

**ASPERGILLUS NIGER HIÁNYMUTÁNSOK FELHASZNÁLÁSA  
AMINOSAVAK KVANTITATIV MEGHATÁROZÁSÁRA**

**Doktori értekezés**

**CZAKÓ MIHÁLY**

**Készült**

**a József Attila Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékén**

**1975**

## TARTALOMJEGYZÉK

### TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
1. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ IRODALOM ÉS A MEGHATÁROZÁSSAL KAPCSOLATOS FELADATOK	4
1.1. A mutánsok előállításának és izolálásának kérdései	4
1.2. Az agargél-diffúziós eljárás és a "large plate" technika	7
2. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
2.1. A teszt mikroorganizmus	10
2.2. Tápközegek	10
2.3. Kémszerek, oldatok	13
2.4. Módszerek	15
2.4.1. A sugárdózis meghatározása	15
2.4.2. A mutánsok előállítása és szelektálása	15
2.4.3. Az aminosav igény meghatározása	16
2.4.4. Az indikátor kiválasztása és az optimális festékkoncentráció meghatározása	17
2.4.5. Az optimális pH-érték kiválasztása	18
2.4.6. A megfelelő puffertöménység és rétegvastagság meghatározása	19
2.4.7. A konidium mennyiség és a vitaminok hatásának vizsgálata	19
2.4.8. A cukor koncentráció hatásának vizsgálata	20
2.4.9. A "nagylemez" módszer alkalmazása	21
2.4.9.1. A lemezek elkészítése	21
2.4.9.2. A lemezöntés	22

2.4.9.3. Az elrendezési tervek	22
2.4.9.4. A korongok elhelyezése ill. a furatok elkészítése és a zónák mérése	25
3. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	26
3.1. A sugárdózis meghatározása	26
3.2. A mutánsok előállítása, szelektálása és aminosav igényének meghatározása	27
3.3. Előkísérletek a méréshez szükséges opti- mális összetételű tápközegek meghatározására	29
3.3.1. Az indikátor kiválasztása és az opti- mális festékkoncentráció	29
3.3.2. Az optimális pH-érték	30
3.3.3. A puffertöménység és rétegvastagság	30
3.3.4. A konidium mennyiség és a vitaminok	30
3.3.5. A cukor koncentráció	31
3.3.6. A konidium szuszpenzió és az aminosav együttes felvitele a korongra	32
3.3.7. Az inkubációs idő hatása	32
3.3.8. A metionin stereoizomerjeinek szerepe	33
4. A "HAGYLEMEZ" MÓDSZER MÉRÉSI EREDMÉNYEI ÉS MATEMATIKAI STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉSE	35
4.1. A metionin mennyiség és a zónaátmérők közötti összefüggés vizsgálata	35
4.1.1. A zónaátmérők, a konidiumsűrűség és az inkubációs idő közötti összefüggés nagy lemezeken	35
4.1.2. A konidiumok stimulációja élesztő- kivonattal	38

4.2. A lyukdiffúziós és papirkorongos mérési módszer összehasonlítása	39
4.3. A minta aminosavtartalmának meghatározásá- ra szolgáló számítási módszerek	46
4.3.1. Grafikonos megoldás	47
4.3.2. A fordított regressziós egyenlet ki- számítása	47
4.3.3. Számítás a mérési adatokból	48
4.3.4. A nomogrammos megoldás	50
4.4. Vizsgálati minták mérési eredményei, szórás és hiba	56
MEGBESZÉLÉS	61
ÖSSZEFOGLALÁS	63
IRODALMI HIVATKOZÁSOK	65



## BEVEZETÉS

Az aminosavak mennyiségi meghatározása mind a biológiai, mind a mezőgazdasági és élelmiszeripari kutatások számára nélkülözhetetlen. A kémiai analitikai eljárások jelenlegi fejlettsége nem teszi lehetővé olcsó, rutinszerű vizsgálatok elvégzését.

Az ioncserélő oszlopkromatográfia elvének alapján működő automata aminosav analizátorok nagy összegű beruházást, drága vegyszereket, és szakképzett kezelő személyeket igényelnek. A Dévényi T. /1972/ által leírt és szabadalmazott vékonyrétegű ioncserélő kromatográfias lemezek is viszonylag költségesek és a mennyiségi analízis szempontjából félkvantitatív eljárásnak tekinthetők. A kémiai módszerek nehézségei miatt próbálkoztak már többen a mikrobiológiai módszerek alkalmazásával.

Kavanagh, F. /1973/ összefoglaló művében említi - elsőként Wood, H. és mtsai. /1939-40/ javasolták - , hogy mikroorganizmusokat fel lehetne használni aminosavak mérésére, de ebben az időben kevés ismerettel rendelkeztek a baktériumok aminosav igényével kapcsolatban. Az első teszt mikroorganizmus a *Lactobacillus arabinosus* volt, amelyet leucin, i-leucin és valin mérésére használtak fel /Kuiken, K.A. és mtsai, 1943/.

A későbbiekben a *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042, *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 ill. 8043, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081 törzseket irták le leggyakrabban. A mérésekhez egyaránt felhasználták a fényáteresztő-képesség csökkenésének mérésén alapuló turbidimetriás méréseket, valamint az agargél-diffúziós eljárásokat.

Tejsavbaktériumokkal végzett széleskörű vizsgálatokat Bolinder, A.E. is /1966, 1968, 1969/ összehasonlítva az agargél-diffúziós eljárást a turbidimetriás módszerekkel, a különböző törzsekkel elérhető eredményeket, a metionin származékok hatását, a minták hidrolizálásának módját stb. A metionin meghatározására 3-1000 µg mérési tartományban 7 % pontosságú módszert tudott kidolgozni, agargél-diffúziós eljárás esetén. A módszer hátránya, hogy e törzsek használata esetén a tápközegbe 40-50 féle anyag jelenlétéről kell gondoskodni. A tápközeg szigorúan előírt összetétele meghatározója a módszer pontosságának. Továbbá a természetes eredetű anyagok számtalan összetevőjének hatása nehezen kimérhető.

Ennek kiküszöbölésére Itoh, H. /1974/ egy egyszerűbb, félszintetikus táptalajt dolgozott ki, illetve az inkubálási idő csökkentésére három lépéses átoltást alkalmazott /Itoh, H. 1973/.

A szerzők mindegyike hangsúlyozza, hogy a mikrobiológiai eljárás előnye, a nagyfokú szelektivitás és az, hogy nem igényel drága vegyszereket, illetve költséges berendezéseket. Ezért célul tűztük ki, hogy a felsorolt baktériumokkal történő mérés nehézségeit egy könnyebben kezelhető mutáns felhasználásával kiküszöböljük. A cél megvalósítására egyszerű minimál táptalajon - a törzs számára eszenciális aminosav jelenlétében - *A. niger* mutánsokat állítottunk elő. Ezután a tápközeg összetételének és a mérés kísérleti feltételeinek optimalizálása után, az irodalomból jól ismert agargél-diffúziós eljárásokkal kidolgoztuk egy aminosav kvantitatív meghatározását.

## 1. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ IRODALOM ÉS A MEGHATÁROZÁSSAL KAPCSOLATOS FELADATOK

### 1.1. A mutánsok előállításának és izolálásának kérdései

Az eredeti, "vad" törzsektől eltérő tulajdonsággal rendelkező mutánsokat mind az elméleti kutatásban, mind a gyakorlatban /fermentációs iparok, mikrobiológiai analitika/ széleskörűen felhasználják.

A mutánsok képzésére kémiai és fizikai ágensek egyaránt felhasználhatók. A mutációt kiváltó vegyszerek /nitrozoguanidin, nitrogénmustár stb./ azonban az emberre nézve is veszélyesek, a velük végzett munka fokozott elővigyázatosságot igényel.

A tapasztalatok szerint az ultraibolya sugárzás is eredményesen használható a mutánsok előállítására. A mutáció gyakorisága akkor a legnagyobb, ha a pusztulás 80-99 % között van. Ehhez azonban előkísérleteket kell végezni a sugárdózis megállapítására.

A haploid szervezetek érzékenyebbek az ultraibolya sugárzásra, a sugárzáskor nagyobb arányban keletkeznek mutánsok és a sokféle antibiotikus közül a megfelelőt kiválasztva lehetőség nyílik a mutánsok feldúsítására és izolálására. /Holland, K.T. and C. Ratledge, 1971, Lederberg, J. and Lederberg, E.M. 1952/



A gombák genetikájával foglalkozik, ezen belül a mutánsok izolálásának módszereit is ismerteti Fincham, J.R.S. és Day, P.R. /1971/ összefoglaló művében.

A gombáknál is - elsősorban az élesztőknél - többen megpróbálkoztam a vad típusú törzsek szelektív kipusztításával. Strömnaes és Mortimer /1959/ élesztőknél, Macdonald, K.D. /1968/ *Penicillium auxotrof* mutánsok izolálásánál alkalmazta a nystatin szelektív hatását, Ferenczy L. és Visnyovszki E. /1971/ szintén élesztő mutánsok antibiotikumokkal történő dúsitásáról számol be, Visnyovszki E. /1972/ membrán-aktiv és fehérjeszintézist gátló anyagokkal oldotta meg a *Geotrichum candidum* mutánsainak szelektív dúsitását.

A vad típusú sejtek szűréssel történő eltávolításán alapul Catcheside, D.G. /1954/ módszere. Ennek lényege, hogy a fogékony minimál tápközegben besugárzott és túlélő konidiumok közül, egy bizonyos inkubációs idő elteltével, a vad típusú törzsek kihajtanak. A meg-növekedett gombafonalak üvegszűrőn történő szűrésnél fennmaradnak, a mutánsok konidiumai pedig a lecsepegő folyadékban feldúsulnak. Ezt követően szelektív táptalajon végzett lemezöntéssel a mutánsok izolálhatók.

E szűrési módszer hátránya, hogy a szűrőn a hifa tömeg között sok értékes konidium visszamarad, ill. nem minden esetben alkalmazható.

Egyszerűbb eljárás az, ha megfelelő mennyiségű és sűrűségű konidium szuszpenziót univerzál táptalaj felületére kenve, a kívánt ideig besugározzuk. A kinőtt telepek konidiumait univerzál és minimál táptalajra átoltjuk. A minimál tápközegen nem fejlődő mutánsok a másik lemezről begyűjthetők. Az izoláláshoz megfelelő körültekintéssel a bársonyreplika módszer is alkalmazható. Ezzel az eljárással a tápanyagigényes auxotrof mutánsok izolálhatók. A módszer hátránya, hogy több munkát, illetve időt igényel mint más eljárások.

A téma kidolgozása során megpróbáltam a nitrozóguanidin és  $\text{NaNO}_2$  felhasználásával, valamint a szűréssel történő dúsitási eljárással is, de egyszerűsége miatt az előbbi bekezdésben ismertetett eljárást alkalmaztam.

## 1.2. Az agargél-diffúziós eljárás és a "large plate" technika

Az agargél-diffúziós eljárások /papirkorong, lyukdiffúzió, cylinder/ széles körben alkalmazott módszerek a gátlóanyagok /kemoterápiikumok, antibiotikumok stb./ és tápanyagigény mérésére /vitamin, aminosav, egyéb/. A tapasztalatok szerint a papirkorong használata gyakran célszerűbb, mert könnyen kezelhető, a lyukdiffúziós módszer pedig pontosabb.

Az aminosavak mérése elvileg azáltal válik lehetővé, hogy az auxotrof törzsek minimál táptalajon csak a számukra eszenciális aminosav jelenlétében fejlődnek. Fejlődésük, anyagcseréjük üteme - egy bizonyos koncentrációig - szoros korrelációban kell hogy legyen a számukra nélkülözhetetlen aminosav mennyiségével. Ezt a feltételezést már számos analitikai mikrobiológiai eljárás igazolta.

A kutatók többsége azonban, az irodalomban többször ismertetett tejsavbaktériumokkal történő mérés kísérleti körülményeinek tökéletesítésével foglalkozott. Nincs tudomásunk arról, hogy eddig az *Aspergillaceae* család valamelyik tagjából mesterségesen nyert mutánsokat alkalmaztak volna. Fonális gombák közül a *Neurospora crassa* használatáról tesznek említést /Kavanagh, F. 1963/.

A fonalas gombával történő méréshez a következő problémákat és feladatokat kellett megoldani:

- a fonalas gombák fejlődésük során a diffúziós zóna szélén nem adnak éles határvonalat;

- meg kellett határozni a teszt mikroorganizmus fejlődését befolyásoló optimális kísérleti körülményeket;

- szükséges volt az aminosav mennyisége és a zónaátmérők közötti összefüggés megállapítása és matematikai elemzése;

- a vizsgálandó minta aminosav tartalmának meghatározására szolgáló módszer kidolgozása.

Az első nehézség kiküszöbölését szolgálta az *A. niger* kiválasztása, amely szénhidrátokból intenzíven savat termel, ezért Ferenczy L. feltételezése szerint megfelelő kísérleti körülmények között éles határvonalú zónát tud képezni /ex verbis/.

A második problémakörben meg kellett vizsgálni a pH, a puffer, a konidiumtöménység, a rétegvastagság, a vitaminok, a cukor koncentráció szerepét, ki kellett választani a megfelelő indikátort, a D-metionint képes-e felhasználni, a DL-metioninnál milyen zónaérték mérhető stb.

A következő témakörben az előkísérletekben szerzett tapasztalatokat felhasználva a "nagylemez" módszer méretarányait kellett meghatározni, kimérve az L-metionin mennyisége és a zónaátmérők közötti törvényszerű összefüggéseket.



Az agargél-diffúziós technikával történő "nagy-lemez" módszerre /large plate method/ Lees, K.A. and Tootill /1955/ dolgozott ki eljárást. Munkájukban rutinszerű elemzésre a 8x8-as "kvázi latin négyzet" elrendezést javasolják, amelyhez alapos matematikai elemzést végeztek és az eredmény kiszámítását nomogramm szerkesztésével könnyítették meg. Módszerükkel  $\pm 5$  %-os mérési hibát értek el, úgy hogy egy lemezen egy standardot és két ismeretlent alkalmaztak két koncentrációban.

Eljárást közöltek még 9x9 és 12x12 "kvázi latin négyzet" használatára is. Az utóbbival nagy pontosságú  $\pm 1$  %-os mérési hibával rendelkező módszer érhető el. Egy latin téglalap elrendezést Levin, J.D. és munkatársai /1960/ a thioestrepton mérésével kapcsolatban ismertettek. Itt egy lemezen 6x9 pontra 1 standardot és 8 ismeretlent vittek fel, mindegyiket három hígításban és 1,5-2% hiba pontosságú mérést sikerült kidolgozniuk.

A nagy lemezen történő "latin négyzet" vagy "kvázi latin négyzet" elrendezési terv lehetővé teszi, hogy az üveglap egyenletlenségeiből az esetleges vizsintezési hibából eredő u.n. helyi hibákat kiszűrjük.

A mérési módszer kidolgozásánál figyelembe vettem az említett szerzők munkáit és a Sváb J. /1973/ művében leírt matematikai elveket és módszereket.

## 2. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. A teszt mikroorganizmus

A kísérletek céljára a JATE Mikrobiológia Tanszékétől származó *Aspergillus niger* 0145 törzset használtam. A konidium szuszpenziót 6-10 napos univerzál agaron nevelt tenyészetekből készítettem. 0,1 % TWEEN 80-at tartalmazó steril vízzel, rázogatózás közben lemostam a konidiumokat. A szuszpenziót G 1-es üvegszűrőn leszűrtem, majd laboratóriumi centrifugában 9000 g érték mellett 10 percig ülepittem. A folyadékot leöntve, a konidium tömeget steril desztillált vízzel hígítottam. A szuszpenzió sűrűségét Bürker-kamrával ellenőriztem és egy-két hétig hűtőben +5 -8°C között tároltam. E közben a konidium szuszpenzió tulajdonságaiban észrevehető változást nem tapasztaltam. A méréseknél mindig frissen készített konidium szuszpenziót alkalmaztam.

### 2.2. Tápközegek

#### 2.2.1. Univerzál agar

10 g glükóz, 5 g élesztőkivonat /Oxoid/, 20 g agar  
1 l vízben oldva. Sterilizés 1 atm nyomáson 30 percig.

A besugárzásnál használt tápközeghez kiöntés előtt 1 ml 2 %-os Bengál-vörös oldatot adtam /20 µg/ml/.

#### 2.2.2. Minimál agar

5 g /NH<sub>4</sub>/<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O , 10 g glükóz, 20 g agar 1 liter desztillált vízben. Sterilizés 1 att. nyomáson 30 percig.

#### 2.2.3. Pufferral készített minimál agar

5 g /NH<sub>4</sub>/<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 10 g glükóz, 10 g Bacto agar /Difco/ 0,5 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 1 liter desztillált vízben oldva. Feltöltés előtt a megfelelő mennyiségű foszfát puffert pipettával mértem hozzá. Nagyobb foszfát töménységnél /teljes és feles puffer/ a foszfátokat Reanal készítményekből, analitikai mérlegen mértem hozzá.

#### 2.2.4. Minimál agar vitaminnal dúsítva

A megfelelően pufferolt minimál tápközeg 1 l-éhez 1 ml Vickerham-féle vitamin oldatot adtam.

2.2.5. Tápközeg a "nagylemez" módszer alkalmazásához

5 g  $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ , 50 g glükóz, 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  
10 g Bacto agar /Difco/, 0,3584 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  és  
0,1950 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 liter desztillált vízben. Sterile-  
zés 1 atm nyomáson 30 percig. A hőkezelés után hozzá-  
adva 10 ml 1,5 %-os brómkrezolbibort és 1 ml Vikerham-  
féle vitamin oldat.

Ez a tápközeg 7 pH-jú, 1/20 puffert és 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
indikátort tartalmaz. A lyukdiffúziós módszerhez az a-  
gar mennyiségét 12 g-ra emeltem.



### 2.3. Kémszerek, oldatok

#### 2.3.1. Bengál-vörös

2 %-os vizes oldatban 1 ml-t adva 1 l tápközeghez, abban 20 µg/ml koncentrációt eredményez.

#### 2.3.2. Aminosavak - mutáns szelekcióhoz

1 mg/ml töménységben 75 %-os etanolban oldva és üveg dugós edényben hűtőszekrényben tároltam. Az aminosav preparátumok Reanal készítmények voltak.

#### 2.3.3. Metilvörös, brómtimolkék oldat

10 mg/ml töménységben 96 %-os etanolban oldva.

#### 2.3.4. Brómkrezolbitor oldat

1,5 g 100 ml 50 %-os alkoholban oldva.

#### 2.3.5. Papirkorongok

Whatman 3 kromatográfiás papirból 13 mm átmérőjű korongvágóval /lakatosok használják gumi és műanyag tömitők vágásához/ lett kivágva és Petri-csészében autoklávban sterilizelve.

2.3.6. Sørensen-féle foszfátpuffer

1./ 11,987 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1 l deszt.vizben

2./ 9,078 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 l deszt. vizben

7 pH-hoz 6:4 arányban kellett elegyíteni, 6 pH esetén 1:9 arányban.

2.3.7. Vickerham-féle vitamin oldat

0,2 mg folsav, 0,2 mg biotin, 40 mg Ca-pantoténát, 200 mg inozit, 40 mg niacin, 20 mg p-aminobenzoesav, 40 mg piridoxin-HCl, 40 mg aneurin-HCl, 20 mg laktoflavin, 100 ml desztillált viz. A folsavból és biotinból előbb 2 mg / 10 ml töménységű törzsoldatot készítettem és ebből 1 ml-t adtam hozzá.

A vitamin oldatot üveg dugós üvegben hűtőszekrényben tároltam és sterilizálás után a tápközegek 1 l-éhez 1 ml-t használtam fel.

## 2.4. Hódszerek

### 2.4.1. A sugárdózis meghatározása

Az univerzális tápközeg felületére 0,2 ml konidium szuszpenziót kentem szét és a csészéket 35, 30 ill. 10 cm-ről különböző ideig /1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 perc/ Germicid csővel besugároztam /Philips TWV/15 W és Tungram EV-291/15 W/, 36-48 órai 30°C-on történő inkubálás után kinőtt telepeket megszámláltam. A konidium sűrűsége a Philips csővel végzett besugárzásnál  $3,0 \cdot 10^3$  volt, amelyet élő csira számlálással határoztam meg. A Tungram csővel végzett besugárzásnál, amikor 10 cm távolságot alkalmaztam  $5 \cdot 10^4$ /ml volt.

### 2.4.2. A mutánsok előállítása és szelektálása

A mutánsok előállításához Tungram EV-291/15 W csővel 30 cm ill. 10 cm-ről 10 perces, valamint egy holland gyártmányú Philips TWV/15 W-os germicid csővel 20 cm-ről 3-4 perces besugárzási időt alkalmaztam. A csészékbe kiöntött bengálvöröst tartalmazó univerzál tápközeg felületére üvegbottal 0,2 ml konidium szuszpenziót kentem szét.

A szuszpenzió sűrűségét Bürker-kamrával ellenőriztem és  $10^4$  sűrűségűre higitottam. Ily módon mindegyik csészébe 2000 db konidium került és a túlélők száma 10-25 között volt. A lemezeket besugárzás után 48 óráig  $30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam. A kinőtt telepekről a konidiumokat bársónyreplika módszerrel vagy egyszerűen kaccsal, univerzál tápközegre és minimál agarra áttoltottam. Az univerzál tápközegről /24 óra múlva/ a minimál agaron nem fejlődő telepeket ellenőrzés végett újra leoltottam minimál tápközegre. Ha az ismétlés is negatív volt, ezt a törzset ferde agarra leoltva félretettem az aminosav, vagy esetleg vitamin igény megállapítása céljából.

#### 2.4.3. Az aminosav igény meghatározása

Az aminosav igény meghatározására a papirkorong módszert alkalmaztam. Az aminosavakból 1 mg/1 ml töménységű oldatot készítettem 75 %-os etanolban, valamint öt olyan oldatot, amelyik az alábbi megoszlásban tartalmazta az aminosavakat /mindegyikből 1 mg-ot 1 ml-ben/:- aszparagin, asparaginsav-glutamin, glutaminsav

- glicin - valin - lizin - szerin
- fenilalanin - tirozin - triptofán - leucin
- arginin - cisztein - hisztidin - prolin
- izoleucin - alanin - treonin - metionin

A minimál tápközeg felületére Petri-csészében a vizsgálandó törzs konidium szuszpenziójának 0,2 ml-ét szélesztettem el  $10^5$ - $10^6$  konidium/ml /. Öt Petri-csészébe egyesével felraktam az aminosav csoportokat tartalmazó korongokat. 24-48 órai  $30^\circ\text{C}$ -on történő inkubálás után megfigyelhető volt, hogy melyik aminosavcsoportot tartalmazó korong körül van fejlődés.

A következő kísérletben az e csoportba tartozó aminosavakat egyesével vittem fel a korongra és az előzőhöz hasonló módon jártam el. Amelyik aminosav hatására a növekedés megindult, arra nézve dependens. A korongokra 0,05 ml-nyi aminosavat cseppentettem és szikkasztás után kerültek felhasználásra.

#### 2.4.4. Az indikátor kiválasztása és az optimális festékkoncentráció meghatározása

Az első lépésben a minimált tápközeghez metionint adtam  $50\ \mu\text{g/ml}$ /. Ezután külön-külön, három festékből /metilvörös, brómtimolkék és brómkrezolbibor/ sterilizálás után a tápközeghez  $50\ \mu\text{g/ml}$  mennyiséget kevertem, majd felező hígítást végeztem  $3\ \mu\text{g/ml}$ -ig. A csészék felületére kacsál, szélesztve felvittem az *A. niger* szuszpenziót.  $30^\circ\text{C}$ -on 24-48 órai inkubáció után megfigyeltem, van-e gátlás a kontrollhoz képest, illetve hogyan érzékelhető a savképződés.

A brómkrezolbibor mutatkozott legjobbnak, ezért ezzel próbálkoztam tovább.

A továbbiakban a minimál tápközeg metionin tartalmát 50 mg/ml-re állítva, 600, 400, 300, 200, 100 és 50 µg/ml brómkrezolbibort tettem bele /sterilizálás után/. A táptalajt 20 ml-ként Petri-csészébe öntöttem. Dermedés után  $10^5$  sűrűségű konidium szuszpenzióba mártott, majd megszikkasztott szűrőpapír korongokat helyeztem a táptalaj felületére /csészénként egyet-egyet/. A csészéket 30°C-on 24-48 óráig inkubáltam. Inkubálás után figyeltem, melyik koncentrációnál tapasztalható gátlás.

A kísérleteket mind az eredeti, mind a mutáns törzsekkel /lizin és metionin/ elvégeztem.

#### 2.4.5. Az optimális pH-érték kiválasztása

Az előző pontban ismertetett módon konidium szuszpenzióba papirkorongok segítségével történt meg.

A tápközeg Sørensen-féle foszfát pufferrel 1/4 és 1/8 mennyiséggel 6 ill. 7 pH-ra állítottam. A tápközegét háromfelé osztva, annyi brómkrezolbibor indikátort tettem bele, hogy a festék koncentrációja 200, 300 és 400 µg/ml legyen.

A kísérletet mind a metionin mutánszal, mind az eredeti törzsszel elvégeztem. Az értékelésnél megfigyeltem, melyik esetben észlelhető jól látható, éles határvonalú zóna.



#### 2.4.6. A megfelelő puffertöménység és rétegvastagság meghatározása

A kísérletet 2.4.4. pontban leírt módon a konidium szuszpenzióba mártott papirkorongokkal végeztem.

A tápközeg festékkoncentrációját 200 és 300 µg/ml töménységre, metionin tartalmát 50 µg/ml-re állítottam és felező higitással a teljes puffert tartalmazó tápközeget 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 értékig higitottam. Az optimális rétegvastagság megállapítása végezt az egyik sorozatnál 10 ml, a másiknál 15 ml ill 20 ml tápközeget öntöttem a Petri-csészékbe. A megdermedt táptalaj felületére ráhelyeztem a konidium szuszpenzióba mártott korongokat és 24-48 órai 30°C-on történő inkubálás után értékeltem. Megfigyeltem, melyik csészébe észlelhető a legnagyobb és legélesebb határvonalú zóna.

#### 2.4.7. A konidium mennyiség és a vitaminok hatásának vizsgálata

Az 1/4 és 1/8 mennyiségű foszfátpuffert és 300µg/ml brómkrezolbibort tartalmazó tápközeget 45-50°C-ra hűtöttem és annyi konidium szuszpenziót adtam hozzá, hogy kiöntve csészénként /15 ml/  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  db konidiumot tartalmazzon.

Mindegyikből három-három csészét készítettem Wickerham-féle vitamin oldattal dúsitva, illetve anélkül is. A konidium sűrűség ellenőrzésére kontrollként univerzál tápközeggel is végeztem lemezöntést ill. csíraszámlálást. A papirkorongra  $50 \mu\text{g}/0,05 \text{ ml}$  metionint vittem Hamilton-pipetta segítségével, úgy, hogy a korongot a megmerevedett táptalaj felületére tapasztottam és azonnal rámértem az aminosav oldatot  $/\text{lmg}/\text{ml}$  töménységű vizes metionin/. 24-48 óra  $30^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás után figyeltem a zóna átmérők nagyságát és a zóna határvonalának élességét.

#### 2.4.8. A cukor koncentráció hatásának vizsgálata

A vizsgálathoz  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$  brómkrezolbibort,  $1/4$  és  $1/8$  töménységű foszfátpuffert és  $10^5$  db/csésze konidiumot tartalmazó és vitaminnal dúsitott tápközeget használtam, amelyben a glükóz mennyiségét  $1 \%$ ,  $2,5 \%$ ,  $5 \%$  és  $10 \%$  között változtattam.

A kísérletet az előző pontban leírt módon végeztem el és mértem a zónák átmérőjének nagyságát.

#### 2.4.9. A "nagylemez" módszer alkalmazása

A "nagylemez" módszer alkalmazásánál Lees és Tootill /1955/ munkáját figyelembe véve, a lemezek optimális, hasznos méretét az általuk megadott 48x48 cm-ben és 30x30 cm-ben határoztam meg. Ők a kisebb lemezt a 8x8-as rutin munkához, a nagyobbat a 12x12-es nagyobb pontosságú méréshez ajánlották. A mi esetünkben azonban a zónaátmérők oly nagyok, hogy a 8x8-as elrendezés csak a nagyobbik lemezen helyezhető el.

##### 2.4.9.1. A lemezek elkészítése

A 4 mm vastag, méretre vágott üveglapokra körben 1,5 cm széles és 6 mm vastag üvegléceket ragasztottam epokit segítségével. Az éles sarkok könnyebb tisztíthatósága végett, a lécek belső ragasztási éleit szintelen nitrolakkal lefestettem. A tisztára lemosott üvegkamrákat a fedőlemezekkel együtt germicid lámpa alatt 30 percig steriliztem. Ezután a ragasztott részt /a "kamrát"/ üveglappal lefedve termosztátba helyeztem előmelegítés céljából.

Használat után a kamrából az agar réteg késsel könnyen kibillenthető és vízcsap alatt lemosható.

#### 2.4.9.2. A lemezöntés

A lemezöntést az előmelegített "nagylemezen" egy laboratóriumi asztalra helyezhető 50x50 cm-es "visszintező asztalkán" végeztem el. Ez egy egyszerű bútorlap, amelyet három visszintező csavarral láttam el és egy üveglappal leborítottam. Beállítása a kőművesek által használt "vizimérték" segítségével történt meg.

Az autoklávból kivett tápközeghez miután 45-50°C közötti hőmérsékletre hűtöttem, hozzámértem a szükséges mennyiségű vitamint és brómkrezolbibort. Ezután a  $10^7$  db/ml sűrűségű konídium szuszpenzióból a szükséges mennyiséget a tápközeghez hozzápipettázva óvatosan rázogatva elkevertem és az előkészített nagy lemezre kiöntöttem, majd lefedve dermedni hagytam.

A kisebb lemezre 200 ml, a nagyobb lemez öntéséhez 500 ml, erre a célra összeállított tápközegget /2.2.5. pont/ használtam. A tápközeg csiraszámát  $10^5$ /ml-re állítottam.

#### 2.4.9.3. Az elrendezési tervek

A korongok ill. a furatok elrendezését a nagyobbik lemezen Lees és Tootill /1955/ szerint a 8x8 kvázi latin négyzet szisztéma alapján végeztem el.

Az említett szerzők e megoldással egy lemezen 7 ismeretlent és egy standardot helyeztek el, mindegyiket két töménységben. "A" és "B"-vel jelölve a két koncentrációt az elrendezési terv a következő:

1A	4A	5B	2A	6B	7B	S+B	3A
S+A	5A	4B	7A	3B	2B	1B	6A
3A	2A	7B	4A	S+B	5B	6B	1A
2B	3B	6A	1B	5A	S+A	7A	4B
5B	S+B	1A	6B	2B	3A	4A	7B
7B	6B	3A	S+B	4A	1A	2A	5B
4B	1B	S+A	3B	7A	6A	5A	2B
6A	7A	2B	5A	1B	4B	3B	S+A

I. 7 ismeretlen + 1 standard

5	1	3	7	6	2	4	8
8	4	2	6	1	5	7	3
6	7	5	8	4	1	3	2
2	3	1	4	7	6	8	5
3	2	4	1	5	8	6	7
7	6	8	5	2	3	1	4
4	8	6	2	3	7	5	1
1	5	7	3	8	4	2	6

II. Aminosav /higitási sor/

Ennek eredménye, hogy - mindegyik sorban és mindegyik oszlopban előfordul mindegyik minta, valamelyik töménységben:

- mindegyik sorban és oszlopban négy töményebb és négy higabb koncentrációjú minta fordul elő;

- a lemez felületén minden negyed részben azonos a minták eloszlása;

- mindegyik mintához és higitáshoz 4-4 korong, azaz mérési adat tartozik;

- az aminosav higitási sor esetén mindegyiknél 8 zónaátmérő mérhető;

- ha az ismeretlenek mérésénél is 8 zónaátmérő átlagával kívánunk dolgozni, akkor csak 3 minta vihető fel egy lemezre. A II. elrendezésben a standardot az 1-2 pontokra, a mintákat a 3-4, 5-6 ill. 7-8 pontokra helyezzük fel.

A kisebb lemezek elrendezési terve a következő /4x4/

1	2	3	4	StA	1A	StB	1B
3	4	1	2	StB	1B	StA	1A
2	1	4	3	1A	StA	1B	StB
4	3	2	1	1B	StB	1A	StA

Aminosav /higitási sor/            1 ismeretlen és 1 standard



2.4.9.4. A korongok elhelyezése ill. a furatok elkészítése és a zónák mérése

Az elrendezési tervet papírlapra felrajzolva a lemez alá helyeztem. A steril szűrőpapír korongokat csipesszel a táptalaj felületére tapasztottam és 50 µl-es Hamilton fecskendővel, vagy 25 µl-es MLA automata pipettával a megfelelő higitású törzsoldatból ill. mintából 0,05 ml-t mértem rá. A nagyobb lemezen a korongok felhelyezése kb. 30 perc időt vett igénybe, a kisebb 5-8 percet.

A lyukakat 9,5 mm átmérőjű dugófúróval vágtam az agar lemezbe. A kivágott korongokat lándzsatű és gombossonda segítségével emeltem ki. Egy nagyobb lemeznél 15 percnyi időt igényel ez a művelet. A higitási sorok ill. minták bemérését 100 µl-es MLA automata pipettával végeztem el.

Ezt követően a lemezeket 30°C-on 24-30 óráig inkubáltam.

A kifejlődött zónák méretét tolómérő segítségével határoztam meg.

### 3. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

#### 3.1. A sugárdózis meghatározása

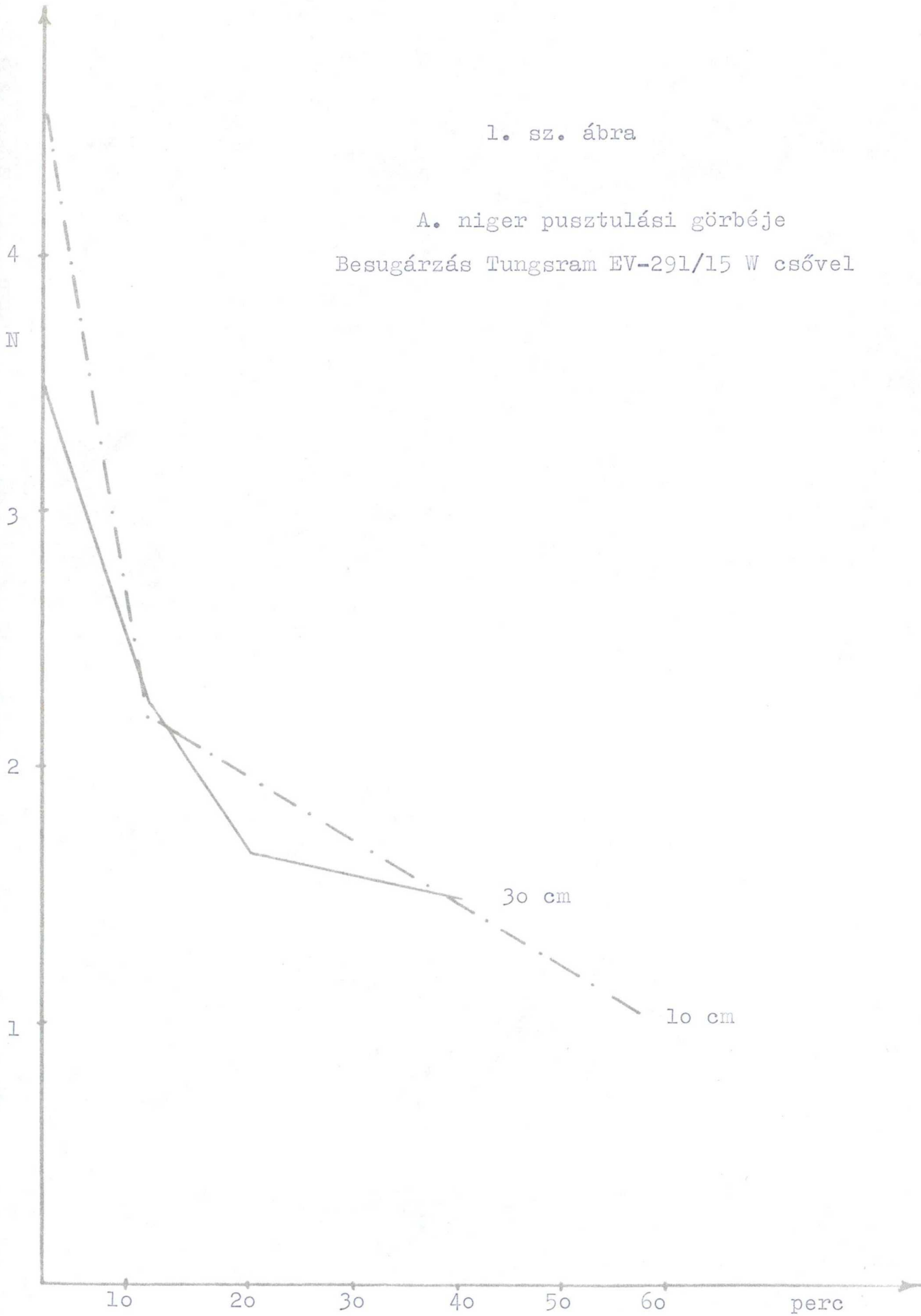
A mutánsok előállításához szükséges optimális besugárzási idő, távolság és konidium sűrűség megállapításához előkísérleteket kellett végezni. A besugárzáshoz kezdetben csak a magyar gyártmányú Tungstram EV-191/15 W germicid cső, majd később a holland gyártmányú Philips TUV /15 W germicid cső állt rendelkezésemre. Az utóbbi UV-C tartományban sugárzott energia teljesítménye  $450 \text{ erg/mm}^2$ .

Az *Aspergillus niger* konidiumának pusztulását 5 párhuzamos kísérletben, 5 párhuzamos csészében vizsgáltam a 2.4.1. pontban leírt módon. A pusztulási görbéket az 1. és 2. ábrán tüntettem fel.

E szerint a Tungstram-csővel 30 cm-ről 20 perces besugárzást kellett alkalmazni, hogy a pusztulási arány a 90 %-ot meghaladja, 10 cm-ről viszont már 10 perc is 99 %-os pusztulást eredményezett. A Philips-cső esetében 35 cm-ről a 90 %-ot meghaladó pusztulás eléréséhez kb. 8 perc, 10 cm-ről pedig 3-3,5 perc besugárzásra volt szükség.

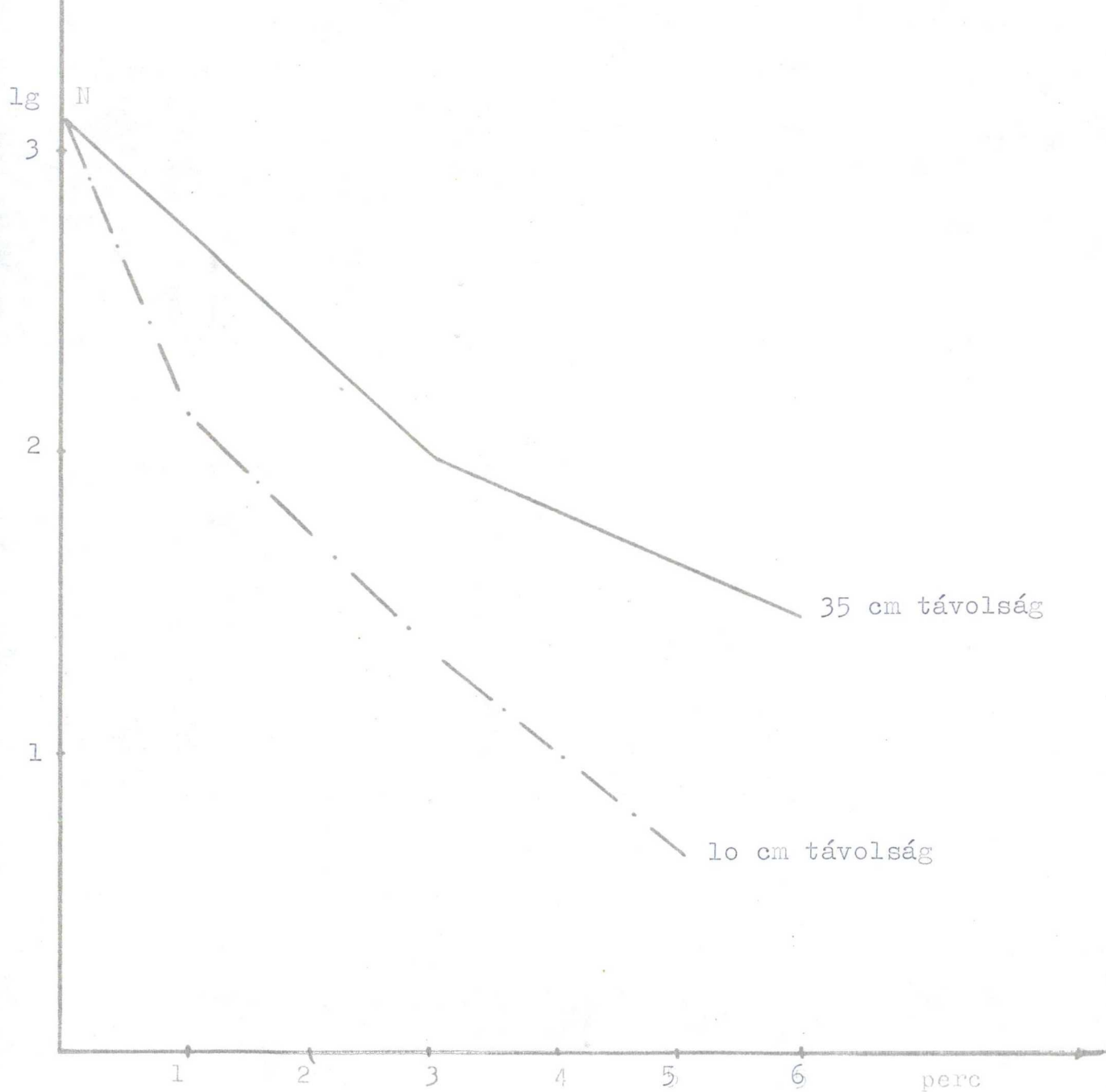
1. sz. ábra

A. niger pusztulási görbéje  
Besugárzás Tungstram EV-291/15 W csővel



2. sz. ábra

A. niger pusztulási görbéje  
Besugárzás Philips TUV/15 W csővel





### 3.2. A mutánsok előállítás, szelektálása és aminosav igényének meghatározása

A mutációs kísérletekhez először 30 cm-ről 20 perces besugárzási idővel a Tungram-csövet használtam. Ekkor 2900 túlélő telepet vizsgáltam meg és ezek közül egy prolin mutánst sikerült izolálni.

A munka gyorsítása végett a távolságot 10 cm-re csökkentve, 10 perces besugárzás után 3800 túlélő konidium telepeit vizsgáltam meg. Ezek közül 3 mutánst sikerült izolálni, továbbá 3 db olyan törzset, amely minimált tápközegen alig indul fejlődésnek, de prolin hozzáadására jól növekedik. Az így nyert mutánsok fenilalanin + leucin, metionin, prolin + leucin jelenlétét követelik meg fejlődésükhöz a tápközegben.

A továbbiakban a Philips gyártmányú germicid csővel 20 cm-ről 3-4 perces besugárzási idővel dolgoztam és 5800 db túlélő konidium telepeit vizsgáltam meg a 2.4.2. és 2.4.3. pontban leírt eljárással. A Petri-csészében a tápközeg felületére felvitt 2000 db konidiumból 10-20 db maradt életben /1 %/. Ily módon 8 db aminosav dependens törzset sikerült izolálni, ezek közül négy, csak több aminosav /3-4 db/ jelenlétében növekvő súlyosan sérült egyed. Egy mutáns igen lassú fejlődésű, de lizin jelenlétében jól növekszik. Három megfelelőnek bizonyult, ezek arginin, metionin és lizin dependensek.

Miután a cél első sorban a metionin és lizin mutánsok előállítására irányult, így ezeket a kísérleteket befejeztem.



### 3.3. Előkísérletek a méréshez szükséges optimális összetételű tápközeg meghatározására

#### 3.3.1. Az indikátor kiválasztása és az optimális festékkoncentráció

Az előkísérletek céljára a papirkoronggal történő agargél-diffúziós eljárást választottuk.

Feltételeztük, hogy a gomba savképzése miatt a tápközegbe vitt indikátor segítségével, a telep körül jól mérhető, eltérő színű zóna képződik.

A feltételezés igazolására három sav-bázis indikátort próbáltam ki, a metilvöröst, brómtimolkék és brómkrezolbiber indikátort. A vizsgálatot a 2.4.4. pontban leírtak szerint végeztem el. A vizsgálat azt bizonyította, hogy a brómtimolkék nem ad megfelelő kontrasztot. A metilvörös  $50 \mu\text{g/ml}$ -ig szép zónákat adott, de a brómkrezolbiber ugyanebben a koncentrációban is szembetűnőbb módon jelezte a zóna határokat. A brómkrezolbiber viszont  $400 \mu\text{g/ml}$  töménységig nem gátolja sem az eredeti, sem a mutáns törzs fejlődését, de  $300 \mu\text{g/ml}$  koncentrációban már kifogástalan színhatást biztosít.

### 3.3.2. Az optimális pH-érték

A 2.4.5. pontban leírt módon pH = 7 és pH = 6-ra pufferolt tápközegben vizsgáltam a zónák kialakulását. A kísérlet eredménye szerint a 6 pH-jú tápközegen ugyan azon idő alatt nagyobb zóna alakult ki, de határvonala nem volt olyan éles mint a 7 pH-jú tápközegnél. Az indikátor színhatása is az utóbbi esetben volt megfelelőbb.

### 3.3.3. A puffertönénység és rétegvastagság

A zónaátmérő mérésének relatív hibája annál kisebb, minél nagyobb átmérőjű és minél élesebb határvonalú a zóna. Ezt pedig elsősorban a pufferhatás és a rétegvastagság határozza meg. A kísérleteket a 2.4.6. pontban leírtak szerint végeztem el.

Petri-csészében az optimális rétegvastagság 15 ml tápközeg bevitele mellett /2,5 mm/ és 1/16-os puffer koncentrációnál alakult ki.

### 3.3.4. A konidium mennyiség és a vitaminok

A 2.4.7. pontban ismertetett módszer szerint a  $10^5$  db/ml konidium sűrűséget találtam legmegfelelőbbnek.

Alacsonyabb csiraszám mellett a zóna nem lett szabályos kerek, szélei hullámosak. Nagyobb csiraszám alkalmazása esetén nincs lényeges különbség, de a zóna átmérője valamivel kisebb. A B-vitaminok jelenlétében a növekedés üteme erőteljesebb. A tápközeghez való hozzátétele megrövidíti az inkubálási időt.

### 3.3.5. A cukor koncentráció

A vizsgálatot a 2.4.8. pontban leírt módon végeztem el és az eredményeket az 1. sz. táblázat tartalmazza. A táblázat adatait 3 párhuzamos mérés eredményéből számítottam. Látható, hogy a cukor koncentráció növekedésével nőtt a zónák átmérője, de a 2,5% és 10 % közötti különbség nem jelentős, ezért célszerűnek látszott az 5 %-os töménység alkalmazása.

Cukor konc.	Zóna átmérője	
	1/4 puffer	1/8 puffer
1 %	39,80	42,75
2,5 %	41,30	48,86
5 %	42,30	49,60
10 %	42,80	50,56

1. sz. táblázat: A cukor koncentrációjának hatása a zóna átmérőjére

### 3.3.6. A konidium szuszpenzió és az aminosav együttes felvitele a korongra

Megpróbálkoztam azzal a módszerrel is, hogy a konidium szuszpenziót összekevertem a metionin törzso-  
oldattal. A konidium sűrűséget  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  db spó-  
ra/korong állítottam be. A metionin mennyisége 50, 25,  
12,5, 6,2, 3,1  $\mu\text{g}$ /korong volt. A metioninnal kevert  
szuszpenzióból a korongra - a már ismertetett módon -  
itt is 0,05 ml-t vittem fel.

Az inkubálás után kapott eredmények nem voltak  
kedvezőek. A fejlődés üteme lelassult, a zóna határok  
nem voltak elég élesek és a mérési adatok között na-  
gyobb szórást tapasztaltam.

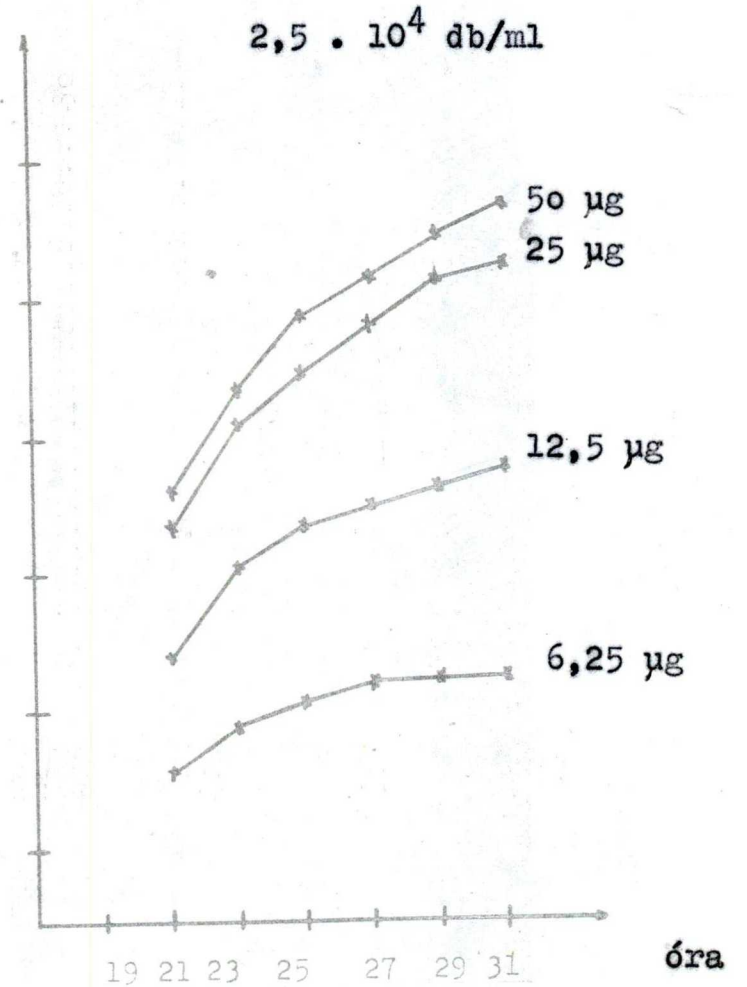
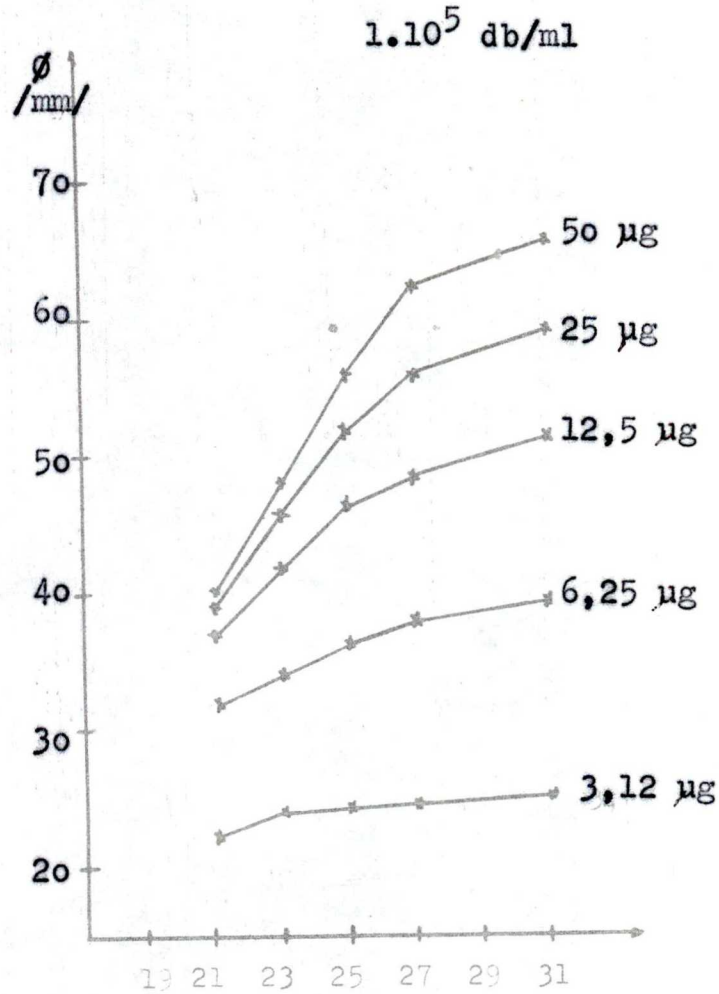
### 3.3.7. Az inkubációs idő hatása

A különböző vizsgálatok során /cukor koncentráció,  
konidium szám hatása stb./ rendszeresen, több időpont-  
ban értékeltem a lemezeket és mértem a zónák átmérőjét.  
A zóna átmérők növekedési ütemét 300  $\mu\text{g}$ /ml brómkrezol-  
bibort és 1/8 mennyiségű puffert tartalmazó tápközegnél  
a 3. sz. ábra két grafikonján szemléltetem.

A zónák mérése körülbelül 20 óra inkubáció után  
válk először lehetővé.

3. sz. ábra

A zónák átmérőjének növekedése az idő függvényében



A zónák 26-27 óráig intenzívebben, azután kisebb mértékben növekszenek. A későbbi időpontban 26-28 óra után a zónák határa fokozatosan élettelené válik, majd a tápközeg kisárgul. Ekkor azonban áteső fényben jól látható szabályos kerek telepek alakulnak ki, amelyeknek egymáshoz viszonyított mérete, szemmel jól becsülhető és tolómérővel - kissé nagyobb pontatlansággal mint a zónaátmérő - mérhető.

### 3.3.8. A metionin stereoizomerjéinek szerepe

A vizsgálathoz D, DL és L-metionint használtam. A tápközéget 1/8 mennyiségben pufferoltam, 300 µg indikátort, 5 % cukrot és  $10^5$  db/csésze konidiumot tartalmazott. A korongokra 50 és 25 µg aminosavat mértem Hamilton fecskendő segítségével. A 30°C-on végzett 25 órai inkubáció után a D-metioninnál nem indult fejlődésnek. Az L és DL készítményeknél két párhuzamos mérés eredményeként a zóna átmérők az alábbiak szerint alakultak.

Amino- sav µg	Zónaátmérők	
	L-metionin	DL-metionin
50	53,9	46,9
25	46,6	42,6

2. sz. táblázat

A zónaátmérők és metionin sztereoizomerek közötti összefüggés

A DL-metionin a várható értéknek megfelelően alacsonyabb zónaátmérők kialakulását eredményezte.

#### 4. A "NAGYLEMEZ" MÓDSZER MÉRÉSI EREDMÉNYEI ÉS MATEMATIKAI STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉSE

##### 4.1. A metionin mennyiség és a zónaátmérők közötti összefüggés vizsgálata

Az ezzel kapcsolatos vizsgálatokhoz a nagyobb és a kisebb lemezt is felhasználtam. A metionint a 2.4.9.3. pontban ismertetett elrendezési tervek szerint vittem fel a lemezre. A nagyobbikra 5-10-15-20-25-30-35-40  $\mu\text{g}$ , a kisebbre 5-10-20-40  $\mu\text{g}$  mennyiségben. Méréseket végeztem lyukdiffúzióval és papírkoronggal egyaránt 3-5-szöri ismétlésben.

##### 4.1.1. A zónaátmérők, a konidium sűrűség és az inkubációs idő közötti összefüggés nagy lemezen

Az előkísérletek során ilyen jellegű méréseket végeztem, de ezeket Petri-csészében és csak 25  $\mu\text{g}$  metionin/korong értéknél mértem. Szükségesnek mutatkozott, hogy ezt nagy lemezen pontosabban meghatározzam. A kisebb méretű üveglapon kapott, a lyukdiffúziós eljárással mért eredményeket a 3. sz. táblázatban foglaltam össze.



Ezekből az adatokból a szemléletesség növelése érdekében két ábrát /4. és 5. sz./ készítettem. Továbbá az 1. és 2. sz. felvétel a  $10^5$ /ml konidium sűrűség mellett, 24 órás inkubálás után bemutatja a lemezen kialakult zónákat, lyukdiffúziós és papirkorong eljárás esetén.

A mérési adatok alapján megállapítható, hogy az inkubációs idő meghosszabbításával, a magasabb metionin koncentrációnál a zónaátmérő növekedése erőteljesebb, ezért az egyenes meredekebbé válik, közelít a  $tg 45^\circ$ -hoz, így a két tényező közötti összefüggés szorossága növekszik.

A konidium sűrűség változtatása is lényegében az előbbi megállapítást bizonyítja. Ugyanis nagyobb sűrűség esetén a zóna hamarabb kialakul.  $10^5$ -nél 20 óra múlva mérhető, ugyanakkor  $10^4$ -nél még nem szabályos kerek,  $10^3$ -nál pedig még nincs kialakult zóna. 24 óra eltelte után  $10^5$ -nél - de a többenél is később - a zónák "előregednek". Ez a zónák összenövését, a zónahatár élességének elmosódását, általában a kontraszt /lila és sárga között/ csökkenését jelenti.  $10^5$ /ml konidiumsűrűség esetén a legnagyobb a maximum és minimum zónaátmérő közötti különbség. Ez átlagosan 2,5 cm.5 és 40  $\mu$ g metionin érték között és a mérhető zóna kialakulásához 19-20 óra szükséges.

Metionin μg	Konidium sűrűség								
	10 <sup>5</sup>			10 <sup>4</sup>			10 <sup>3</sup>		
	20 óra	22 óra	24 óra	20 óra	22 óra	24 óra	20 óra	22 óra	24 óra
5	28,42	30,02	30,35	33,05	37,37	39,42	-	35,95	39,40
10	35,05	37,97	37,95	36,15	43,40	46,12	-	38,42	43,92
20	39,59	47,97	49,42	37,55	47,22	50,62	-	40,02	46,02
40	47,40	55,22	57,40	38,47	49,75	54,50	-	40,90	47,40

3. sz. táblázat: A konidiumsűrűség, az inkubálási idő és a zónaátmérők közötti összefüggés

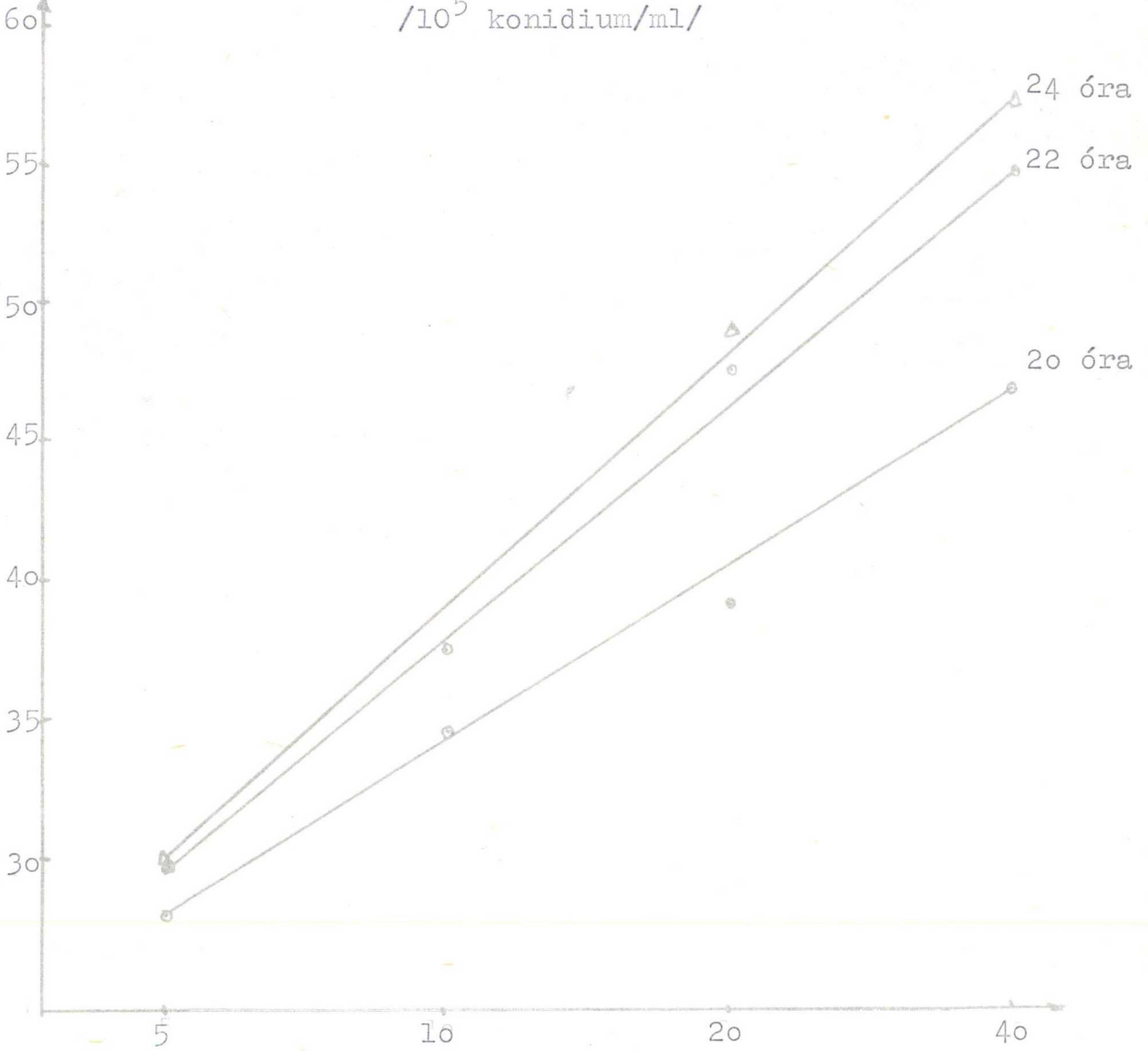
4. sz. ábra

A zónaátmérők és az inkubációs idő közötti

összefüggés nagy lemezen

$/10^5$  konidium/ml/

zónaátmérő  
/mm/

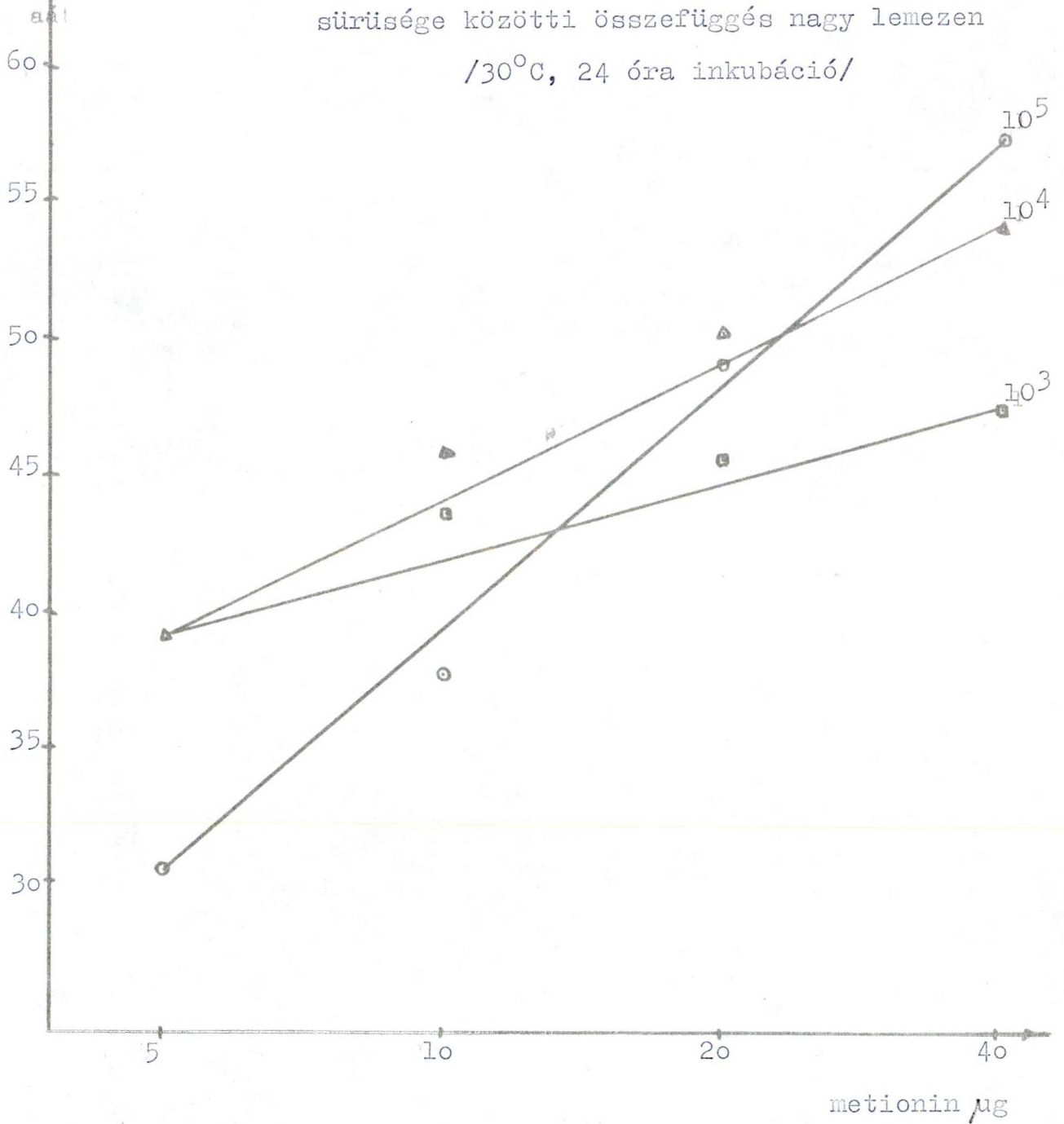


metionin  $\mu\text{g}$

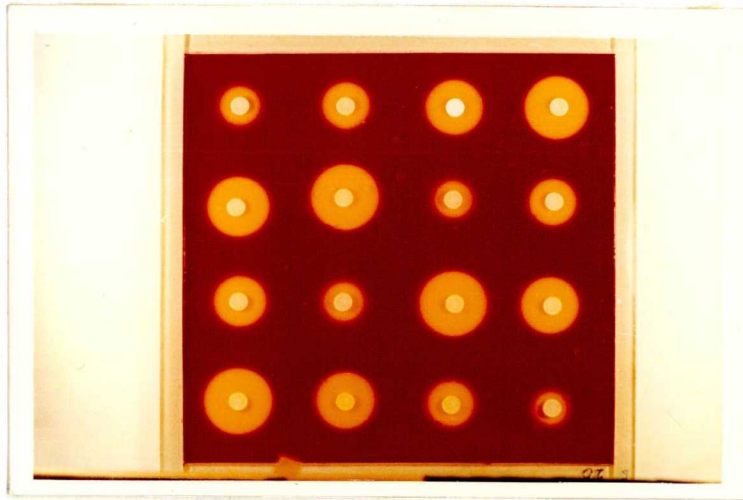
zónaátmérő  
/mm/

5. sz. ábra

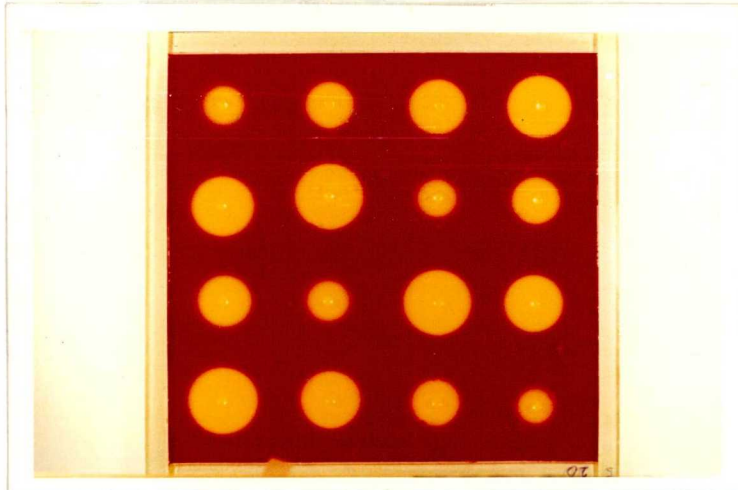
A zónaátmérők és a konidium szuszpenzió  
sűrűsége közötti összefüggés nagy lemezen  
/30°C, 24 óra inkubáció/







1. felvétel: A zónaátmérők kialakulása a 2.2.5. pontban ismertetett tápközegen. A metionin mennyisége 5, 10, 20, 40 ug /papírkorong/



2. felvétel: A zónaátmérők kialakulása a 2.2.5. pontban ismertetett tápközegen. A metionin mennyisége 5, 10, 20, 40 ug /lyukdiffúzió/

#### 4.1.2. A konidiumok stimulációja élesztőkivonattal

Az *A. niger* konidiumok kihajtásának környezeti feltételeit többen is vizsgálták. Ferenczy L. saját megfigyeléseit is figyelembe véve javasolta, hogy a mérési eredmények szórásának csökkentése érdekében 0,5 %-os élesztőkivonattal 1 óráig áztatott konidiumokat használjak fel mérésre. Gyakorlatilag ez annyit jelentett, hogy a konidiumok lemosását a ferde agarról ezzel az oldattal végeztem és rázogattam. Egy óra múlva a 2.1. pontban leírt módon jártam el.

A mérési adatokat a nagyobbik lemezeről 8 mérési oldatból olvastam le és a 6. sz. grafikonon ábrázoltam.

Ebben az esetben a küszöb értéke, az 5  $\mu\text{g}$ -hoz tartozó zónaátmérő átlaga magasabb, a felső határértékhez, a 40  $\mu\text{g}$ -hoz viszonyítva és ennél fogva kisebb egy egyenes meredeksége. Ezzel szemben az inkubációs idő rövidebb lett 5 órával. A mérési adatok szórása egyik lemezen  $s = 0,24$  és  $s = 0,96$  mm között, a másikonál  $s = 0,65$ ,  $s = 1,62$  mm volt.

E mérés eredményeit figyelembe véve nem tartottam szükségesnek a továbbiakban e művelet közbeiktatását.

6. sz. ábra

zónaátmérő  
/mm/

A konidiumok stimulációja  
élesztőkivonattal

2 /19 óra/

1 /19 óra/

2 /15 óra/

1 /15 óra/

50

45

40

35

30

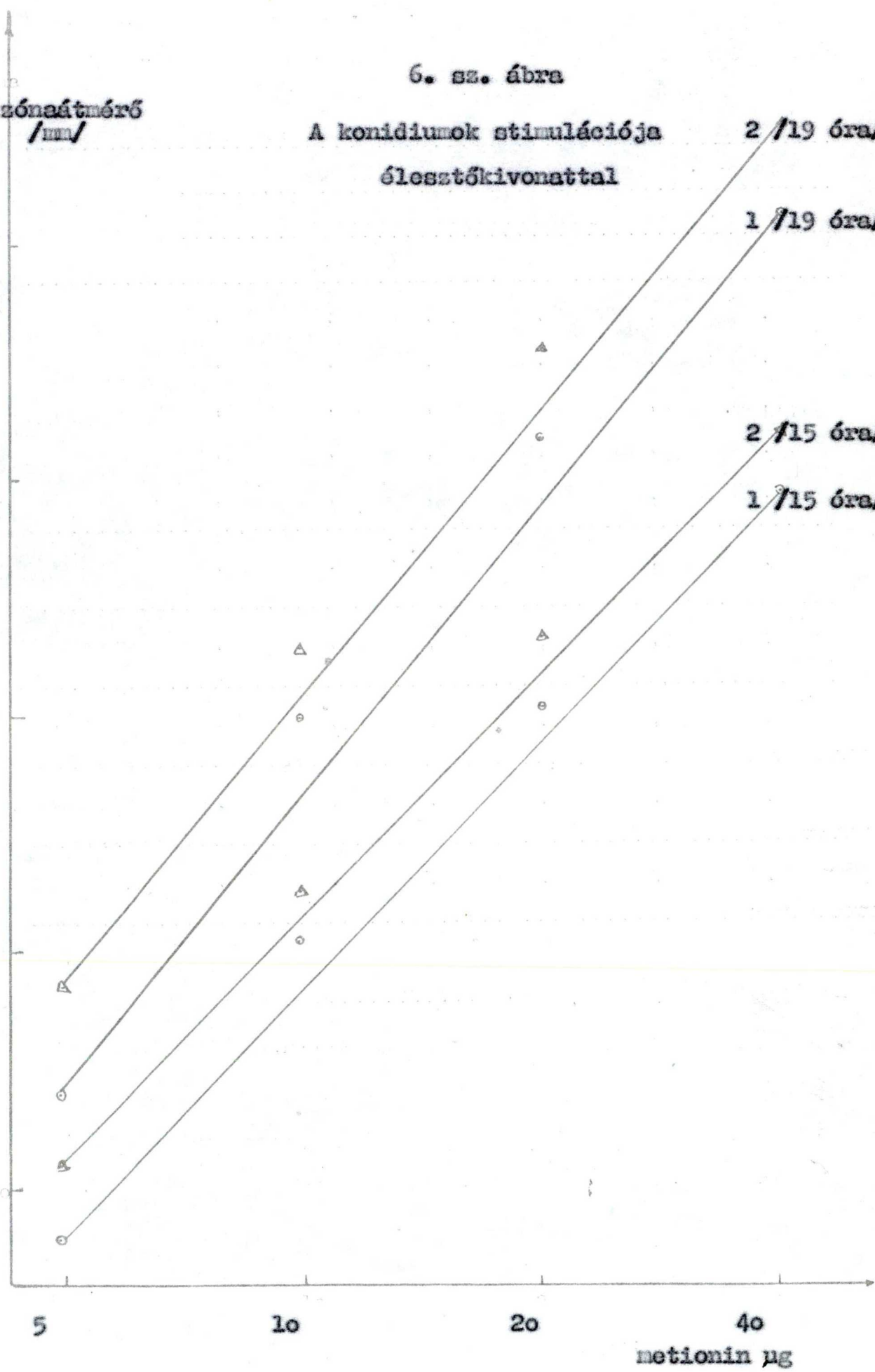
5

10

20

40

netionin  $\mu\text{g}$





#### 4.2. A lyukdiffúziós és papirkorongos mérési módszer összehasonlítása

Mind a két módszerrel, két párhuzamos lemezen mértem a zónaátmérők adatait /y/. Számítottam az egyes metionin mennyiségekhez /x/ tartozó mérési adatok szórás adatait. Megkerestem, hogy a kapott értékekhez milyen függvény illeszthető és kiszámítottam a regressziós egyenes korrelációs együtthatóját.

A mérési adatokat a következő táblázatok tartalmazzák ill. a 7. és 8. ábrák szemléltetik.

A mérési adatokat koordináta rendszerben ábrázolva azt mutatták, hogy az összefüggés egyenessel nem jellemezhető. Logaritmus függvényt illesztve, a mérési pontok az  $y = a + b \log x$  regressziós egyenesen fekszenek. A korrelációs együtthatók: /papirkorongoknál/

$$r_1 = 0,992^{xxx}$$

$$r_2 = 0,979^{xxx}$$

Az összefüggés igen szoros. A két regressziós egyenest a 7. sz. ábra szemlélteti. A mérési adatok szórás értékei viszont elég nagyok, amit előidézhet az átmérő mérés hibája, a konidiumok esetleges egyenlőtlen eloszlása, a rétegvastagság ingadozása és a papirkorong tapadásából és egyenlőtlen vastagságából származó hiba. Az oszlop és sor összegek mind a két lemeznél enyhe lejtési hibát is mutatnak.



Papirkorong módszer

1. sorozat

Elrendezés szerint:

50,6	34,1	45,2	51,7	49,3	39,5	45,6	50,6	366,6
51,4	49,0	44,3	50,4	34,8	48,1	49,7	49,1	376,8
51,1	50,3	49,9	51,1	47,4	34,5	44,4	43,0	371,8
44,2	47,3	35,2	47,6	49,7	40,9	52,0	43,4	376,3
47,4	45,2	47,8	35,3	49,1	52,3	50,3	49,4	376,3
52,4	51,7	52,8	50,4	43,8	47,0	35,1	46,3	379,5
50,8	53,7	51,8	44,4	46,9	50,2	49,3	34,5	381,0
39,8	52,0	52,9	49,0	52,0	48,2	44,0	51,6	390,2
387,7	382,7	379,9	379,9	373,0	371,4	370,4	373,9	3018,9

	L-metionin mikrogram /x/							
	5	10	15	20	25	30	35	40
	34,1	39,5	45,2	45,6	50,6	49,3	51,7	50,6
	34,8	44,3	49,1	49,0	48,1	50,4	49,7	51,4
	34,5	43,0	44,4	47,4	49,9	51,1	50,3	51,1
zóna	35,2	44,2	47,3	47,6	49,4	50,9	49,7	52,0
átmé-	35,3	45,2	47,4	47,8	49,1	50,3	49,4	52,3
rők	35,1	43,8	47,0	46,3	50,4	51,7	52,4	52,8
/y/	34,5	44,4	46,9	50,8	49,3	51,8	50,2	53,1
	39,8	44,2	49,0	48,9	52,0	51,6	52,9	52,8
átlag	35,4	43,6	47,0	47,9	49,8	50,9	50,8	52,0
szórás	0,44	0,66	1,63	1,64	1,17	0,85	1,35	0,90

2. sorozat

Elrendezés szerint:

42,8	26,4	39,1	47,6	45,2	31,8	40,7	45,8	293,0
48,1	41,5	35,0	46,1	25,5	44,8	46,7	37,4	299,6
45,3	47,3	46,4	48,5	45,0	24,2	40,0	32,7	305,2
36,7	40,3	27,7	44,5	48,2	46,2	49,0	45,7	310,6
41,4	35,9	44,5	26,0	46,8	49,0	46,1	37,5	311,2
49,1	50,9	48,8	46,1	35,3	42,5	25,4	42,9	315,6
45,4	49,7	49,3	36,1	40,8	47,8	45,1	26,2	314,2
31,8	47,0	49,0	43,0	49,1	45,6	36,4	47,9	318,0
308,8	312,6	312,1	311,9	310,4	307,7	304,0	299,0	2467,4

	L-metionin mikrogram							
	5	10	15	20	25	30	35	40
	26,4	31,8	39,1	40,7	42,8	45,2	47,6	45,8
	25,5	35,0	37,4	41,5	44,8	46,1	46,7	48,1
zóna	24,2	32,7	40,0	45,0	46,4	45,3	47,3	48,0
átmé-	27,7	36,7	40,3	44,5	45,7	46,2	48,2	49,0
rők	26,0	35,9	41,4	44,5	41,8	46,1	47,5	48,8
/y/	25,4	35,3	42,5	42,9	46,1	50,9	49,1	48,5
	26,2	36,1	40,8	45,4	45,1	49,3	47,8	49,7
	31,8	36,4	43,0	45,6	47,0	47,9	49,0	49,1
átlag	26,65	34,98	40,96	43,76	45,58	47,12	47,90	48,50
szórás	0,93	1,79	1,81	1,85	1,36	2,05	0,81	1,18

7. sz. ábra

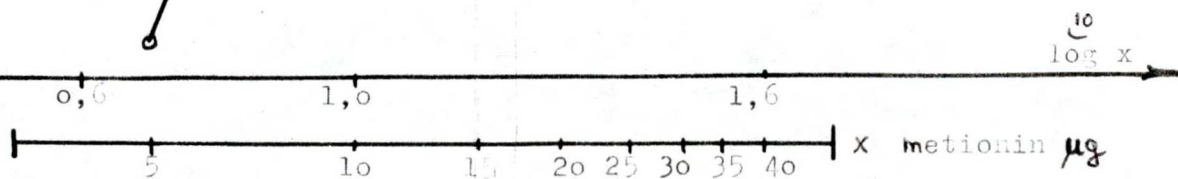
zónaátmérő /mm/

Az L-metionin mennyisége és a zónaátmérők közötti összefüggés /papirkorong módszer/

50  
45  
40  
35  
30  
27

$$y'_1 = 17,42 + 23,35 \cdot \log x$$

$$y'_2 = 10,10 + 24,83 \cdot \log x$$





Lyukdiffúziós módszer

1. sorozat

Elrendezés szerint:

53,5	38,4	49,7	58,0	56,3	44,8	51,5	55,8	408,0
56,1	52,0	45,8	54,9	38,9	54,8	55,8	50,8	408,8
54,3	56,4	53,6	57,0	52,3	39,0	50,8	45,0	408,4
45,1	49,4	38,2	52,2	56,1	54,6	56,6	53,3	405,5
49,9	45,0	50,8	38,5	53,6	57,2	55,3	56,0	406,3
55,8	55,1	56,9	53,5	44,6	49,2	37,0	55,6	407,7
50,1	56,5	55,0	44,2	49,0	56,4	53,6	36,3	401,1
35,7	53,0	56,6	48,8	56,3	49,3	43,7	54,7	397,1
400,5	405,8	405,6	407,1	407,1	405,0	404,3	407,5	3242,9

	L-metionin mikrogram /x/							
	5	10	15	20	25	30	35	40
	38,4	44,8	49,7	51,2	53,5	56,3	56,0	55,8
	38,9	45,8	50,8	52,0	54,5	54,9	55,8	56,1
zóna	39,0	45,0	50,8	52,3	53,6	54,3	56,4	57,0
átmé-	38,2	45,1	49,4	52,2	53,3	54,62	56,1	56,6
rők	38,5	45,0	49,9	50,8	53,6	55,3	56,0	57,2
/y/	37,0	44,6	49,2	51,1	53,8	55,1	55,8	56,9
	36,3	44,2	49,0	50,1	53,6	55,0	56,4	56,5
	35,7	43,7	48,8	49,3	53,0	54,7	55,6	56,3
átlag	37,75	44,77	49,70	51,12	53,61	55,02	56,0	56,55
szórás	1,25	0,63	0,76	1,14	0,42	0,60	0,31	0,48

2. sorozat

Elrendezés szerint:

52,2	36,8	42,8	54,5	53,2	43,5	49,8	53,4	392,2
53,4	50,6	42,5	52,7	35,6	52,2	54,2	47,4	388,6
52,7	54,3	50,4	53,0	48,3	35,1	47,2	42,5	383,5
41,3	46,7	35,0	48,2	53,0	52,5	53,1	50,7	380,5
45,9	41,1	48,2	34,0	49,9	52,6	51,9	52,7	376,3
50,3	51,4	53,8	49,9	41,5	46,4	34,8	48,0	376,1
47,9	53,0	51,8	41,1	45,6	52,8	49,9	34,3	376,4
34,2	50,5	52,9	46,5	53,4	47,9	41,1	52,8	379,3
377,9	384,4	383,4	379,9	380,5	383,0	382,0	381,8	3052,9

	L-metionin mikrogram /x/							
	5	10	15	20	25	30	35	40
	36,8	43,5	48,8	49,8	52,2	53,2	54,5	53,4
	35,4	42,5	47,4	50,6	52,2	52,7	54,2	53,4
zóna	35,1	52,5	47,2	48,3	50,5	52,7	54,3	53,0
átmé-	35,0	41,3	46,7	48,2	50,7	52,5	53,0	53,1
rők	34,0	41,1	45,9	48,2	49,9	51,9	52,7	52,6
/y/	34,8	41,5	46,4	48,0	49,9	51,4	53,5	53,8
	34,3	41,1	45,6	47,9	49,9	51,8	52,8	53,0
	34,2	41,1	46,5	47,9	50,5	52,8	52,9	53,4
átlag	34,95	41,82	46,81	48,32	50,37	52,37	53,48	53,21
szórás	0,28	0,90	0,32	0,67	1,05	0,61	0,80	0,36

A két méréshez tartozó regressziós egyeneseket a 8. sz. ábra mutatja. Az egyenesek korrelációs együtthatói:

$$r_1 = 0,9832^{xxx}$$

$$r_2 = 0,9950^{xxx}$$

A variancia elemzés segítségével a lemezen történő elhelyezésből származó hiba számítható volna, de így is látható, hogy az oszlop és sor összegek jelentős eltérést nem mutatnak. Többnyire a szélső /fal melletti/ sorok, ill. oszlopok összege tér el nagyobb mértékben az átlagtól. Ezt a fal melletti hatást már mások korábban megfigyelték és leírták /Lees and Tootill, 1955/.

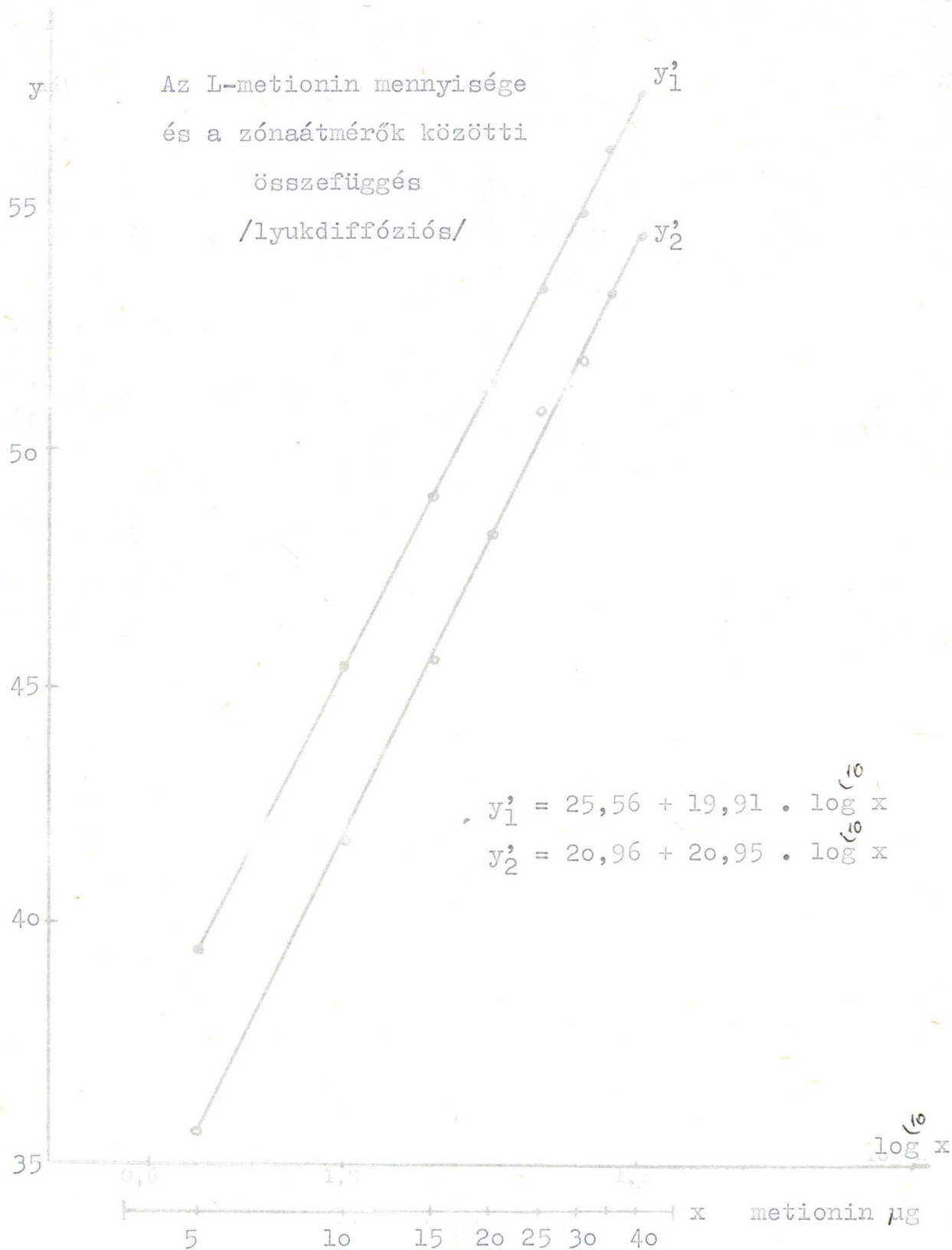
A regressziós egyenesek egyenleteivel kiszámított /becsült/ x értékek a következőképpen alakulnak:

	lyukdiffúzió			papírkorong		
	$x_1$	$x_2$	$\bar{x}$	$x_1$	$x_2$	$\bar{x}$
5	4,095	4,658	4,376	5,884	4,640	5,26
10	13,047	0,901	11,474	13,073	10,046	11,56
15	16,310	17,135	16,72	18,255	16,855	17,50
20	19,221	20,228	19,72	19,942	22,678	21,30
25	25,635	26,334	25,984	24,033	26,848	25,46
30	30,175	31,570	30,87	26,777	30,969	28,90
35	33,846	34,132	33,99	26,513	33,293	29,90
40	36,016	34,859	35,44	29,887	35,197	32,55



zónaátmérő  
/mm/

8. sz. ábra



Miután a becsült értékek a valódi értékektől plusz és minusz irányban véletlenszerűek, ezt pontatlanságnak tekinthetjük, amit nagyobb számú méréssel pontosabban meghatározhatnánk.

Mind a zónaátmérők szórásértékei, mind a regressziós egyenes segítségével becsült  $x'$  értékek a lyukdiffúziós módszernél mutatnak kisebb pontatlanságot, ezért a továbbiakban a lyukdiffúziós módszert alkalmaztam.



#### 4.3. A minta aminosav tartalmának meghatározására szolgáló számítási módszerek

A mi mérési körülményeinkre sajnos nem alkalmazható <sup>o</sup>Lees és Tootill által ismerttetett módszer, ezért a meghatározáshoz szükséges matematikai formulákat magunknak kellett kidolgozni. A mi esetünkben egy 8x8-as lemezre, 1 standard és 3 minta felvitele lehetséges. A standard mennyisége mindig 5  $\mu\text{g}$  és 40  $\mu\text{g}$  metionin/0,1 ml.

A minta várható metionin tartalmának 5  $\mu\text{g}$  és 40  $\mu\text{g}$ /0,1 ml között kell lennie. A nagyobb mérési pontosság elérése céljából két koncentrációban célszerű az oldatot készíteni. A töményebből felező higitással készítsük a másikat.

Egy lemezen így minden metionin mennyiséghez /koncentráció értékhez/ nyolc zónaátmérőt mérhetünk. A metionin mennyiségét /x/ a mért zónaátmérők átlagából /y/ grafikusán, vagy a megfordított regressziós egyenlet segítségével a következőekben ismerttetett számításmennettel ill. nomogrammal határozhatjuk meg.

#### 4.3.1. Grafikonos megoldás

A grafikonos megoldásnál az y tengelyre felvesz-  
szük a zónaátmérők értékeit, az x tengelyre a log x  
értékeknek megfelelő távolságokra a metionin mennyi-  
ség értékeit 5-40-ig. A standardokkal mért értékeket  
a koordináta rendszerben ábrázoljuk. A mintánál mért  
zónaátmérőhöz tartozó metionin mennyiségét az egyenes-  
ről leolvassuk. Ez a megoldás elvégezhető, de nehéz-  
kes, mert minden lemezhez meg kell a grafikont szer-  
keszteni. Ebben az esetben célszerű négy koncentrá-  
cióban felvinni a standardot /5, 10, 20, 40 µg/, ek-  
kor viszont csak két minta mérhető egyszerre.

#### 4.3.2. A fordított regressziós egyenlet kiszámítása

Az x értékét a regressziós egyenes egyenletéből

$$y = a + b \log x$$

csak pontatlanul számíthatjuk, ezért szükséges a for-  
ditott regresszió kiszámítása. Ehhez az egyenlet e-  
gyütthatóját /bf/ a következőképpen számíthatjuk,

$$1. \quad b_f = r^2 \frac{1}{b}$$

ahol r = a korrelációs együttható.

Az állandó  $a_f$  értéke egyenlő

$$2. \quad a_f = \log \bar{x} - b_f \bar{y}$$

és végül a fordított regressziós egyenlet

$$3. \quad \log x = a_f + b_f \cdot y$$

A lyukdiffúziós és papírkoronggal történő mérések esetén az egyenletek a következők /7. és 8. ábra/:

$$y_1 = 25,56 + 19,91 \cdot \log x \quad \log x_1 = -1,8173 + 0,0607 \cdot y$$
$$y_2 = 20,96 + 20,95 \cdot \log x \quad \log x_2 = -0,9749 + 0,0472 \cdot y$$

A laboratóriumi gyakorlat számára azonban ez az eljárási mód nem alkalmas, mert nagyon sok számolást igényel, csak komputeres számítás esetén használható.

#### 4.3.3. Számítás a mérési adatokból

$$y = a + b \cdot \log x$$

függvényből kell kiindulni. Az egyenlet egyszerűsíthető, ha  $b \cdot \log x = 0$ , ekkor ugyanis

$$y = a$$

Ez akkor igaz, ha  $x = 1$ . A mi esetünkben  $1 \mu\text{g}$  metionin nem mérhető, de az  $5 \mu\text{g}$ -ot is vehetjük egységnek. Ebben az esetben az  $5 \mu\text{g}$  metioninhoz tartozó zónaátmérő  $y_5 = a$ .

A mérési tartomány felső határát képező  $40 \mu\text{g}$  akkor egyenlő 8-cal. Ily módon az egyenlet:

$$y_{40} = y_5 + b \cdot \overset{10}{\log} 8$$

ebből a b számítható

$$1. \quad b = \frac{y_{40} - y_5}{\log 8}$$

a "b" és az ismeretlenhez tartozó zónaátmérő  $/y_x/$  ismeretében

$$y_x = y_5 + b \cdot \overset{10}{\log} x'$$

ebből

$$2. \quad \overset{10}{\log} x' = \frac{y_x - y_5}{b}$$

$$3. \quad x = \text{num.} \overset{10}{\log} x' \cdot 5$$

Az öttel való szorzás azért szükséges, mert ezt választottuk egységnek, a valódi érték ötször nagyobb. A regressziós egyenlet torzítási hibáját tapasztalati úton úgy különböztethetjük ki, hogy öt helyett 4,5-del szorzunk.

#### 4.3.4. A nomogrammos megoldás

E módszer alapját az képezi, hogy az előbbi három egyenlet adatai előre kiszámíthatók, mert a mérési tartomány 5 és 40 µg közötti metionin és a hozzá tartozó zónaátmérők, nem végtelen sok, hanem jól definiálható szélsőértékek között mozognak.

Az x tartománya:	5 - 40 µg
Az $y_5$ - " -	25- 40 mm
Az $y_{40}$ - " -	45 - 65 mm
Az $y_x$ - " -	25-65 mm
Az $y_{40} - y_5$ tart.	14 - 26 mm
Az $y_x - y_5$ tart.	0 - 26 mm

Az  $y_5$ ,  $y_{40}$ ,  $y_x$  és a x közötti összefüggés egyszerű megoldását adja a 9. ábra.

Az ábra alapjául az említett egyenletek összevont alakja szolgál:

$$x = 4,5 \text{ num. lg } \frac{y_x - y_5}{\frac{y_{40} - y_5}{\lg 8}}$$

A nomogram szerkezetére rendezett alakja :

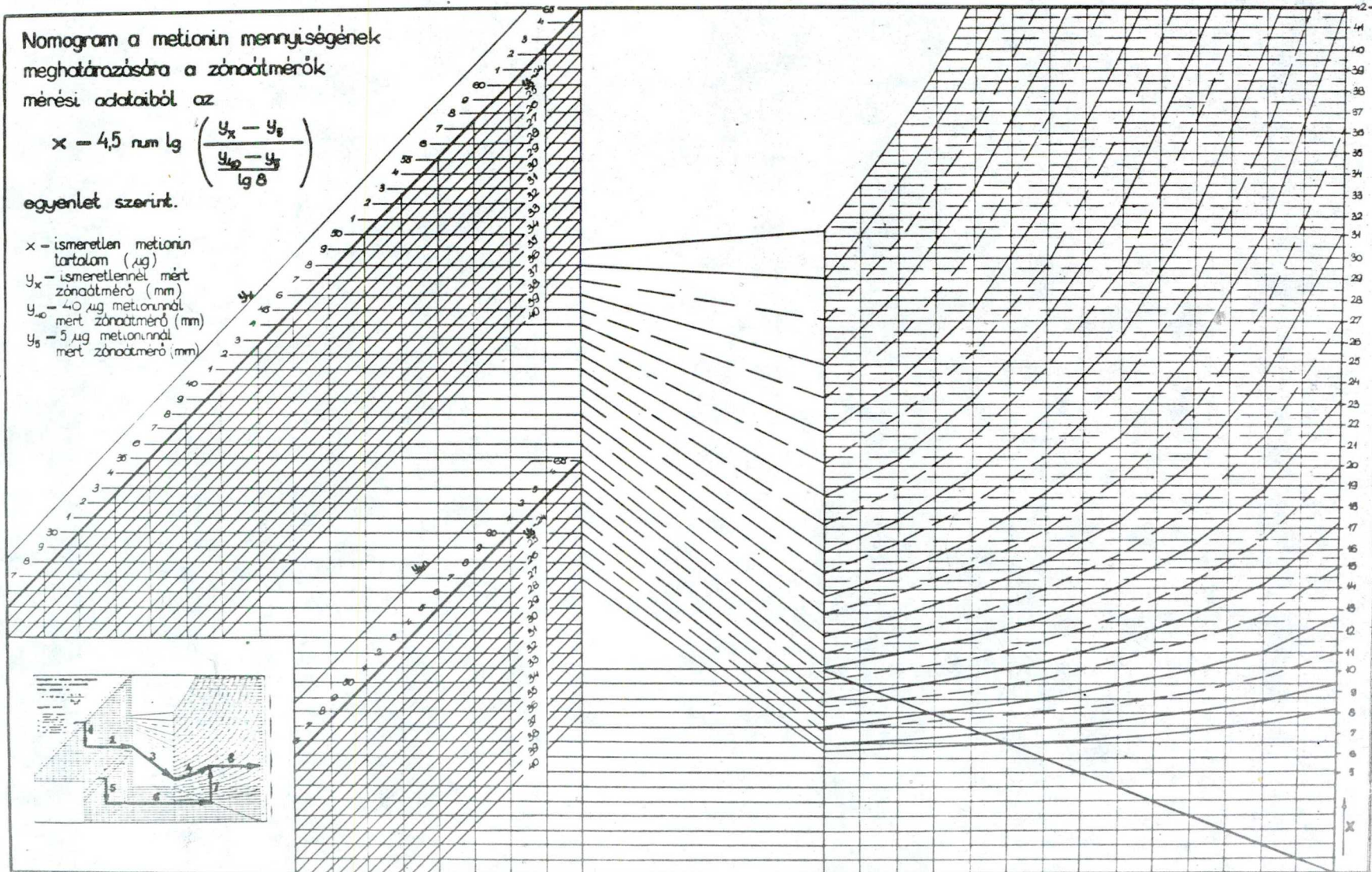
$$x = 4,5 \text{ num. lg } /y_x - y_5/ \frac{1}{/y_{40} - y_5/} \cdot \lg 8$$

Nomogram a metionin mennyiségének meghatározására a zónatmérők mérési adataiból az

$$x = 4,5 \text{ nm} \lg \left( \frac{y_x - y_5}{y_{40} - y_5} \right)$$

egyenlet szerint.

- x - ismeretlen metionin tartalom ( $\mu\text{g}$ )
- $y_x$  - ismeretlennél mért zónatmérő (mm)
- $y_{40}$  - 40  $\mu\text{g}$  metioninnál mért zónatmérő (mm)
- $y_5$  - 5  $\mu\text{g}$  metioninnál mért zónatmérő (mm)



A nomogram szerkesztése 3 nomogram összekapcsolásával készült. A két első egység az  $y_x - y_5$  és az  $y_{40} - y_5$  különbségének meghatározását, szolgálják, amelyeket az  $y_x$ ,  $y_{40}$  és  $y_5$  azonos mértékű skálán való ábrázolásánál számolás nélkül megrajzolható. Mivel  $y$  - értékintervalluma 24-től kezdődik, a kedvezőbb méret kialakítás miatt a jobboldalra kijutó /az ábrán nem látható/ eredményksálát 24 egységgel eltolva átértékeltem.

Az  $y_x - y_5$  eredményét ferde görbe sereg segítségével, a pontosság és leolvashatóság számára kedvezőbb függőleges tengelyre vittem át, amely a lg-os szorzó skála függőleges tengelye. A ferde értékátvivő görbesereg a kész lg szorzó skála és a  $y_x - y_5$  eredményeinek az összekötésével készült.

Az  $y_{40} - y_5$  képzése az  $y_x - y_5$  - megoldóval azonosan készült, az eredményét a lg szorzó skála alatti segédegyenesre vittem, amely:

- a lg szorzó skála vízszintes tengelyét is alkotja
- az  $y_{40} - y_5$  érték skála reciprokát és a lg 8 hányados képzését is megoldja
- továbbá a skála hosszúság növelésével a pontosságot és leolvashatóságot is javítja és
- végül a szorzóskálára a leolvasás vonal vezetésének irányát is megváltoztatja  $90^\circ$ -kal.



A segédegyenes két végpontját az  $y_{40} - y_5$  számításba vehető értéktartományának végpontjai adják. A segédegyenes pontjainak értékét a következő táblázat és az  $y_{40} - y_5$  vízszintes vonalainak metszéspontjaiból nyertem.

$y_{40} - y_5$	$\frac{1}{y_{40} - y_5}$	$\frac{1}{y_{40} - y_5} \cdot \lg 8$
14	0,0715	0,0646
16	0,0625	0,0564
⋮	⋮	⋮
28	0,0357	0,0323

Ezen a módon a  $\lg$  szorzó-skála vízszintes és függőleges tengelyének érték tartományát és beosztását nyertem. A skála görbe vonalának szerkesztéséhez, minden vonalat 7 ponton számítottam és szerkesztettem a következő táblázat alapján; illetve ugyanez a táblázat  $y_x - y_5 = 6, 7, 8 \dots \dots \dots 26$  értékekkel /összesen 21 hasonló táblázat/.

$\frac{1}{y_{40}-y_5} \lg 8 = f_1$	$y_x - y_5$	$f_1 / y_x - y_5 /$	num $\lg f_1 / y_x - y_5 /$	4,5 num $\lg f_1 / y_x - y_5 /$
0,0323	5	0,1615	1,450	6,53
0,0348	5	0,1740	1,493	6,72
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
•	•	•	•	•
0,0564	5	0,2820	1,914	8,61

Ezen táblázatok adataival a lg szorzóskála megszerkeszthető. Az eredeti nomogram 350 x 570 mm méretben készült, amelynek kicsinyített másolata a 9. ábrán látható, az alkalmazási kulccsal ellátva.

A nomogram  $x$  értékének 0,5 pontosságú gyors meghatározását teszi lehetővé, amelyre a következő kontroll példákat említem meg:

$y_x$	$y_{40}$	$y_5$	számított	nomogramból	$\Delta x$
46,4	51,8	38,5	15,3	14,9	0,4
36,7	45,4	25,9	14,3	14,2	0,1
50,1	61,6	37,3	13,4	13,7	0,3

A nomogram alkalmazásához célszerű karcolt cellulóz lapot mint leolvasó segédeszközt használni.

#### 4.4. Vizsgálati minták mérési eredményei, szórás és hiba

A módszer kipróbálására marhahús hidrolizátumot /yestort és Beef. extract/, Bacto pepton /Difco/, éslesztőkivonatot /Oxoid/, szérumalbumint /bovin-Fluka/, globint /saját preparátum/ és deszt. vizes metionin oldatokat vittem fel a lemezre, az eredményeket részben grafikonnal, részben a 4.1.4.3. pontban leírt számításmenet alapján határoztam meg. A mérést 20 és 24 óra inkubálás után is elvégeztem. A táblázati eredmények a minták alacsonyabb és magas koncentrációihoz tartozó mérések átlagát jelentik.

A 4. sz. táblázat adatai mutatják, hogy tiszta metionin oldat esetében mért szórás 5,7 - 8,8 %. A 24 órás inkubációs idő után történő értékelés adatai átlagban közelebb vannak a valódi értékhez. Ez igazolja 4.1.1. pontban történt megállapítást, miszerint 24 órás inkubáció esetén a regressziós egyenes meredeksége nagyobb mint 20 óránál. 24 órás értékelés után, 95 %-os valószínűségi szinten a konfidencia határok: 10 µg-nál = 0,65 µg , 20 µg-nál = 1,44 µg.

A vizsgálat minták közül a Beef extract-ból, a szérumalbuminból és a globinből szabad metionint kimutatni nem tudtam.



4. sz. táblázat

Az L-metionin mennyisége tisztán metionint tartalmazó mintáknál mért adatokból számítva

	Valódi L-metionin mennyiség					
	10 µg			20 µg		
	1	2	3	1	2	3
Számított értékek	10,64	0,87	10,26	25,39 <sup>x</sup>	20,89	20,89
	10,70	9,63	10,16	22,36	21,40	21,88
	9,86	9,67	9,76	20,26	21,36	20,75
	9,33	10,00	9,61	20,13	19,26	19,70
	11,20	11,16	11,18	22,61	21,85	22,23
Összeg	51,73	50,33	50,97	85,35	104,76	105,45
Átlag	10,32	10,07	10,19	21,34	20,95	21,09
Szórás	0,749	0,567	0,582	1,763	1,298	1,411
Szórás %	7,49	5,67	5,82	8,81	6,49	7,05
$h_1 h_2 \bar{x}$	0,84	0,63	0,65	2,36	1,44	1,56

1. 20<sup>n</sup> inkubáció, 2. 24<sup>n</sup> inkubáció, 3. átlag, x=nem vettem figyelembe

A szórást  $S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - u^2}{n}}$  ill. az 5. táblázat becsült szórását  $S = \sqrt{\frac{SQ}{n-1}}$  összefüggés alapján számítottam.

A konfidenciahatárok meghatározásához a középérték szórását  $s_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$  összefüggés alapján állapítottam meg. A két konfidencia határ  $h_1, h_2 = \bar{x} \pm t_{p\%} \cdot s_{\bar{x}}$ .

Kérdés, hogy e nativ fehérjék jelenlétében a szabad metionin meghatározható-e? Két párhuzamos lemezen albumin és globin esetében, 10 mg/ml töménységű oldatnál a következő adatokat kaptam.

Hozzá mért metionin	albumin		globin	
20 µg	21,4	19,3	18,7	19,2
25 µg	24,6	25,3	24,3	25,4
30 µg	30,9	31,3	29,6	31,2

Az eredményekből látható, hogy szórás mértéke a tiszta metioninnál mért szórási határoknál nem nagyobb.

A yestor, pepton és élesztőkivonat esetében csak a látszólagos metionin tartalmat tudtam meghatározni, mivel kémiai módszerrel mért összehasonlítási adat nem áll rendelkezésemre. Fixion lemezen a jelenlévő polipeptidek miatt a metionin elválasztása nem sikerült. A szabad aminosavak meghatározásához szükséges membránszűrőt pedig nem állt módunkban beszerezni.

Az élesztőkivonat metionin tartalmát az Élelmiszeripari Főiskola Kémia Tanszékén magyar gyártmányú aminosav analizátoron meghatározták és azt 0,65 %-nak találták.



Az általam mért átlag 0,57 %. Az automata analizátor oszlopára azonban csak előírás szerűen 6 N HCl-val hidrolizált minta vihető fel. Ennek következtében a két mérési eredmény nem hasonlítható össze, mert a hidrolízis során egyrészt metionin veszteség áll elő, másrészt a polipeptidek hidrolízise következtében a szabad metionin mennyisége növekedhet. Az aminosav analizátorba bevitt hidrolizátumot viszont kevés metionin tartalma miatt nem lehet a mikrobiológiai eljárással mérni.

	L-metionin ug/0,1 ml								
	Yestor			Élesztőkivonat			Pepton		
	20 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	átlag	20 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	átlag	20 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	átlag
	15,3	15,9	15,6	24,3	21,6	22,9	7,6	7,5	7,5
	14,7	15,2	15,2	22,5	22,5	22,5	8,3	7,8	8,0
	12,9	13,8	13,8	23,6	22,2	22,9	8,3	7,3	7,8
	14,8	14,3	1,43	-	-	-	-	-	-
összeg	57,7	59,2	58,9	7,04	66,3	68,3	24,2	22,6	23,3
átlag	14,4	14,8	14,6	23,4	22,1	22,7	8,1	7,8	7,7
szórás	1,05	0,93	0,83	0,91	0,46	0,24	0,41	0,41	0,26
S %	7,29	6,31	5,72	3,89	2,07	1,08	5,01	5,29	3,43
$h_1 h_2$	1,08	0,96	0,86	1,08	0,54	0,29	0,48	0,49	0,31

5. sz. táblázat

A vizsgálati minták látszólagos metionin tartalma grafikonos megoldással értékelve

E mintákra vonatkozó mérési adatok elemzése alapján elmondhatjuk, hogy a szórás itt sem nagyobb, mint a tiszta metionin esetén. 95 %-os valószínűségi szinten az átlagtól való eltérés konfidencia határai 24 órai inkubáció után történt méréseknél:

yestor	:	$\bar{x}$ 0,96 $\mu\text{g}$
élesztőkivonat	:	$\bar{x}$ 0,54 $\mu\text{g}$
pepton	:	$\bar{x}$ 0,49 $\mu\text{g}$

Szólni kell még a hígítás szerepéről. A minta két koncentrációban történő felvitele több szempontból is indokolt. Egyrészt két mérés sorozat átlaga nagyobb valószínűséggel közelíti meg a valódi értéket. Másrészt az egyenestől való szórás kisebb x értéknél más, mint nagyobb x értéknél, így a kettő egymást kiegyenlítheti. Továbbá előfordulhat, hogy a metionin mennyisége több vagy kevesebb a várható értéknél és ennek következtében nagyobb a valószínűsége, hogy legalább az egyik hígítás a mérési tartományba esik.

A yestorra számított adatok a 6. sz. táblázatban találhatóak.

A higitás				Átlag $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$	
1/2		1/1			
20 h	24 h	20 h	24 h	20 h	24 h
14,8	13,6	17,3	17,8	16,0	15,7
13,6	14,8	17,2	14,2	15,4	14,5
12,4	13,3	12,6	13,5	12,5	13,4
14,0	13,6	14,6	14,0	14,3	13,8

6. sz. táblázat

Yestor látszólagos metionin tartalma mérési  
adatokból számítva

A 6. sz. táblázat adatai nem egyeznek meg az 5. sz. táblázat eredményeivel, mivel ott grafikonos megoldást alkalmaztam, de az eltérések és szórások értékei hasonlóak. A két koncentrációban történő mérés az eredmények alapján indokolt.

## MEGBESZÉLÉS

Célkitűzésünk az volt, hogy *A. niger*-ből aminosav mérésére alkalmas mutánsokat nyerjünk és a mérés kísérleti feltételeit meghatározzuk. Munkám során sikerült mérésre alkalmas aminosav dependens mutánsokat nyerni.

A mérésnél az alapvető feladatot a megfelelő nagyságú és éles határvonalú zóna kialakítása jelentette. A problémát megoldottuk. Az indikátorral lilás-vörösre színezett táptalajba kevert konidiumok, a diffúziós zónában fejlődésnek indulnak és savképzésük által citromsárga, jól szembetűnő és mérhető zónát alkotnak. A táptalaj egyszerű és a lemezöntéstől a termosztátba helyezésig - különösebb gyakorlat nélkül is - 30-40 perc alatt elkészíthető a lemez. A mérés pontossága szempontjából lényeges, hogy a tápközeg hőmérséklete 45 és 50°C között legyen. Alacsonyabb hőmérsékleten a tápközeg viszkozussága miatt a konidiumok nem keverhetők jól el és nem lehet egyenletes lemezt önteni. Ebből az okból feltétlenül szükséges még az üveglemez előmelegítése, ugyanis magasabb hőmérsékleten a konidiumok elpusztulnak.

A zónaátmérő mérését 20-24 órai inkubálás után célszerű végezni. Két különböző időben történő mérés és számítás nem növeli számottevően az eredmény pontosságát.

A módszer 95 %-os valószínűségi szinten 8 %-os relatív hibával terhelt, ami rutin munkáknál elfogadható. Pontosabbá tehető volna az eljárás, ha a mintát két töménység helyett három higitásban használnánk, mint például Levin J.D. és munkatársai /1960/ a tiostrepton mérésénél tették. Másik lehetőség a mérési tartomány szűkítése 5-30 µg tartományra.

E módszer viszonylag nem nagy pontossága ellenére azzal az előnnyel rendelkezik, hogy feltehetően sok más anyag mellett különösebb elválasztási műveletek alkalmazása nélkül lehetővé teszi a metionin meghatározását. Két natív fehérje a globin és szérumalbumin, illetve a megvizsgált hidrolizátumok eredményei erre utalnak. Természetesen tisztázni kell, hogy a mutáns a polipeptidok, oligopeptidok és egyéb egyszerű fehérjék metionin tartalmát milyen körülmények között képes hasznosítani, vagy csak a szabad metionint asszimilálja. Amennyiben az utóbbi nyerne bizonyítást, a mérési módszer jelentőségét növeli, mert a kémiai elválasztó műveletek során mindig jelentős az aminosavak vesztesége.

Ezen kívül ugyanezen törzs többi mutánsai /lizin, arginin stb./ feltehetően hasonló mérési körülmények között, hasonló pontosságú mérést tesznek lehetővé.

A kísérleti eredményekből arra következtetünk, hogy a módszer megfelelő adaptáció után széles körben alkalmazható lenne.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az aminosavak meghatározására a kutatómunka számos területén szükség van. Az aminosav analizátorok alkalmazása különösen akkor költséges, ha csak egy, vagy két aminosav meghatározására van szükségünk. Ezért tüztük ki célul egy új, egyszerűen kivitelezhető mikrobiológiai módszer kidolgozását.

Aspergillus nigerből ultraviola sugárzással nyert mutánsokkal sikerült a metionin kvantitatív meghatározására alkalmas módszer kidolgozni. A meghatározás "nagylemezen" lyukdiffúziós eljárással végezhető el. A mérésre alkalmas zónákat megfelelően pufferolt és brómkrezolbibor indikátort tartalmazó tápközeg összeállításával érték el. A biborvörös táptalaj, a belekevert konidiumokból fejlődő micélium savképzése következtében, jó kontrasztot adó, citromsárga zónákat képez.

Kísérleti úton meghatároztam és matematikai statisztikai módszerrel értékeltem a metionin mennyisége és a mutáns által képzett zónaátmérők közötti összefüggést. Az összefüggés ismeretében kidolgozott módszer 95 %-os valószínűségi szinten  $\pm 9$  %-os hibahatáron belüli pontosságot biztosít.



A mérési tartomány 5  $\mu\text{g}$ -40  $\mu\text{g}/0,1$  ml. A mérési tartomány szűkítésével, valamint az egy lemezre felvitt párhuzamos minták számának csökkentésével a módszer pontossága növelhető. A rutin vizsgálatok számára könnyen kezelhető nomogrammos értékelési eljárást is kidolgoztunk.

A meghatározás nem munkaigényes, nem igényel költséges berendezéseket, vegyszereket. A peptonokat, peptideket és fehérjéket tartalmazó minták elemzésének eredményeiből arra következtethetünk, hogy a módszer szabad metionin elválasztások nélküli meghatározására is alkalmassá tehető megfelelő adaptáció után. Valószínű, hogy ugyanezen faj egyéb mutánsainak segítségével hasonló körülmények között más aminosavak is meghatározhatók.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Bolinder, A.E.-S.Lie and L.E.Ericson/1966/: Plate assay methods for amino acids. 3. Acta Pharmaceutia Suecica. 3, 363-375.
2. Bolinder, A.E. /1968/: Plate assay methods for amino acids. Act. Pharm. Sue. 5, 117-134, 401-416, 417-428, 537-552.
3. Bolinder, A.E. /1969/: Microbiological plate assay methods for free amino acids levels in blood. Analytical Biochemistry, 27, 2, 370-377.
4. Catcheside, D.G. /1954/: Isolation of nutritional mutants of Neurospora crassa by filtration enrichment. J.Gen. Microbiol. 11, 34-36.
5. Dévényi, T. /1972/: Az aminosav analitika újabb eredményei. Orsz.Műszaki Fejlesztési Bizottság és a MÉM Információs Központja kiadványa, Bp.
6. Ferenczy, L. and É.Visnyovszki /1971/: Enrichment of nutritionally deficient yeasts mutants by antibiotics. First International Mycological Congress, Exeter.
7. Fincham, J.R.S. and P.R.Day /1971/: Fungal Genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh
8. Holland, K.T. and C. Ratledge /1971/: A procedure for selecting and isolating specific auxotrophic mutants of Mycobacterium smegmatis. J.Gen.Microbiol. 66. 115-118.
9. Itoh, H., K.Kawashima and J.Chibata /1973/: Rapid microbiological assay of amino acids. Agr. Biol.Chem. 37, 10, 2227-2233.

10. Itoh, H., T. Morimoto, K. Kawashima and J. Chibata /1974/: Improved method for rapid microbioassay of amino acids. *Agr. Biol. Chem.* 38, 4. 869-870.
11. Kavanagh, F. ed. /1963/: *Analytical Microbiology*. Vol. 1. Academic Press. New York and London.
12. Kavanagh, F. ed. /1972/: *Analytical Microbiology*. Vol. 2. Academic Press. New York and London.
13. Lees, K.A. and J.P.R. Tootill /1955/: Microbiological assay on large plates I. *The J. of the Society for Anal. Chem* 80, 95-110.
14. Lees, K.A. and J.P.R. Tootill /1955/: Microbiological assay on large plates II. *The Journal of the Society for Analytical Chemistry*, 80, 947, 110-123.
15. Lederberg, J. and E.M. Lederberg /1952/: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriology*, 63, 399-406.
16. Levin, J.D., H. Stander and J. Pagano /1960/: An agar diffusion microbiological assay for Thiostrepton Antibiotics and Chemotherapy. 10, 7. 422-430.
17. Macdonald, K.D. /1968/: The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin. *Genet. Res. Canb.* 11, 327-330.
18. Strömnaes, Ö. and R.K. Mortimer /1968/: Use of nystatin to eliminate spontaneous revertants in yeasts. *J. Bacteriol.* 95, 197-200.
19. Sváb, J. /1973/: *Biometriai módszerek a kutatásban*. Mezőgazdasági Kiadó, Bp.
20. Visnyovszki, E. /1972/: *Doktori értekezés*. József Attila Tudományegyetem, Növényélettani és Mikrobiológiai Int.

Ezúton mondok köszönetet dr. Ferenczy Lajos docens úrnak a dolgozat elkészítéséhez nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsaiért.

Köszönettel tartozom dr. Zsigó István és Gelencsér Éva vegyészeknek a matematikai problémák megoldásához és Bucsi Imréné üzemmérnöknek a kísérleti munkához nyújtott segítségéért.