

INDOLVÁZAS VEGYÜLETEK BIOSZINTÉZISÉNEK VIZSGÁLATA ÉLESZTÖKÖN

Porcs Tibor

V. évi, kémia-növényélettan sz. h.

NÖVÉNYÉLETTANI INTÉZET

Közismert dolog az indolvázias vegyületek előfordulása a magasabb szervezetségű növényekben (triptofán, indolauxinok stb.) Az irodalomban számos közlemény jelent meg, amelyek az indolvázias vegyületek mikroorganizmusokban való előfordulásáról számolnak be. Az indolváz és származékainak bioszintézisét magasabb szervezetségű növényeken és mikroorganizmusokon igazolták.

a/ Több összefoglaló ábrát ismerünk, melyekben képet kaphatunk az indolváz bioszintézisének utjáról, sőt az indol származékok szintézisééről is.

DAVIS (1955), ZOBERST (1958), POLJANOWSKI (1959) közölnek egy-egy ábrát melyekben az aromás aminosavak bioszintézisének egyes lépései vannak feltüntetve. A pentozefoszfát ciklusból indulnak ki, majd több köztes vegyületen át a sikiminsavig jutnak el, majd egy "z₁" intermedieren keresztül az antranilsav, ebből az indol majd a triptofán keletkezik. SCHRÖTER (1953) ábrájában hiányzik a "z₁" köztes vegyület, szerinte az antranilsavból közvetlenül keletkezhet indol, tyrozin, fenilalanin. SCHRÖTER triptofánból kiindulva kinureninen át vezeti le a nikotinsav keletkezését. Ezen reakciósor egyes intermedierjeiből származtatja a kynurensavat és a xanthurensavat.

MEHLER (1955) a 3OH-antranilsavból kiindulva az antranilsav 3,4-dikinonon át vezeti le az a-pikolinsav, nikotinsav és a kinolinsav keletkezését.

HEIDELBERGER ÁBRAHÁM, LEPKOVSKY (1949) tisztázták a triptofánból a nikotinsav keletkezésének reakciómechanizmusát.

Ezen rövid összefoglaló adatokból láthatjuk, hogy az indolvázias ve-

gyületekből kiindulva milyen nagyszámu élettanilag fontos vegyület keletkezik.

b/ Az antranilsav egy fontos központi vegyület az indolváz bioszintézise szempontjából, hiszen a fent közölt ábrákon az indolváz közvetlen előanyaga. DAVIS (1955) és POLJANOWSKI (1959) az ismeretlen "z₁" intermediérből származtatja az antranilsavat. Az antranilsavból és ecetsavból keletkezik az N-acetilantranilsav, majd több lépésen át az indol.

NYC, MITCHELL, LEIFER és LANGHAM (1949) izotóptechnikával a Neurospora néhány mutánsában bizonyították az antranilsav indol reakciót.

YANOFSKY (1956) PARKS és DOUGLAS (1957) szintén kimutattak indolt az E. coli antranilsavas táptalajából.

KREBS, HAFEZ, EGGLESTON (1942) kimutatták, hogy a Bacterium coli a 2/2 aminofenil etanolt képes átalakítani indollá.

MANN és SMITHIES (1955) szerint indol keletkezik a 2/2 aminofenil etilamjnból.

TEAS és ANDERSON (1951) antranilsav keletkezését mutatták ki triptofánból, a kukorica porzóiban, csiranövényekben és levelekben. Az antranilsav keletkezése triptofánból kinureninen keresztül történik.

Látható a felsorolt irodalmi adatokból, hogy az indol szintézise több féle előanyagból és különböző élő szervezetben játszódhat le.

d./ Irodalmi adatok utalnak arra, hogy több élő szervezet képes indolból és szerinből triptofánt szintetizálni. Néha nem szükséges szerint sem adagolni a tápoldathoz, ilyen esetekben amikor az élő szervezet elegendő szerint tartalmaz.

GUFFENHEIM (1944) a Neurospórában tudta megvalósítani az indol és szerin kondenzációját.

WILDMANN, FERRI, BONNER (1947) a triptofán szintézist indollal és szerinnel infiltrált parajlevelekben sikerült észlelniök.

MADIHUSUDANAN, NAIR, VAIDYANATHAN (1961) kísérleti növényként a csicseri borsót használták. Infiltrációs kísérletek azt mutatták, hogy a triptofán közvetlen előanyaga az indol és a szerin. A szintézisben közre-

működő enzimet (szintetáz) a mag sejtmentes kivonatában kimutatták. A szintézis optimális pH-ja 5.5 és piridoxálfoszfat jelenléte is szükséges a reakcióhoz. A triptofán-szintetáz működését a nehéz fémionok gátolják.

YANOFISKY (1957) Neurospóra mutánst vizsgálva mutatta ki az indol és szerin kondenzációját triptofáná.

UMBREIT, WOOD, GUNDALUS (1946), YANOFISKY (1952) mutatták rá arra, hogy az indol és a szerin kondenzációs reakciójához elengedhetetlen a pyridoxálfoszfat jelenléte.

POLJANOWSKI (1959), BRAUNSTEIN és SCHEMIKIN (1953) tisztázták a fosztopiridoxál-proteid biokatalitikus szerepét az indol és szerin kondenzációjában. Az indol reakcióban lép a szerin-fosztopiridoxál proteid komplex-szel, a szerin és a fosztopiridoxál egy azometin kötéssel létesít vegyületet és a fosztopiridoxál-proteid kilépésével keletkezik a triptofán.

TATUM és SHEMIN (1954) tanulmányozták a reakció mechanizmusát. A szerint jelölték C¹⁴-gyel és N¹⁵-tel és deutériummal, A reakció lejátszódása után egy molekula triptofánra számolva, egy atom deutérium hiányzik. Ebből azt következtetik, hogy a reakció intermolekuláris dehidratáció.

RAFELSON (1955) az A. aerogenesből izolálta a jelzett szerin segítségével szintetizált triptofánt, ennek oldallánca hasonló mintájú mint a jelölt szerin.

Az indol és szerin kondenzációs reakcióját még a következő mikroorganizmusok segítségével hajtották végre: Lactobacillus ssp. (SNELL 1943, SCHWEIGERT 1947) Lentinus amphotodes (FRIES 1950) Salmonella typhosus, B. coli, és Claviceps purpurea (HARLEY, MASON 1954).

d./ Közismert dolog az IES előfordulása a magasabb szervezetségű növényekben. Az irodalomban azonban számos közlemény jelent meg, amelyek az IES-nek a mikroorganizmusokban való előfordulásáról számolnak be.

GRUEN (1959) nagy összefoglaló dolgozatában, melyben az auxinok gombákban való előfordulásáról számol be, közli hogy 30 gomba genus és 75 gombafaj auxin produkcióját irták le. Az előfordulási adatokat megnézve

megállapíthatjuk, hogy többségében az IES jelenlétét biológiai teszt módszerekkel mutatták ki. A mikroorganizmusokból csupán három esetben állítottak elő IES-t. KÖGL és KOSTERMANS (1934) 50 kg élesztőből éteres extrahálással 1,2 mg IES-t kaptak. THIMANN (1935) a *Rhizopus suinus*-ból, CRAM és TISCHLER (1943) *Penicillium*-ból állított elő IES-t.

A gombák auxinprodukciónak főleg *Avena coleoptilis*-szel mutatták ki. A *Saccaromyces* genuson belül a *S. cerevisiae* auxinprodukciónak mutatták ki *Avena* teszt segítségével és izolálással. Néhány adat ismeretes, ahol az IES jelenlétét papirkromatográfiával bizonyították.

WOLF (1952) az *Ustilago zaeae*-ből és a *Gymnosporangium juniperi virginiae*-ből (1956). Megemlíti, hogy az utóbbi gomba csak akkor képes IES-t szintetizálni, ha a tápoldatban 0,1 % triptofán volt. Foglalkozott ezenkívül még a fent nevezett gomba IES bioszintézisével is. Megállapította, hogy a *Gymnosporangium juniperi virginiae*-ban az IES bioszintézise a triptaminon keresztül történik.

WATANABE (1957) EHRLICHH reagenssel mutatta ki az IES-t *Piricularia oryzae* éteres savanyú extraktumának papirkromatogramján.

GRUEN (1956) *Phycomyces blakesleanus*-ból papirkromatográfiával és SALKOWSKI reagenssel mutatta ki az IES-t.

URLICH (1960) közölte IES előfordulást mikroglizá gombákban. Említést tesz az IES-oxidázról is, amely a gomba kimutatható IES tartalmát 24 óra alatt II más vegyületté alakítja át.

Ha az irodalmi adatokat megnézzük, megállapíthatjuk, hogy az IES jelenlétét legtöbbször biológiai teszt módszerekkel mutatták ki. Vizsgálataim célja az volt, hogy antranilsavból kiindulva tanulmányozzam az indolváz, majd a triptofánon keresztül az IES bioszintézisét élesztőkön. Az antranilsavból kiindulva az IES-ig a köztes lépéseket idáig más és más élő szervezeteken igazolták. Ismert dolog volt az indolváz és származékainak jelenléte az élesztőkben, tehát ezek bioszintézisének minden lépését lehetségesnek látszik vizsgálni kizárólag az élesztők egy faján is.

Anyagok és módszerek

a./ Indolváz bioszintézise : 100 ml csapvíz + 1 g glükózból szuszpendáltam

4 g péklesztőt, 2 ml alkoholos oldatot készítettem 50 mg antranilsavból és 10 mg szerinből és ezt az élesztő szuszpenzióhoz öntöttem. 48 órán keresztül rázattam 25 C^o-on. Ezután az élesztősejteket kicentrifugáltam a tápoldatból, a tápoldatot vízfürdön vácuumban szárazra bepároltam. A maradékot 10 ml peroxidmentes éterrel feloldottam és ebből 0,1 ml-t felvittem kromatogram papírra. Izopropanol : NH₃ : víz 10 : 1 : 1 arányu keveréket használtam szolvensnek. A kromatogramot GORDON WEBER reagenssel hívtam elő.

b/ Triptofán bioszintézise : az a/ pontban leirt élesztő szuszpenzióhoz 2 ml alkoholban oldott 30 mg indol és 10 mg szerint adtam. 48 óra rázatás után (25 C^o-on) az élesztősejteket kicentrifugáltam. A tápoldatot vízfürdön vácuumban szárazra bepároltam. A maradékot 10 ml alkoholban enyhe melegítés közben feloldottam, majd kromatografáltam. Szolvens : butanol-ecetsavviz 2 : 1 : 1 arányu keveréke. A kromatogramm kvantitatív értékelése : a HAIS és FRANC által közölt (csökkenő standard mennyiség) módszere az analizált oldat növekvő mennyiségével szembeállítva) módszer segítségével történt. A futtatott kromatogramot acetonos ninhidrin reagenssel hívtam elő.

c./ Az IES bioszintézise : az a/ pontban leirt tápoldatba 1 mg alkoholban oldott 20 mg triptofánt adtam 48 órán keresztül rázattam (25 C^o-on). Az élesztősejtek kicentrifugálása után a tápoldatokból az indolauxinokat éterrel extraháltam LARSEN (1939) és BONDE (1953) módszere szerint. Az éter peroxidmentesítése a HEYN (1936) által leirt módszer szerint történt. A savas frakció 1 ml-ét kromatografáltam. A kromatogram előhívása GORDON WEBER reagenssel történt. A kicentrifugált élesztősejteket (NH)₂ SO₄ al autolizáltam, és ezek IES tartalmát is megvizsgáltam.

WARBURG metódussal mértem a dekarboxilációt : 50 g péklesztőt szitán átréseltem 50 ml 0 C^o-os acetonba, üvegbottal kevergettem, majd ülepedni hagytam. Az acetont leöntöttem, majd ismét 50 ml acetonnal kevergettem. Az utóbbi műveletet még kétszer megismételtem. Vacuum szűrés után az élesztőt 50 ml éterrel mostam. Száritás után 6 g acetont kaptam, ezt 50 ml 10⁻³ M-os káliumdihidrofoszfát oldatban szuszpendáltam. A WARBURG

edényke főterébe 2 ml szuszpenziót vittem, az oldaledénykébe 1/2 ml metanolt, amely 1 mg triptofánt tartalmazott. A megfelelő kontroll oldal edénykéjében 1/2 ml metanol volt.

Megemlítem, hogy szilárd ill. folyékony táptalajon nevelt élesztőkön is vizsgáltam az IES jelenlétét. A folyékony táptalaj összetételét pepton és e nélkül variáltam.

Eredmények.

Az antranilsavat tartalmazó tápoldat kromatogramján 0.95 Rf érték-nél egy határozott narancsvörös foltot kaptam, mely előhívás előtt UV fényben halványzöld színben fluoreszkált (indol). 0.40 Rf értéknél UV fényben hamuszínűen fluoreszkáló folt volt észlelhető, amely GORDON-WEBER reagens hatására rózsaszínű lett (IES). Más foltok is keletkeztek a reagens hatására, de ezeket nem azonosítottam (0.85, 0.80 Rf-nél).

Az indolt és szerint tartalmazó tápoldat kromatogramján, miután acetonos ninhidrin reagenssel előhívtam, 0.38, 0.50, 0.60 Rf értéknél lila foltot kaptam. Nem vettem figyelembe a szerin foltját, mivel ezt eleve tartalmazta a tápoldat. Minden esetben szintetikus anyaggal párhuzamos csíkot futtattam. A triptofán foltját azonosítottam 0.50 Rf értéknél. Kvantitatív vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a *S. cerevisiae* 30 mg indilból és 10 mg szerinből 6 mg triptofánt tud szintetizálni 72 órás rázatás után.

A triptofánt tartalmazó tápoldat kromatogramján 0.4 Rf értéknél egy határozott foltot kaptam, és 0.75 Rf-nél egy barna színű foltot GORDON-WEBER reagens hatására. Áttanulmányozva azokat az adatokat amelyeket SEN és LEOPOLD közölt az indolvázis vegyületek színreakcióiról, Rf értékeiről különféle szolvensekben, igen nagy valószínűséggel megállapíthatjuk, hogy a 0.75-nél lévő folt a triptamin. A 0.40 ill. 0.95-nél lévő vegyületek amelyeket szintetikus vegyületek futtatásával is azonosítani tudtam, az IES és az indol. Az aminosavakra előhívott kromatogramon a 0.60 Rf értéknél a valint, 0.38 Rf-nél az alanint és 0.50 Rf értéknél a triptofánt tudtam azonosítani irodalmi Rf értékek és szintetikus vegyületek futtatás segítségével. Megjegyzem, hogy az IES-t, triptofánt, indolt papirelektroforézissel is sikerült szétválasztani és azonosítani.

Peptonos tápoldatban nevelt élesztőtörzsek tápoldatában a következő fajknál találtam IES-at. *Saccaromyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Geotrichum candidum*, *Cryptococcus diffluens*, *Paratorulopsis pseudaria*, *Procandida tropicalis*. A sejtek autolizátumának extraktumában csak a *Schizosaccharomyces pombe*-nél sikerült IES-at kimutatni.

A triptofánnal nevelt *S. cerevisiae* tápoldatában már három órai rázás után kimutatható mennyiségű IES keletkezett. A kontroll edényekben rázatott szuszpenzió éteres extraktuma kromatografálva nem mutatott IES reakciót. Az inkubációs idővel emelkedett az IES produkció, amelyet a folt színének intenzitása jelzett.

WARBURG metódussal mértem az élesztőből készült acetonepor szuszpenzió széndioxid produkcióját. A metanolban oldott triptofán hozzáadása után emelkedett a széndioxid mennyisége a kontrollhoz viszonyítva.

		h ₁ óra	h ₂ óra
		közép	közép
triptofán nélkül	1.	+ 36.6	+ 17.2
	2.	+ 29.7	+ 12.7
+ triptofán	3.	+ 42.1	+ 20.5
	4.	+ 58.0	+ 34.0
		+ 33.1	+ 14.8
		+ 50.0	+ 27.2

Az első órás mérések alapján

levegő

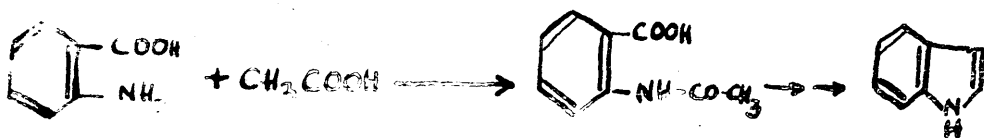
0 CO₂ 0.2 (25 C^o-on)

A reakció lassu volta a triptofán rossz oldódásának tulajdonítható.

Eredmények értékelése

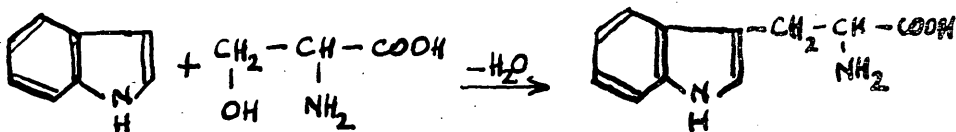
Az antranilsavas tápoldatban sikerült az indolt kimutatni, míg a kontroll szuszpenzióban nem találtam meg. Valószínű tehát, hogy a *S. cerevisiae* képes az antranilsavból indolt szintetizálni. NYC. MITCHELL, LEIFER és LANGHAM (1949) a *Neurospora*-ban, majd YANOFSKY (1955) az *E. coli* segítségével tudta ezt a reakciót megvalósítani.

POLJANOWSKI (1959) szerint a reakció a következőképpen játszódik le



N-acetyltranilsav

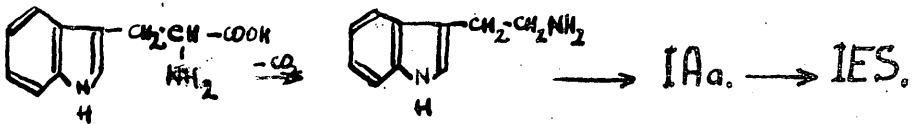
Az élesztő szuszpenziójához alkoholban oldott indol és szerint adva létrejött a két vegyület dehidrációs kondenzációja és triptofán keletkezik. A triptofán bioszintézisének ezt a formáját GUGGENHEIM (1944) a Neurospora-ban, WILDMANN, FERRI, BONNER (1947) Neurospora mutánsokban igazolta. Ezt a szintézist magasabb szervezetségű növényekben is igazolták infiltrációs kísérletekkel.



Ezen szintézis mechanizmusát izotoptechnikával TATUM és SHEMIN (1954) igazolták.

Az indol és szerint kondenzációs reakcióját a triptofánszintetáz enzim végzi, melynek prosztetikus csoportja a piridoxál foszfát. A szintetizált 6 mg triptofán a tápoldatban található meg, valószínűleg az élesztősejt is jelentős mennyiségű triptofánt beépít. Élesztő segítségével tehát nagyobb mennyiségű triptofán nyerhető indolból és szerintből. A kromatogramon lévő 0,38 Rf érték-nél az alanin valószínűleg a triptofán lebontási terméke a triptofánpyroláz enzim segítségével. A O. GOREF-nél lévő valin eredete kétséges. A triptofánt tartalmazó tápoldatból IES-t sikerült kimutatnom nagyobb mennyiségben.

Az IES mellett a triptamin feltja is határozottan megjelent. Ebből következik, hogy az élesztőkben esetlegesen található IES a triptofánból keletkezik triptaminon keresztül :

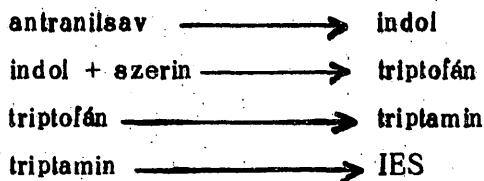


Ezt az IES szintézist SKOOG (1937) a zab szövetében, PILET és ATHANASIADES (1959) a lencsében; DANNENBURG és LIVERMANN (1957) a görögdinnyében, CARDY és WOLF (1957) a gombákban észlelte. A *S. cerevisiae* ben is triptaminon keresztül megy az IES bioszintézise. Ezt a feltevésemet még WARBURG módszerrel is igazolni tudtam, mivel a triptofánból a triptamin keletkezése decarboxilációval történik, a közben felszabaduló széndioxid által okozott nyomásemelkedés mérhető. A WARBURG-ozási táblázatból világosan látható a decarboxiláció. Ezen vizsgálat alapján méginkább igazolva látszik az a feltevés, hogy a *S. cerevisiae* IES bioszintézise a triptaminon keresztül történik.

Összefoglalás

Az IES bioszintézisének tanulmányozására rázatott élesztőszuszpenziókat, analizálására papirkromatográfiát használtam. Megállapítottam, hogy a triptofán adagolásával emelkedett az IES feltjának intenzitása. Kimutattam a triptofán szintézist indolból és szerinből (30 mg indolból és 10 mg szerinből 6 mg triptofán keletkezett). Antranilsav hozzáadása a szuszpenzióhoz a tápoldatban indolt sikerült kimutatni, WARBURG módszerrel kimutattam a triptofán decarboxilációját, papirkromatográfiikusan a triptamint.

Ezen eredmények a következő szintetikus reakciókat mutatják :



Investigations on the synthesis of indole derivatives in yeasts

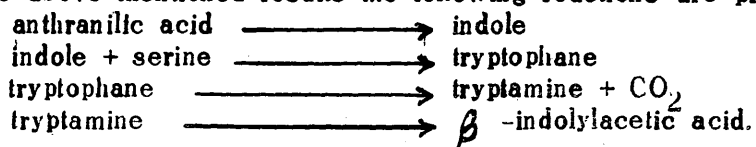
T. Procs

Various precursors were added to shaken suspensions of yeasts and the liquids were analysed with the aid of paper chromatography. Addition of

tryptophane increased the quantity of 3-indolylacetic acid in the liquid. Syntheses of tryptophane from indole and serine was also demonstrated. Following addition of anthranilic acid indole was found in the suspension.

Decarboxylation of tryptophane was observed in a suspension of an acetone-preparate of baker's yeast with Warburg-method. Tryptamine originating through the decarboxylation was paperchromatographically demonstrated.

According to the above-mentioned results the following reactions are probably



I r o d a l o m

1. Bonde, E. K. : Bot. Gaz., 115- 1-15 (1953)
2. Crady, E. E., and Wolf, F. T. : Physiol. Plantarum, 12, 525 (1959)
3. Cram, D. J., and Tischler, M. J. : Am. chem. Soc. 70, 4238-39 (1948)
4. Dannenburg, W. N., and Liverman, J. L. : Plant Physiol., 32, 263 (1957)
5. Galston : A. W. and Purves, W. K. : Ann. Rec. Plant Physiol., 11, 239 (1960)
6. Gruen, H. E. : Ann. Rev. Plant Physiol. 10, 405-440 (1959)
7. Fries, N. : Sr. bot. Tidskr. 44, 380-386 (1950)
8. Harley-Mason, I. : Experientia (Basel) 10, 134. (1954)
9. Kögl, F., und Kostermans D. G. R. : Z. physiol. Chem. Hoppe-Seylers, 228, 113-121 (1934)
10. Krebs, H. A., Hafez, M. M., und Eggleston K. : Biochemic. J. 36, 306-309 (1942).
11. Larsen, P. : Moderne Methoden der pflanzenanalyse III. Band 565-625.
12. Madhusudanan Nair, P. - Vaidyanathan, C. S. : Arch. Biochem. Biophys., New York., 93, 262-266 (1961)
13. Mann, P. J. G. and Smithies, W. R. : Biochemic. J. 61, 101-105 (1955)
14. Manning, D. T., und Galston, A. W. : Plant. Physiol., 30 225 (1955)
15. Nyc, J. F., Michell, H. K., Leifer, E., and Langham, W. F. :
16. Pilet, P. E., and Athanasiades, J. : Br. schweiz. botan. Ges., 69, 16 (1959)
17. Schröter, H. B. : Handbuch der Pflanzephyiologie, III. Band 844-888 (1958)
18. Schweigert, B. S. : J. of Biol. Chem. 168, 283 (1947)
19. Sen, S. P. , Leopold, A. C. : Physiol. Plant, 7, 98-108. (1954)
20. Skoog, F. : Gen. Physiol. , 20, 311 (1937)
21. Snell, E. E. : Arch. of Biochem. 2, 389-394 (1943)

22. Tatum, E. L., and Shemin, D. : J. of Biol. Chem. 209, 671-675 (1954)
23. Teas, H. J., and Anderson, E. G. : Proc. Natl. Sci U. S. 37, 645 (1951)
24. Thimann, K. V. : J. Biol. Chem. 109, 279-291 (1935)
25. Ulrich, J. M. : Physiol. Plant. 13, 429-443 (1960)
26. Umbreit, W. W., Wood, W. A., and Gunsalus, I. C. : J. of Biol. Chem. 165, 731-732 (1942)
27. Watanabe, T. : Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 22, 123-147. (1957)
28. Wildmann, S. G., M. G. Ferri and J. Bonner : Arch. of Biochem. 13, 131-144 (1947).
29. Wolf, F. T. : Phytopat. Z. 26, 219-223 (1956)
30. Wolf, F. T. : Proc. Natl. Acad. Sci U. S. 38, 106 III (1952)
31. Yanofsky, C. : J. of Biol. Chem. 194, 279 (1952).
32. Yanofsky, C. : Science (Lancaster, Pa.) 121, 138-139 (1955)