztő üledéket 5 % KOH-ot tartalmazó alkohol és viz 1:1 arányu elegybe szuszpendáltam, majd 4-5 órán ke-resztül visszafolyó hűtővel ellátott lombikban forró viz-fürdőn hevítettem. A hidrolizátumot ezután háromszor 50 ml benzollal extraháltam. Az extraktumot N NaOH-dal, hig kén-savval, majd desztillált vízzel többször átmostam, végül klizitott nátriumsulfáttal megszárítottam. A száraz ol-datot vakuumban bepároltam, s a maradékot széntetraklorid-ban oldottam. Ha a minta ergosterin tartalma magas volt, akkor a széntetrakloridos törzsoldat aliquot részét hasz-náltam méréshez. Az ergosterin mennyiségének kvantitatív meghatározása a Liebermann-Buchard-féle színreakció alap-ján Pulfrich-féle fotométerrel történt. A standard görbe készítéséhez 0,3 mg/ml széntetrakloridos ergosterin törzs-oldatot használtam, s ebből 10-60 gamma mennyiségeket tar-talmazó törfogatokat 3 ml-re egészítettem ki széntetra-kloriddal. 2 ml ecetsavanhidrid és 0,1 ml cc kénsav hozzá-

adása után alaposan összeráztam, majd 10 perc eltelte után a zöld szín intenzitását S 66-os szűrővel mértem. Az ismeretlen minta meghatározása teljesen azonos körülmények között történt.

Összefoglalás

Vizsgálataim célja annak a megállapítása volt, hogyan lehet egy mikroszervezet tenyészetének anyagcseréjét az RP-t megváltoztató tényezőkkel befolyásolni. Kísérleteim első részében megállapítottam, hogy a vas-porfirin rendszerek közül a c-hemin az élesztő endogén légzését jelentősen fokozza, s közben a tenyészet RP-je erősen csökken. Ez a csökkenés párhuzamos a légzés növekedésével, minimális értéke a maximális légzésnél következik be, majd annak csökkenése után ismét megközelíti eredeti értékét.

A továbbiakban végzett gátlási kísérletek arra engedtek következtetni, hogy az általam modellként használt élesztő c-hemin komplexumban a c-hemin a triosefoszfátdehidraset helyettesíti. Az élesztő a számára idegen hemint spontán enzimadaptáció folytán a kapcsolódás megszüntetésével eltávolítja, és a kezdetben megváltozott RP-t helyreállítja.

A citokrom $\bar{C}$ az élesztőtenyészetben tartós RP emelkedést létesít. A sejt a számára nem idegen anyag jelenlétében nem fejt ki redox puffer hatást.

Az említett elvi kérdések tisztázása után céлом főleg az volt, hogy az élesztő ergosterin termelését megnöveljem, és felderítsem a redox görbe és a tenyészet ergosterin termelése közötti összefüggéseket. Megállapítottam, hogy az RP tartós megváltoztatására csak olyan anyagok alkalmasak, amelyek redox kapacitása megközelíti a tenyész-

tekét. Megfelelő redox rendszerek alkalmazásával a tenyészetek termelési fázisa meghosszabbítható és ezáltal egyes anyagcseretermékek termelése növelhető.

Köszönetnyilvánítás.

A doktori dolgozat a Szegedi Orvostudományi Egyetem Vegytani és Biokémiai Intézetében készült. Ezúton mondok köszönetet Dr. Krámlí András professzor úrnak, aki munkámban igen sok segítséget és támogatást nyújtott, elsősorban a téma megjelölésével, majd annak kidolgozása során hasznos útmutatásaival és tanácsaival.

Irodalom

- 1/ Kárpátiⁿe, Stur J.: Biológiai Közlemények /1957/ 5, 51.
- 2/ Krámlí A.: Biológiai Közlemények /1954/ 2, 7.
- 3/ Grossberger: Hyg. Infekt. /1879/ 25, 453.
- 4/ Davis W.A.: J. Infect. Dis. /1917/ 21, 392.
- 5/ Thjötta T.: Journ. exp. Med. /1921/ 33, 763.
- 6/ Lwoff A.: Bull. soc. chim. biol. /1948/ 30, 817.
- 7/ Kuhn R., K. Meyer: Z. physiol. Chem. /1929/ 185, 193.
- 8/ Warburg, O.: Bioch. Z. /1930/ 227, 184.
- 9/ Barkan G., Schales O.: Z. physiol. Chem. /1937/ 246, 181.
- 10/ Halden W.: Z. physiol. Chem. /1934/ 225, 249.
- 11/ Neuberg C.: Ann. Rev. /1946/ 15, 443.
- 12/ Tauson, T.A.: Microbiology /U.S.S.R./ /1942/ 11, 46.
- 13/ Zorkóczy Gy.: Chem. Abstr. /1943/ 37, 5190.
- 14/ Maguigan, W.H.; Walker, E.: Bioch. J. /1940/ 34, 804.
- 15/ Bennett, W.G.: U.S. Patent /1942/ 2276,710.
- 16/ Hutterer, F.: Biokémiai pályamunka /1953/.
- 17/ H. Holzer: Angew. Chem. /1954/ 66, 65.
- 18/ Kovács E., Matkovics B.: /1954/ Kísérletes Orvostudomány
6, 527.
- 19/ De Snell, F.: /1949/ Colorimetric methods of analysis.

II. Van Nostrand Co., N.Y.

