

A mikrobaölő hatás mechanizmusáról

A citoplazmamembrán károsodása

VAS KÁROLY

Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet, Budapest

Bevezetés

A mikroorganizmusok elleni védekezés csak akkor lehet megalapozott, ha ismeretes, hogy a mikrobák pusztulása milyen fizikai vagy kémiai tényezők hatására hogyan, mely lépésekben következik be. A mikrobaölő hatás mechanizmusára vonatkozólag igen kiterjedt kutatás folyt már és folyik ma is. Az eddigi megállapítások szerint a sejtek pusztulása sokféle módon jöhet létre. Az egyik ilyen lehetőség az, hogy a fizikai vagy vegyi tényező a sejt tartalom és a környező tér közötti elhatároltságot részben vagy egészben megszünteti. Így a sejtek normális vegetatív életműködéseiket nem tudják kifejtteni és gyakran szaporodási képességüket is elvesztik, ami mikrobiológiai téren a pusztulás fogalmával egyértelmű jelenség.

Az alábbiakban ez utóbbi szemszögből vizsgáltuk meg néhány vegyület és fizikai tényező hatását. Modellként a kísérletekhez a *Saccharomyces cerevisiae*-t választottuk mint olyan mikroorganizmust, mely nagy mennyiségben, könnyűszerrel beszerezhető és amellyel a munka egyszerű és kényelmes.

Mint egyéb mikroorganizmusoknál, az élesztőnél is a sejt tartalom és a külső tér határát több réteg alkotja, melyek közül fontosság szempontjából kiemelkedik a külső, főleg poliszaharidokból felépített, kissé merev, áteresztő *sejtfal* és ezen belül a citoplazma legkülső rétegét jelentő, félig áteresztő, helyesebben szelektív módon permeabilis *citoplazmamembrán*. A sejt metabolizmusa szempontjából főleg az utóbbi játszik döntő szerepet.

A citoplazmamembrán a plazmának külső, kb. 30–200 Å vastag rétege, mely főleg fehérjékből és lipoidokból áll és szabályos strukturájú (4). A membrán valószínűleg *mozaikszerűen*, felváltva részben egy molekuláris rácsot (»pórus-membrán«), részben az említett lipoidszerkezetet tartalmazza, ami a víz és a kisebb molekulájú nem-elektrolitok, ill. a zsírban oldódó, nagyobb molekulájú nem-elektrolitok könnyű behatolását kielégítően megmagyarázza.

Annak tanulmányozását, hogy egy adott behatás a citoplazma membránját dezorganizálta-e vagy sem, élesztő esetén aránylag könnyen elvégezhetjük. Az élesztő ugyanis, éppúgy, mint a gram-pozitív baktériumok, a sejtben, a membrán alatt rendszerint elég nagy mennyiségű *szabad* aminosavat halmoz fel (6), valószínűleg későbbi szintézisek céljaira, tartalék gyanánt. Ezeket az aminosavakat a normális élesztő membránja aminosavban szegény környezetben is a sejtben belül vissza tudja tartani. Ha azonban a citoplazma-membrán valamilyen oknál fogva változást szenved, a tárolt aminosavak a külső térbe diffundálnak és ott kimutathatók (2, 3).

A sejtmembrán károsodása természetesen nemcsak az aminosavak, hanem más sejtösszetevők kiáramlását is lehetővé teszi (9). Ezek közül különös érdeklődésre tarthatnak számot a purin- és pirimidinszármazékok, a nukleinsavkomponensek csoportja, mint amely vegyületek a sejtek szaporodása szempontjából is életfontosságú anyagok. Az élesztőben az összes nukleinsavnak kb. 95%-a ribonukleinsav [csak kb. 5% a dezoxiribonukleinsav (7)]. Ennek ill. komponenseinek a kiáramlása a sejtől egyszerűen vizsgálható.

Vizsgálati anyag és módszerek

A következőkben a mikrobaölő tényezőknek az élesztősejt membránjára gyakorolt hatását a külső térbe jutott aminosavak papirkromatografiás vizsgálatával, ill. a purin-, pirimidin-származékok spektrofotometriás mérésével tanulmányoztuk.

Az élesztőszuszpenzió

Általában friss présélesztőt használtunk vizsgálatainkhoz. Ebből csapvízzel kb. 20 s%-os (*friss élesztőre számítva*) szuszpenziót készítettünk (a tényleges érték néhány kísérletnél 16,7 és 25 s% között változott, de legtöbbször 20 s% volt). Ennek csíraszama hozzávetőleg 2×10^9 sejt/g nagyságrendű.

Ilyen nagy töménységet azért kellett alkalmazni, hogy a bizonyos esetekben várhatólag kioldódó aminosavak a közegben kromatografiásan kimutathatók legyenek. *Roine* szerint (10) az élesztőből triklórecetsavval kioldható aminosav-nitrogéntartalom az összes nitrogéntartalomnak kb. 10%-a. Ha tehát a friss présélesztő N-tartalmát 2% körülnek vesszük, akkor a 20%-os szuszpenzióban maximálisan kioldódható amino-N 0,04% lehet, vagyis aminosavtartalma 0,25%-nak adódhat. Ez a továbbiakban leírt módon tízszeresére töményítve, végülis 2,5%-os aminosavkoncentrációt jelent. 5 μ l. ebből tehát 125 μ g. aminosavnak felel meg.

A csíragatólógó vegyszerekkel való kezelés

A vegyszerek hozzáadása általában a fenti élesztőszuszpenzióhoz történt, változó mennyiségben. (Kivételt az alkoholok képeztek, melyeknél a szükséges nagy töménység következtében *szilárd* élesztőből és a megfelelő alkoholtartalmú vizes oldatokból indultunk ki és ezeket kevertük olyan arányban, hogy kb. 20 s% élesztőt tartalmazzon a szuszpenzió). A csíraszuszpenziót azután kb. 12 órai állással megszakított 6+6 órás lassú rázásnak vetettük alá, általában 0 és +4° C közötti hőmérsékleten.

Fizikai behatások

A fizikai behatások közül: 1. a *dörzsölés* izzított kvarchomokkal történt: 80 ml 20 s%-os élesztőszuszpenziót kb. 50 g homokkal porcelán mozsárban 40 percig dörzsöltünk. 2. A *fagyasztás* során az élesztőszuszpenziót -20° C-os levegőjű térben, üvegben megfagyasztottuk. Egy nap mulva +20° C körüli levegőn felengedtük a mintát. 3. *Nagy hőmérsékletek* alkalmazásakor a fenti élesztőszuszpenzió mintáit vagy normál kémcsövekben (16×160 mm) vagy hosszú (kb. 300 mm), vékonyfalú és kis keresztmetszetű (7 mm belső átmérő) csövekben a kérdéses hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztük, majd a hőkezelési idő leteltével hidegvizes fürdőbe vittük át gyors lehűtés céljából.

Vizsgálat aminosavakra

A kiváut behatás után az élesztősejteket 20–30 perces (2000–3000 fordulat/perc) *centrifugálással* elválasztottuk az oldattól és az utóbbiból egy ismert mennyiséget (rendszerint 5 ml-t) kb. 80° C-ra beállított vízfürdő tetején óvatosan *szárazra pároltunk*. — A bepárolt száraz maradékot általában eredeti térfogata 1/10-ed részének megfelelő mennyiségű deszt. vízzel felvéve, a kapott oldat »tisztájából« 1–1 platinakaccsal széles szűrőpapírra (Schleicher és Schüll Nr. 597, 602 ill. Macherey Nr. 637) felvittünk néhány (kb. 5.) μ l-nyit, majd megszáritás és az oldószergőzőkkel történő egyensúlyozás után leszálló *papírkromatografálási* eljárásnak vetettük alá. Oldószerként vagy ammóniás n-butanolt (1 tf n-butanol + 1 tf 1,5 n NH₃), vagy hangyasavas, ill. ecetsavas n- ill. izo-butanolt (70 tf butilalkohol + 15 tf konc. hangya- ill. ecetsav + 15 tf víz) alkalmaztunk, egy dimenzióban, hosszan (30–50 cm) futtatva a keverékeket, ismert aminosavak kíséretében. — A megszáritott papíron a foltok előhívása vízzel telített n-butanolban oldott 0,1%-os ninhidrin rápermetezésével és néhány perces 90–100° C-on szárítással történt.

Az α -aminosavak *relatív mennyiségének* vizsgálatára a ninhidrinnel, 5,0 pH-s citrátpufferben [21 g kristályos citromsav + 200 ml 1 n NaOH, vízzel feltöltve 500 ml-re, +15 ml butanol (tartósítás céljából)] 100° C-on 15 percig tartó melegítéssel, majd gyors lehűtéssel (ez után 30 perccel) nyert minták 574 $m\mu$ -os szűrőnél mutatkozó extinkciójának mérését alkalmaztuk (12). A vizsgálathoz általában 1 ml centrifugálással kapott oldatot 4,3 ml 0,065%-os, 5 pH-s citrátpufferben oldott ninhidrinnel kémcsőben összekevertünk, majd az egész kísérleti sorozatot vízfürdőben a jelzett hőkezelésnek vetettük alá és Pulfrich fotométerben mértük.

Vizsgálat purin- és pirimidin-származékokra

A fentiek szerint elkészített, kezelt ill. kezeletlen élesztőszuszpenziókból centrifugálással kapott tiszta oldatokat megfelelő (pl. 10-, 20-, 50-szeres) hígítás után Beckman-féle spektrofotométerrel* a 220–320 $m\mu$ -os sávban abszorpcióra megvizsgáltuk (rés: 0,9 mm). A 260 $m\mu$ -nál mutatkozó extinkciós maximum jelentkezését a nukleinsavak ill. ezek összetevői jelenlétének tudtuk be (5, 11).

A sejtpusztulás vizsgálata

Annak megállapítására, hogy valamely szer az alkalmazott töménységben az élesztőszuszpenzió sejtjeit az adott körülmények között megölte-e, *maradékflóra* kimutatást ill. meghatározást végeztünk. Ennek *kvalitatív* kiviteli módja abból állott, hogy a szuszpenzióból egy kacsnyit (még a centrifugálás előtt) malátás (10% szárazanyagtartalomra hígított malátakivonat) ferde ágára felkenve, 14–21 napig 26° C-on inkubáltunk és megállapítottuk a fejlődés tényét és időpontját. A *kvantitatív* maradékcsíraszám megállapítás során ugyanígy jártunk el, de nem az eredeti szuszpenzióból, hanem ennek sterilvizet hígításaiból vettünk ezúttal 1–1 ml-nyi mintát és ezt vittük a ferde malátás kémcsőbe. A hígítási sorozat szomszédos + és – tagjainak hígításából következtettünk a maradékcsíraszámra. — Az esetleg bekövetkező *alaki* elváltozásokra a centrifugálás maradékában mikroszkóppal vizsgáltunk.

* A készülék szives rendelkezésre bocsátásáért ezúton is köszönetet mondunk az Élelméztudományi Intézet vezetőjének és Biokémiai Osztályának.

I. táblázat
Kémiai és fizikai tényezők hatása az élesztő pusztulására és aminosav leadására

(4)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
	Vegyszer- adagolás (s ⁻¹ , g)	Sejt- pusztulás (%)	Aminosav- kiadás (%)	Vegyszer- adagolás (s ⁻¹ , g)	Sejt- pusztulás (%)	Aminosav- kiadás (%)
Kémiai behatások (4):						
Szeretlen vegyületek (5):						
savak (6):						
H ₃ BO ₃	2,9	< 90	—	44	> 99,9995	+
H ₂ SO ₄	0,49	+	+	5*	< 95	+
HCl	0,72	> 99,9995	+	0,12	> 99,9995	+
	4,7	> 99,9995	+	1,0	> 95	+
sók (7):						
Na ₂ B ₄ O ₇	1,9	< 90	—	0,09	> 95	—
Na ₂ B ₂ O ₇	3	< 90	—	1,4	> 99,9995	—
NaCl	4,7	< 90	—			
NaCl	9,0	< 90	—	5,5	> 95	+
NaCl	12,9	< 90	—	0,8	> 99,9995	+
NaF (pH = 5)	2,9	> 99,9995	—	3,1	> 99,9995	+
KCN	0,5	99,5	+	2,9	> 99,9995	+
KNO ₂	1,9	< 90	—	4,9	> 99,9995	+
KNO ₃	1,9	< 90	—	0,2	> 95	+
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	1,9	< 90	—	1,0*	> 95	+
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	2,9	< 90	—	2,6	> 95	+
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,9	99,95	+	0,5*	> 99,9995	±
HgCl ₂	0,1	99,995	+	0,5*	> 99,9995	±
oxidálószer (8):						
Cl (Neomagnol: benzolszulfokloramid-Na)	0,75	99,995	+	0,5	> 95	±
H ₂ O ₂	0,9	< 95	—	0,02	> 95	±
H ₂ O ₂	0,37	< 95	—			
Szerves vegyületek (9):						
zsírolószer (10):						
toluol (11)	4,1*	> 99,995	+	1,0	> 90	+
toluol (11)	4,1*	> 99,9995	+	30	—	—
alkoholok (12):						
metanol (13)	44	> 99,995	+			
etanol (14)	26,4	+	+			

* Az adagolt szer csak részben oldódott. (40) ** Itt csak 3 óra volt a behatás időtartama. (41) *** Itt csak 20 perc volt a behatás időtartama. (42)

Kísérleti eredmények

Aminosavak

A szervetlen savakkal, sókkal, oxidálószerekkel, továbbá a szerves vegyületek közül egy zsírdoldószerrel, alkoholokkal, egy aldehiddel, ketonnal, savakkal, észterekkel, egy csíragatólító festékkel és egy szénhidráttal végzett kísérleteink egy részének eredményeit az 1. táblázat és az 1. ábra szemlélteti, ahol az alkalmazott **vegyszeradagolást** (s%), a %-os sejtpusztulást és az aminosavkilépést (+) vagy -visszamaradást (—) tüntettük fel, mellőzve az alaki elváltozásokra vonatkozó észleléseket.

Látható, hogy: 1. a vegyszerek egy jó részének hatására aminosavak léptek ki az élesztősejtből olyan körülmények között, melyek fennforgása esetén a nem kezelt élesztő aminosavat nem, vagy alig észlelhető mértékben adott le a környezetnek.

2. Az aminosavkilépés és a nagymértékű sejtkárosodás (-pusztulás) tényei általában párhuzamosan haladnak.

3. Vannak vegyületek, melyeknél — az adott koncentrációk esetén — aminosavkilépés nem észlelhető. Itt rendszerint nem következik be erősebb, 90—95%-nál nagyobb mérvű élőcsíraszámcsökkenés.

4. Az aminosavdiffúziót nem mutató vegyszerek között viszont van olyan is, mely teljesnek mondható (99,9995%-os vagy nagyobb) élősejtszámredukciót hoz létre. Ezek a NaF és a formaldehid.

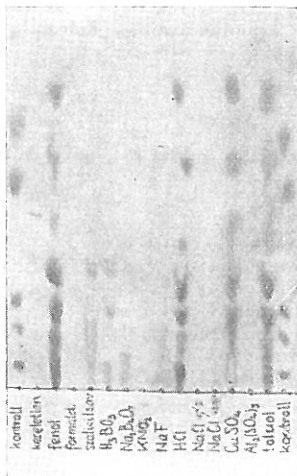
5. Vannak ezzel szemben vegyületek (pl. a timol, az aceton, kaprilsav, p-oxibenzoesavmetilészter, brómecetsavészterek, akriflavin), melyek az alkalmazott koncentrációban nem idéznek ugyan elő komolyabb mérvű sejtpusztulást, mégis erősebb-gyengébb aminosavkilépést mutatnak.

Egy további kísérletsorozatban az aminosavak, helyesebben a sejtből kiszivárgó N-vegyületek **kvantitatív meghatározását** végeztük el. A már említett módon eljárva, 20 s%-os élesztőszuszpenziókat állítottunk elő, melyek különböző vegyszereket tartalmaztak. 1 napos (+5° C-on való) behatás után a sejteket lecentrifugáltuk, és a minták tisztájában meghatároztuk a N-tartalmat Wagner-Parnas-készülékkel. Az eredményt a 2. táblázat mutatja be.

Látható, hogy az egyes vegyszerek hatása alatt létrejövő N-kiáramlás mennyire különböző mértékű. Legtöbb N-t a 25 és az 50 s%-os etilalkohol oldott ki. A NaF, a NaCl, a 10 s%-os etilalkohol, a formaldehid és a glicerin alig vagy egyáltalán nem okoz aminosavdiffúziót, bár a NaF és a CH₂O hatására a sejtek — a sterilítási próbák szerint — elpusztultak.

A kísérletek egy további csoportja arra irányult, hogy néhány vegyülettel az alkalmazott **koncentráció** és az aminosavkilépés összefüggését közelebbről tanulmányozzuk. A kénssavval, etanollal és erjedési amilalkohollal végzett kísérletek eredményét a 3., 4. és 5. táblázat foglalja össze.

Látható, hogy: 1. **kénssav** esetén 0,38% SO₂ (≈ 0,49% H₂SO₃) az a koncentráció, melynél ugrásszerűen erősödő aminosavkilépés következik be. A legkisebb



1. ábra.

Néhány vegyszer hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására. (Papírkromatogramm)

töménység, mely a jelen kísérleti körülmények között még éppen észlelhető aminosavdiffúziót okoz: 0,1% (1.000 mg/kg) SO_2 .

2. *Etilalkoholnál* 6,4 s%-tól kezd érvényesülni a hatás, mely 26,4 s%-nál hirtelen erősödik, ami, mint a kénessavnál, itt is a kilépő aminosavak számának és a foltok színintenzitásának növekedésében jelentkezik. Érdekes, hogy a 75,2 s%-os oldatban, melyet préselésztő és 96 tf%-os alkohol összekeverésével állítottunk elő, kevesebb és kisebb erősségű folt jelent meg, mint az 56,9 s% alkoholt tartalmazó szuszpenzióban. Ez a tömény alkohol közismerten gyengébb csíraölő hatásával jól párhuzamba állítható megfigyelés.

2. táblázat
Vegyszerek hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására

(1) Vegyszer	(2) s%	(3) Sejtből kiáramló N-tartalom a környező közegben s % (2)
		0
NaF	3	0,0019
NaCl	10	0,0030
Etanol (4)	10	0,0025
Etanol (4)	25	0,0855
Etanol (4)	50	0,0695
Formaldehid (5)	1,5	0,0031
Szalícilsav (6) ..	0,5	0,0160
Glicerin (7)	25	0,0041

3. *Amilalkohol* esetén 0,5 s% még nem, 5,1 s%-nyi adagolás viszont már erősen adta a reakciót (itt egyébként csak 3 órás volt a behatás időtartama).

Mind a három vegyületnél az aminosavak erősebb kiáramlása annál a vegyszerkoncentrációnál indult meg, amelynél a sejtek teljes pusztulása bekövetkezett.

A fizikai behatások, különösen a hőkezelés és a dörzsölés homokkal, aminosavdiffúziót eredményezett akkor is, ha a pusztulás nem volt teljes.

Kísérleteink egy további részében a nagy hőmérsékletek hatását kissé részletesebben tanulmányoztuk. A már ismertetett módon elkészített élesztőszuszpenzió 15–15 ml-et kémcsövekbe töltve, kémcsőállványon vízfürdőbe helyeztük,

3. táblázat
A kénessav hatása az élesztősejtre.

(1) Kénessav-koncentráció (s% SO_2)	(2) Mikroszkópi kép (24 órás behatás után)			(3) Csírapusztulás	(4) Papírkromatogramm (aminosavfoltok a jelzett R_F (%) -értékű helyeken)
	(5) Sejtalkak	(6) Vakuólum	(7) Granulum		
0	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — —
0,007	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — —
0,012	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — —
0,024	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — —
0,05	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — —
0,10	kerekded, ép, telt (8)	+	—	—	— — — — 28* — — —
0,14	ovális, zsugor. (9)	—	+	—	— — — — 28* — — —
0,19	ovális, zsugor. (9)	—	+	—	— 3* — — 29* — — —
0,38	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	— 2 8 16 25 — 54 71
0,76	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	— 2 7 16 25 — 53 70
1,14	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	— 2 7 16 26 — 54 70
1,52	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	— 2 7 16 26 — 54 70
1,90	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	0·6 3 7 17 25 32 52 68

* Kis intenzitású folt (10).

melynek hőmérsékletét folyamatosan növeltük 25° C-ról 100° C-ig. Időközben egy-egy hőfok (pl. 45, 50, 55 stb. °C) elérésekor kiemeltünk egy kémcsövet és folyóvízben gyorsan (kb. 50 mp alatt) 20–25° C-ra lehűtöttük. Leoltásokat végeztünk ezután csíraszámegállapítás céljából, majd megfigyeltük a sejtek mikroszkópi képét, lecentrifugáltuk az élesztőt, a tisztájában pedig részben összes aminosavtartalomra vizsgáltunk kolorimetrikusan ninhidrinnel (l. 3. oldalon), részben pedig 10-szeres töményítés után a szokásos módon papírkromatogramot készítettünk belőle. Az eredményeket a 2. és 3. ábra szemlélteti.

Látható, hogy az összes aminosavtartalom a sejteket körülvevő közegben 60° C elérésétől kezdve hirtelen erős ugrást mutat, 70° C fölött pedig lényegében már nem változik, még 15 perces 95° C-on tartás után sem. Ugyanezt a képet kaptuk a papírkromatogrammal is (4. ábra).

A sterilitási próbák szerint, míg 55° C-on a sejteknek kevesebb, mint 90%-a pusztult el, addig 60° C-on a pusztulás 90 és 99,5% között, 70° C-on 99,5, 75° C-on 99,9995, 85° C-on pedig több, mint 99,9995%-os volt.

Megvizsgáltuk ezután a melegítési idő szerepét az aminosavkiáramlásra. A már leírt hosszú hevítőcsövekbe 10–10 ml 20 s%-os élesztőszuszpenziót adva,

4. táblázat

Az etanol hatása az élesztősejtre

(1) Alkohol- koncentráció (s%)	(2) Mikroszkópi kép (24 órás behatás után)			(3) Csíra- pusztulás	(4) Papírkromatogramm (aminosavfoltok a jelzett R _F (%) -értékű helyeken)
	(5) Sejtalak	(6) Vakuólum	(7) Granulum		
0	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — —
3,2	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — —
6,4	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — — 40*48* — —
9,6	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — — 40*49* — —
12,9	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — — 33*38*48* — —
26,4	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	8 11 18 32 40 48 73 82
40,8	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	8 11 18 32 38 49 73 80
56,9	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	8 11 19 33 40 49 73 82
75,2	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	— 11*18*32*40*48*73*82*

* Igen gyenge intenzitású folt. (10)

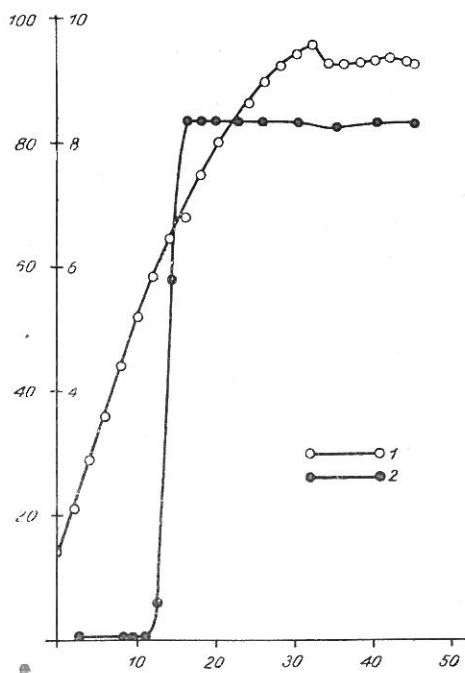
5. táblázat

Az erjedési amilalkohol hatása az élesztősejtre

(1) Amilalkohol- adagolás (%)	(2) Mikroszkópi kép (3 órás behatás után)			(3) Csíra- pusztulás	(4) Papírkromatogramm (aminosavfol- tok a jelzett R _F (%) -értékű helyeken)
	(5) Sejtalak	(6) Vakuólum	(7) Granulum		
0	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — —
0,005	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — —
0,05	kerekded, ép (8)	+	—	—	— — — — —
0,5	kerekded, ép (8)	±	—	—	— — — — —
5,1	ovális, zsugor. (9)	—	+	+	8 11 18 27 38 73 83

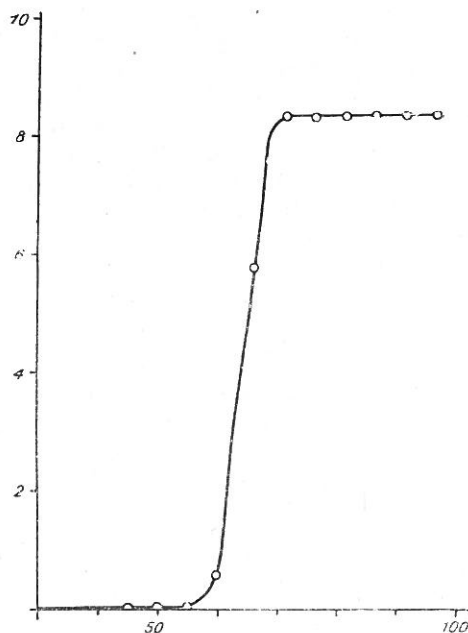
55 ill. 60° C-os vízfürdőbe tettük a mintákat, majd meghatározott időtartamok után egyet-egyét kivettünk, gyorsan lehűtöttük és az előbb felsorolt vizsgálatokat végeztük el. Az eredményt az 5., 6. és 7. ábra mutatja be:

55 és 60° C között tehát láthatólag nagy változások mennek végbe a sejtben. A sejtmembrán a hőmérséklet határok között kezdi elveszíteni aminosav-visszatartó képességét.



2. ábra.

A hőkezelés hatása aminosavak kiáramlására az élesztősejtből. Ordináta baloldala: a minta hőmérséklete (°C); jobboldala: kiáramlott aminosavak (ext. modulus 574 m μ -nál). Abszissza: hőkezelési idő (perc). [1] : hőmérséklet. [2] : aminosavtartalom.



3. ábra.

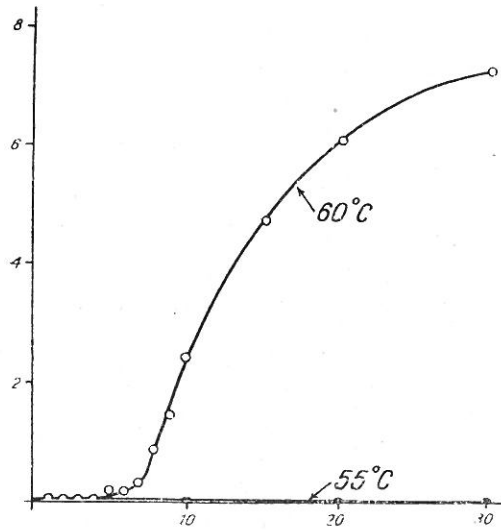
A hőmérséklet hatása az aminosavak kiáramlására az élesztősejtből. Ordináta: kiáramlott aminosav (ext. modulus 574 m μ -nál). Abszissza: hőmérséklet (°C).

Arra a kérdésre, hogy melyik jelenség jön előbb létre, a sejtek pusztulása-e vagy az aminosavdiffúzió, választ adnak a fenti kísérletek során elvégzett élőcsíraszámvizsgálatok. 55° C-on már 3 perc múlva 99,5%-os, az 5. perctől kezdve pedig 99,9995%-os ill. ennél nagyobb mérvű sejtpusztulást tapasztaltunk, ugyanakkor, amikor mérhető mennyiségű aminosav még 20 perces melegítéssel sem áramolt ki a sejtekből. 60° C-on már 3 perc alatt 99,9995%-os pusztulás jött létre, mérhető aminosavdiffúzió viszont csak a 4. perctől kezdve jelentkezett. Ebből nyilvánvaló, hogy az aminosavak melegítésre bekövetkező kiáramlása a sejtekből csak azok elpusztulása után következik be. A pusztulás tehát a sejt aminosav-vesztésének nem következménye, hanem vélhetőleg annak okozója. Az 55° C-on tapasztaltak azt is mutatják, hogy a sejtek teljes pusztulása önmagában még nem elégséges az aminosavak kiáramlásához. Ehhez a 60° C is kellett.

Külön problémát jelentett a nagy cukortartalmú oldatok erjedésének megállása szempontjából fontos kérdésnek, a szaharóz hatásának vizsgálata.

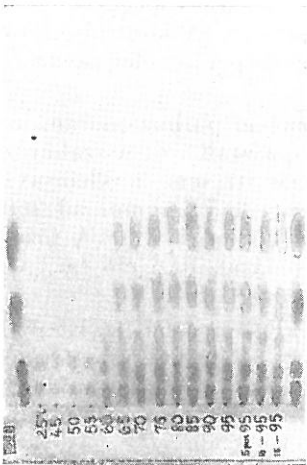
Előzetes kísérletek arra engedtek következtetni, hogy nagy töménységű cukoroldatokban a sejtekből aminosavak lépnek ki, ami egyik magyarázatát adhatná az erjedés megállásának ilyen közegben. Ennek a jelenségnek papírkromatográfiás vizsgálata azonban igen nehéznek bizonyult, mert a sok cukor miatt a kromatogramok nagyon eltorzultak, értékelésük bizonytalanná vált.

Ugyanígy nem lehetett a kolorimetrikus ninhidrin-próbát magán a cukros élesztőkivonaton elvégezni: az 50 s% cukrot és 20 s% préselésztőt tartalmazó szuszpenziót 1 napos állás után lecentrifugálva (40.000 f/p, 30 percig), üvegszűrőn sejtmentesre



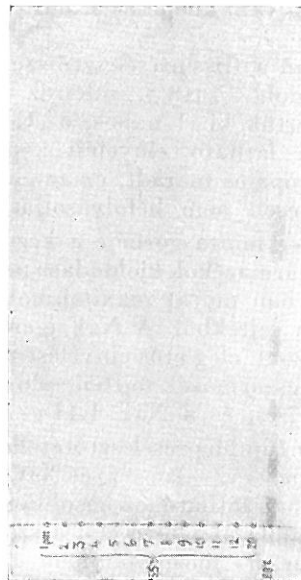
5. ábra.

A hőkezelés időtartamának hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására 55. ill. 60 °C-on. Ordináta: kiáramló aminosav (ext. modulus 574 mμ-nál). Abszcissza: Hőkezelési idő (perc).



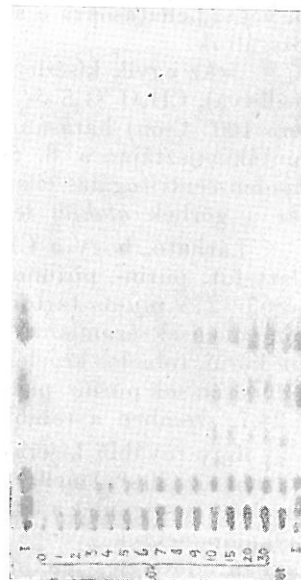
4. ábra

A hőkezelés hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására (Papírkromatogramm).



6. ábra

A hőkezelés időtartamának hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására 55° C-on (Papírkromatogramm).



7. ábra

A hőkezelés időtartamának hatása az élesztő aminosavainak kiáramlására 60° C-on (Papírkromatogramm).

szűrve, a nyert szörpöt 5 pH-s pufferben ninhidrinnel 100° C-on reagáltatva, lila helyett gyenge lilás piros színt kaptunk, mely azonban gyorsan elszíntelenedett. Aminosavakat tartalmazó élesztőfőzetnek a cukros kivonathoz keverése után a ninhidrin-reakció szabályosan pozitív volt: tehát a cukor nem zavarta ezt a reakciót. Hogy a piros (lilás piros) színeződést ninhidrinnel mi okozza, azt még nem sikerült tisztázni. Mindenesetre 50%-os vizes szaharózoldat ninhidrinnel nem adott színeződést. A tömény cukros kivonatban levő kis mennyiségű N-vegyület Kjeldahl-szerinti meghatározása is igen nagy nehézségekkel járt. A hatalmas tömegű cukor igen sok tömény H₂SO₄-at igényelt a roncsolásnál. A meghatározások megbízhatatlan eredményeket szolgáltattak.

A probléma megoldására végülis ioncserélő műgyantát alkalmaztunk (1., 8., 13) 10 ml cukros élesztőkivonatot (50 s% szaharóz és 20 s% friss présélesztő vízben szuszpendálva, 40.000 f/p-cel 15 percig centrifugálva, üvegszűrőn sejtmentesre szűrve) HCl-val regenerált, 2 g légszáraz anyagnak megfelelő Dowex 50 kationcserélő gyantára vittünk.

Vízzel való kimosás után a gyantát többszörösen, összesen kb. 40 ml (1+1) NH₄OH-dal kioldottuk. Az egyesített ammóniás mosóvizeket vízfürdőn bepároltuk. A maradékot 0,1 ml deszt. vízzel felvéve, 1 kacsnyit kromatografáltunk. Előhívás után a papíron aminosav-foltot nem lehetett megfigyelni.

Purin- és pirimidin-származékok

A nukleinsavkomponensek, pontosabban a 260 m μ -nál elnyelési maximumot mutató sejtalkotórészek (purin-, pirimidinszármazékok) különböző fizikai ill. vegyi behatásokra a sejtől való kilépését a már említett technikával (1. 3. old.) vizsgáltuk.

Az egyik kísérlet során a friss présélesztő-szuszpenziót NaF (3 s%, pH 5-re beállítva), CH₂O (1,5 s%), toluol (+4 tf%), szaharóz (50 s%), továbbá forralás (5 perc 100° C-on) hatásának tettük ki. 1 napos, 5° C-on állás után a centrifugált minták »tisztája« a 8. ábrán látható elnyelési képet adta. (A kontrol-minta minden centrifugálás ellenére opálos maradt, ez az elnyelési képet némileg zavarja, bár a görbék alakját lényegesen nem befolyásolja.)

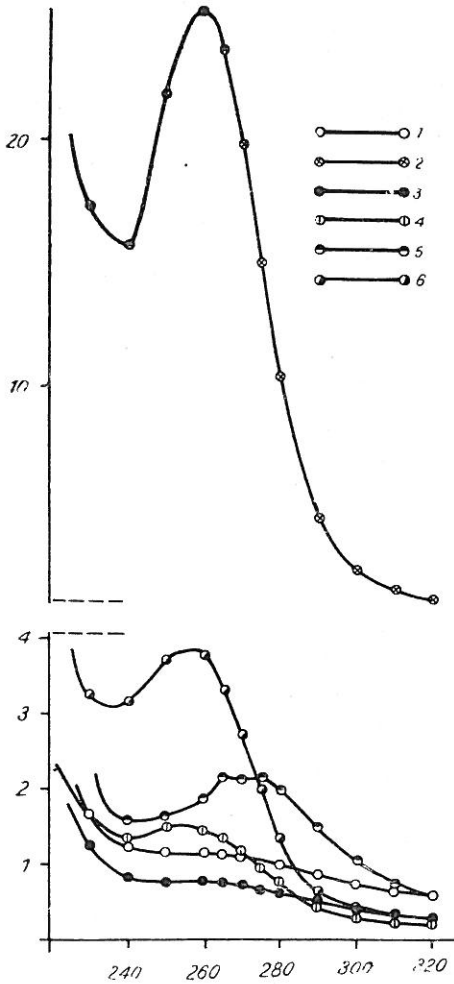
Látható, hogy a CH₂O-es minta görbéje a kezeletlenével párhuzamosan, az alatt fut, purin-, pirimidin-származékok kioldódása nem tapasztalható. A szaharóz a 265–275 m μ -os tartományban mutat maximumot, tehát itt sem nukleinsavkomponensek áramlanak ki a sejtekből. A NaF igen gyenge maximumot ad 260 m μ körül, toluolos kezelés viszont elég erős elnyelést mutat 260 m μ -nál. — A főzés különösen sok purin-, pirimidinszármazék sejtől való kioldódását idézi elő (m₂₆₀ = 24,7, szemben a toluol 3,77-es, és a NaF 1,44-es értékével).

Egy további kísérletben (újabb présélesztőtétellel) NaF (3 s%), CH₂O (1,5 s%) és szaharóz (50 s%) mellett szalicilsav (+0,5 s%) és NaCl (12 s%) hatását is vizsgáltuk. Az első két vegyület a 8. ábrában láthatóhoz hasonló képet adott, a NaCl a nukleinsavkomponensek gyenge kiáramlását idézte elő, a szalicilsav viszont a 270 m μ -os sávban adott éles maximumot, ha most már nem a tényleges elnyelési görbét rajzoltuk fel, hanem minden hullámhossznál az élesztőt tartalmazó minták extinkciójából levontuk az ugyanannyi vegyszert tartalmazó, de élesztőmentes kontroll extinkcióját és ezt az értéket tüntettük fel a grafikonon (9. ábra).

A szaharóznál így még jobban kitűnik, hogy az általa kioldott anyagok nem nukleinsav természetűek.

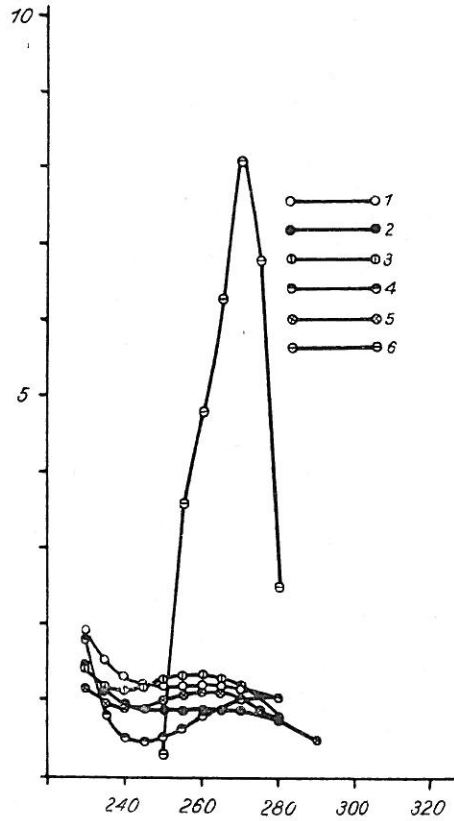
A továbbiakban a hőkezelés hatását a purin-, pirimidinszármazékok kilépésére részletesebben vizsgáltuk. A friss élesztőszuszpenziók centrifugált tisztájának abszorpciós spektrumát 60° C-on történő, változó ideig tartó melegítés után mérve, a 260 m μ -nál tapasztalt extinkciós modulusértékek a 10. ábrán látható módon alakultak.

Az ugyanakkor megejtett papírkromatográfiás aminosavvizsgálatok ugyanezt a képet mutatták.



8. ábra.

Néhány fizikai és kémiai kezelési módszer hatása az élesztő purin-, pirimidin-származékainak kiáramlására. Ordináta: extinkciós modulus. Abszcissza: hullámhossz (m μ). [1] Kezeletlen [2] Hővel kezelt [3] Formaldehiddel kezelt. [4] NaF-dal kezelt. [5] Szaharózzal kezelt. [6] Toluollal kezelt.

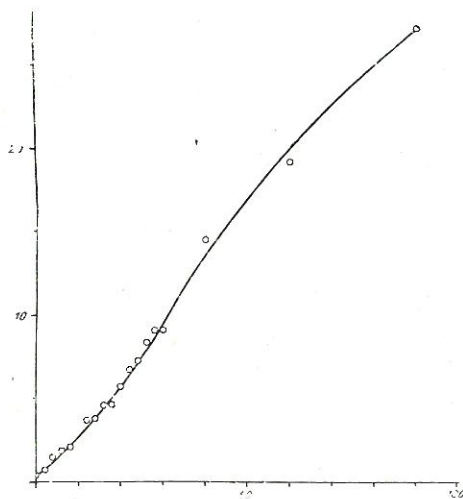


9. ábra.

Néhány vegyszer hatása az élesztő purin-, pirimidin-származékainak kiáramlására. Ordináta: extinkciós modulus. Abszcissza: hullámhossz (m μ). [1] Kezeletlen. [2] Formaldehiddel kezelt. [3] NaF-dal kezelt. [4] Szaharózzal kezelt. [5] NaCl-dal kezelt. [6] Szalicilsavval kezelt.

Alaki változások

Ami a sejtek *alaki* elváltozását illeti, általánosságban megállapítható, hogy: 1. az sok esetben komolyabb mértékben annál a vegyszerkoncentrációnál jelent-



10. ábra.

A hőkezelés időtartamának hatása az élesztő purin-, pirimidin-származékainak kiáramlására 60 °C-on. Ordináta: extinkciós modulus 260 m μ -nál. Abszcissa: hőkezelési idő 60 °C-on (perc).

CuSO₄, HgCl₂, Cl₂, toluol, metanol, etanol, amilalkohol, fenol, timol, aceton, hangyasav, ecetsav, kaprilsav, tejsav, szalicilsav, p-oxibenzoészavmetilészter, brómecetsavészterek és akriflavin.

2. A NaF és a formaldehid ezzel szemben láthatólag a *membrán* fenti értelemben vett *károsodása*, tehát átteresztővé válása *nélkül* öli meg a sejteket.

Arról, hogy ezek a vegyszerek *nem* a valóságban kilépett aminosavak lekötése, blokkolása (l. formaldehid!) stb. révén tették lehetetlenné azok papírkromatográfiás kimutatását, meggyőződünk a már említett (2. táblázat) mennyiségi vizsgálatokon kívül az aminosavak CH₂O-del (1,4%) ill. NaF-dal (3,4%) történő reagáltatása és ezután következő kromatografálás révén is. Színintenzitáscsökkenést vagy az aminosavfoltok eltűnését nem észleltük, ami különösen a formaldehid esetén meglepő jelenség és nyilván az oldatok híg mivoltával magyarázható.

3. *Egyszerű plazmolízis* esetén (amikor a vegyület egyéb gátló, ölő hatást nem fejt ki), pl. NaCl vagy szaharóz alkalmazásakor, az aminosavak az erős alaki elváltozások, zsugorodás, a vakuólumok eltűnése stb. ellenére láthatólag nem lépnek ki a vízzel együtt a citoplazmamembránon keresztül.

4. Növekvő vegyszerkoncentrációk esetén a meghatározott körülmények között, adott ideig tartó kísérletek során a sejtől távozó aminosavak száma egyre növekszik. Úgy látszik — bár ezt további vizsgálatokkal kell még véglegesen tisztázni — hogy az aminosavak egy bizonyos *sorrendben* hagyják el a sejtet.

5. *Fizikai behatások*, pl. *hőkezelés* következményeként az aminosavak szintén kiáramlanak az élesztősejtből. Ez a folyamat 55 és 60° C között indul meg és a melegítés időtartamának és hőmérsékletének növekedésével párhuzamosan erősödik. A sejtpusztulás mértékét összehasonlítva az aminosavkilépéssel, megállapítható volt, hogy előbb elpusztulnak a sejtek és csak ezután jön létre (bizonyos hőmérsékletek felett) az aminosavak diffúziója.

kezett, melynél az aminosavdiffúzió erősödése volt megfigyelhető, és az eredetileg nagy, telt, rendszerint nagy vakuólummal rendelkező, kevés granulomot tartalmazó sejtek kicsire zsugorodásában, a vakuólumok eltűnésében, erős szemcsézettségben és gyakran sok sejt teljes vagy részleges kiürülésében, a sejtfalak felszakadásában nyilvánult meg.

2. Több esetben észleltük (így pl. a KNO₃, NaCl, szaharóz és részben az Al₂(SO₄)₃ alkalmazásakor), hogy erős alaki elváltozások (plazmolízis) ellenére nem lépett ki aminosav a sejtől (ilyenkor egyébként a sejtek pusztulása sem volt nagymértékű).

Az eredmények értékelése és összefoglalása

1. A megvizsgált vegyületek közül csíragátló hatásukat részben ill. főleg a *citoplazmamembrán károsítása* révén fejtik ki a következők: SO₂, HCl, KCN,

6. Néhány vegyszernél ill. fizikai tényezőnél megvizsgáltuk, hogy hatásukra az élesztőből lépnek-e ki purin- és pirimidinszármazékok (nukleinsavösszetevők). Formaldehidnél negatív volt az eredmény. A szalicilsavnál és a szaharóznál az abszorpciós maximum-értékek nem 260 $m\mu$ -nál jelentkeztek, tehát nyilvánvalóan más természetű anyagok áramoltak ki a sejtekből. A NaF és a NaCl hatására igen kis mennyiségű 260 $m\mu$ -os elnyelésű anyag oldódott csak ki. Toluollal és főleg forralással azonban erős diffúzió volt tapasztalható. 60° C-on a hőkezelés időtartamának növekedésével és az aminosavak kiáramlásával párhuzamosan erősödött a purin-, pirimidinszármazékok kioldódása.

Érkezett : 1952. november 26.

Irodalom

1. Bendall, J. R., Partridge, S. M. & Westall, R. G. : Nature, **160**. 374. 1947.
2. Gale, E. F. & Taylor, E. S. : J. Gen. Microbiol. **1**. 77. 1947.—ref. : Wyss, O. in Adv. Food Res., **1**. 373. 1948.
3. Hochkiss, R. D. : Adv. Enzym., **4**. 193. 1948.
4. Höber, R. : Physical Chemistry of Cells and Tissues. London. 1947. (p. 274).
5. Lavin, G. I., Thompson, R. H. S. & Dubos, R. J. : J. Biol. Chem., **125**. 75. 1938.
6. Lindan, O. & Work, E. : Biochem. J. **48**. 337. 1951.
7. Ogur, M., Minckler, S., Lindegren, G. & Lindegren, C. C. : Arch. Biochem. **40**. 175. 1952.
8. Partridge, S. M. : Nature, **169**. 496. 1952.
9. Plenger, R. : Rev. fermn. ind. alim. **4**. 103. 1949.
10. Roine, P. : Soumalaisen Tiedeakatemia Toimituksia, Sarja, A., II. 26. 1947.
11. Salton, M. R. J. : J. Gen. Microbiol., **5**. 391. 1951.
12. Smith, A. M. & Agiza, A. H. : Analyst, **76**. 623. 1951.
13. Thompson, A. R. : Nature, **169**. 495. 1952.

О МЕХАНИЗМЕ ВЛИЯНИЯ, ПОГУБЛЯЮЩЕГО МИКРООРГАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

К. Ваш

Научно-Исследовательский Институт Консервной, Мясной и Холодильной Промышленности,
Будапешт

В ы в о д ы

На *Sach. cerevisiae* — в качестве модели — была исследована гибель микроорганизмов в результате вредного влияния ограниченности клетки от окружающей среды и сокращения этого влияния. Дезорганизация мембраны цитоплазмы исследовалась бумагохроматографией аминокислот, выступающих из клеток, хингидриной реакцией, проведенной в растворе, а также спектрофотометрическим измерением дериватов пурина и пиримидина.

Влияние, тормозящее действие микроорганизмов, оказывается отчасти или преимущественно повреждением мембраны цитоплазмы следующими из исследованных соединений: SO_2 , HCl , KCl , CuSO_4 , HgCl_2 , Cl_2 , толуол, метанол, этанол, амилный спирт, фенол, тимол, ацетон, муравьиная кислота, уксусная кислота, каприльная кислота, молочная кислота, салицильная кислота, метильный эфир параоксибензойной кислоты, эфиры бромовой уксусной кислоты и акрифлавин (рис. 1, табл. 1, 2).

NaF и формальдегид, напротив, повидимому погубляют клетки без повреждения мембраны в вышеупомянутом смысле, т. е. без того, чтобы она стала пермеабильной.

При простом плазмоллизе (когда соединение не оказывает другого тормозящего, погубляющего влияния), например при применении NaCl или сахара, амино-

кислоты — несмотря на сильные деформации, сморщивание, исчезновение вакуолей и т. п. — повидимому не выступают через мембрану цитоплазмы вместе с водой.

В опытах, проведенных в определенных условиях и в определенный срок, при повышении концентрации химикатов все больше возрастает число аминокислот, выступающих из клеток (табл. 3, 4, 5). Повидимому — хотя это должно быть окончательно выяснено в ходе дальнейших исследований — аминокислоты выступают из клеток в определенном порядке.

В результате физических воздействий, например согревания, аминокислоты также выступают из дрожжевых клеток. Этот процесс наступает в пределах 55 и 60° (рис. 2, 3, 4) и усиливается параллельно с продолжительностью и температурой согревания (рис. 5, 6, 7). При сравнении степени гибели клеток и выступления аминокислот было установлено, что сперва погибают клетки и только позже (при определенных температурах) наступает диффузия аминокислот.

У некоторых химикатов и физических факторов было установлено, выступают ли под их воздействием из дрожжей дериваты пурина и пиримидина (входящие в состав неуклонных кислот) (рис. 8, 9). У формальдегида был получен отрицательный результат. У салициловой кислоты и сахара величина максимума абсорпции появились не при 260 м μ , следовательно, из клеток, очевидно, выступили вещества другого характера. Под воздействием NaF и NaCl растворилось только ничтожное количество веществ, поглощаемых при 260 м μ . При применении толуола и главным образом при кипячении, однако, была установлена сильная диффузия. При 60° параллельно с увеличением длительности согревания и с выступлением аминокислот усиливалось растворение дериватов пурина и пиримидина (рис. 10, 11).

Рис. 1. Влияние некоторых химикатов на выступление аминокислот из дрожжей (бумажный хроматограмм). »kezeletlen« = без обработки. Примечание: во всех опытах, отмеченных в рисунках, была применена 20%-ная суспензия прессованных дрожжей.

Рис. 2. Влияние согревания на выступление аминокислот из дрожжевых клеток. Ордината: налево — температура образца (в° по Цельсию), направо — выступившие аминокислоты (экст. модуль при 574 м μ). Абсцисса: продолжительность согревания (в мин.). (1): температура, (2): содержание аминокислот.

Рис. 3. Влияние температуры на выступление аминокислот из дрожжевых клеток (см. опыт, отмеченный на рис. 2). Ордината: выступившие аминокислоты (экст. модуль при 574 м μ). Абсцисса: температура (в° по Цельсию).

Рис. 4. Влияние согревания на выступление аминокислот из дрожжей (бумажный хроматограмм) (см. опыты, отмеченные на рис. 2 и 3). »perc« = минуты. Примечание: Цифры обозначают температуру согретых образцов.

Рис. 5. Влияние продолжительности согревания на выступление аминокислот из дрожжей при 55 и 60°. Ордината: выступающие аминокислоты (экст. модуль при 574 м μ); Абсцисса: продолжительность согревания (в мин.).

Рис. 6. Влияние продолжительности согревания на выступление аминокислот из дрожжей при 55° (бумажный хроматограмм). »perc« = минуты.

Рис. 7. Влияние продолжительности согревания на выступление аминокислот из дрожжей при 60° (бумажный хроматограмм). I: смесь известных аминокислот.

Рис. 8. Влияние некоторых методов физической и химической обработки на выступление дериватов пурина и пиримидина из дрожжей. Ордината: экстинкционный модуль. Абсцисса: длина волн (м μ). (1) Без обработки (нижняя кривая). (2) Согретый (на 100° за 5 мин.) (верхняя кривая). (3) Обработанный 1,5%-ным формальдегидом. (4) Обработанный 3%-ным NaF (pH = 5,0). (5) Обработанный 50%-ным сахарозом. (6) Обработанный + 4%-ным толуолом.

Рис. 9. Влияние некоторых химикатов на выступление дериватов пурина и пиримидина из дрожжей. Ордината: Экстинкционный модуль. Абсцисса: длина волн (м μ). (1) Необработанный. (2) Обработанный 1,5%-ным формальдегидом. (3) Обработанный 3%-ным NaCl. (4) Обработанный 50%-ным сахарозом. (5) Обработанный 12%-ным NaCl. (6) Обработанный 0,5%-ной салициловой кислотой.

Рис. 10. Влияние продолжительности согревания на выступление дериватов пурина и пиримидина из дрожжей при 60°. Ордината: экстинкционный модуль при 260 м μ . Абсцисса: продолжительность согревания на 60° (в мин.).

Табл. 1. Влияние химических и физических факторов на гибель дрожжей и на выступление аминокислот из них. (1) Дозировка химикатов (в % по весу). (2) Гибель клеток (в %). (3) Выступление аминокислот. (4) Химические воздействия. (5) Минеральные соединения. (6) Кислоты. (7) Соли. (8) Окислители. (9) Органические соединения. (10) Растворители жиров. (11) Толуол. (12) Спирты. (13) Метанол. (14) Этанол. (15) Амилный спирт (из брожения). (16) Фенол. (17) Тимол. (18) Альдегид. (19) Формальдегид. (20) Кетон. (21) Ацетон. (22) Муравьиная кислота. (23) Уксусная кислота. (24) Каприльная кислота. (25) Пальмитин-

ная кислота. (26) Молочная кислота. (27) Бензойная кислота. (28) Салицильная кислота. (29) Сложные эфиры. (30) Метильный эфир параоксibenзойной кислоты. (31) Эфиры бромовоуксусной кислоты (смесь). (32) Краска. (33) Акрифлавин. (34) Углевод. (35) Сахароз. (36) Физические воздействия. (37) Варка. (38) Замораживание. (39) Обтирание песком. (40) Дозированный химикат растворился только частично. (41) Здесь продолжительность воздействия составляла всего 3 часа. (42) Здесь продолжительность воздействия составляла всего 20 минут. (У других химикатов продолжительность воздействия составляла 24 часа при 0—4°.)

Т а б л. 2. Влияние химикатов на выступление аминокислот из дрожжей. (1) Химикат. (2) % по весу. (3) Содержание азота, выступившего из клеток, в окружающей среде. (4) Этанол. (5) Формальдегид. (6) Салицильная кислота. (7) Глицерин.

Т а б л. 3. Влияние сернистой кислоты на клетки дрожжей. (1) Концентрация сернистой кислоты (% SO₂ по весу). (2) Картина под микроскопом (после 24-часовой обработки). (3) Гибель микроорганизмов. (4) Бумажный хроматограмм (пятна аминокислот на местах отмеченной величины % R_F). (5) Форма клеток. (6) Вакуоля. (7) Гранула. (8) Округлый, целый, полный. (9) Овальный, суженный. (10) Пятно невысокой интенсивности.

Т а б л. 4. Влияние этанола на дрожжевые клетки. (1) Концентрация спирта (% по весу). (2) Картина под микроскопом (после 24-часовой обработки). (3)—(10) См. табл. 3.

Т а б л. 5. Влияние амильного спирта (из брожения) на дрожжевые клетки. (1) Дозировка амильного спирта (%). (2) Картина под микроскопом (после 3-часовой обработки). (3)—(9) см. табл. 3.

On the Mechanism of Antimicrobial Action

Interference with the Cytoplasmic Membrane

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

Summary

The destruction of microorganisms, involving injury or disruption of the barrier between the cell and the environment, was studied using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. Disturbance of the cell membrane was examined by the ninhydrine test (performed in the supernatant), by paper chromatography of amino acids and by spectrophotometry of purine and pyrimidine constituents leaving the cells.

Of the compounds studied, SO₂, HCl, KCN, CuSO₄, HgCl₂, Cl₂, toluene, methyl, ethyl and amyl alcohols, phenol, thymol, acetone, formic, acetic, caprylic, lactic, and salicylic acids, the methyl ester of p-hydroxybenzoic acid, esters of bromoacetic acid, and acriflavine, all exert their action, partly or entirely, by attacking the cytoplasmic membrane. (Fig. 1., Tables 1., 2.)

On the contrary, NaF and formaldehyde appear to kill the cells without making the membrane more permeable to amino acids.

In spite of great changes in form, of shrinking and of disappearance of the vacuoles, in simple plasmolysis (*i. e.* when no real inhibition or killing occurs, as *e. g.* with NaCl or sucrose), amino acids, unlike water molecules, apparently do not leave the cells.

The number of amino acids diffusing from within the cell grows with increase in concentration of the chemical agent. (Tables 3., 4., 5.) Amino acids apparently pass the cell membrane in a certain sequence, though this point remains to be cleared up more thoroughly.

Physical agents, *e. g.* heat, also cause diffusion of amino acids from the yeast cell. This process starts somewhere between 55 and 60° C. (Figs. 2., 3., 4.) and increases in strength when raising the duration and temperature of heating. (Figs. 5., 6., 7.) Comparative studies on the destruction of cells and on the leakage of amino acids show destruction to be the primary process and leakage the secondary one.

In the case of certain chemical and physical agents, migration of purine and pyrimidine derivatives (characteristic components of nucleic acids) was also examined. (Figs. 8., 9.) With formaldehyde, this effect was absent. Salicylic acid and sucrose did not yield maximum absorption at 260 mμ, indicating the lack of outward diffusion of the above compounds. NaF and NaCl

caused a very small amount of 260 $m\mu$ -absorbing material to migrate from the cells. Toluene and especially heating produced strong leakage of purine and pyrimidine derivatives. At 60° C, outward diffusion of the constituents mentioned increased in strength parallel to the increase in duration of heating and to the leakage of amino acids (Fig. 10.)

Fig. 1. The effect of certain chemical agents (highest concentrations stated in Table 1.) on the diffusion of amino acids from the yeast cell. (Paper chromatogramme). »kezeletlen« = untreated. Note: In all experiments reported in Figs. 1—10. 20% (w/w) suspensions of bakers' yeast were used.

Fig. 2. The effect of heat treatment on the diffusion of amino acids from the yeast cell. Ordinate: left side scale: temperature of the sample (°C); right side scale: amino acid content of the suspending medium (extinction modulus at 574 $m\mu$) (ninhydrine test.) Abscissa: duration of heating (mins.) [1] Temperature. [2] Amino acid content.

Fig. 3. The effect of temperature on the leakage of amino acids from the yeast cell. (see: experiment reported in Fig. 2.) Ordinate: Amino acids leaving the cells (extinction modulus at 574 $m\mu$) (ninhydrine test.) Abscissa: Temperature (°C).

Fig. 4. The effect of heating on the diffusion of amino acids from the yeast cell (Paper chromatogramme). (See: experiment reported in Figs. 2 and 3.) «perc» = minutes. The figures represent the temperature of the heated sample.

Fig. 5. The effect of duration of heating at 55 and 60° C resp., on the diffusion of amino acids from the yeast cell. Ordinate: amino acid leaving the cell (extinction modulus at 574 $m\mu$.) Abscissa: duration of heating (mins.)

Fig. 6. Effect of the duration of heating at 55° C on the leakage of amino acids (Paper chromatogramme). «perc» = minutes.

Fig. 7. Effect of the duration of heating at 60° C on the leakage of amino acids (Paper chromatogramme). «perc» = minutes; I: a mixture of known amino acids

Fig. 8. Leakage of purine and pyrimidine derivatives caused by certain physical and chemical agents. Ordinate: extinction modulus. Abscissa: wavelength ($m\mu$). [1] Untreated [2] Heat treated [3] Treatment with formaldehyde (1,5% w/w) [4] Treatment with sodium fluoride (3% w/w, pH=5.0). [5] Treatment with sucrose (50% w/w). [6] Treatment with toluene (+4% w/w).

Fig. 9. Leakage of purine and pyrimidine derivatives caused by certain chemical agents. Ordinate: extinction modulus (corrected for the extinction of the compound in pure aqueous solution). Abscissa: Wavelength ($m\mu$). [1] Untreated. [2] Treatment with formaldehyde (1,5% w/w). [3] Treatment with sodium fluoride (3% w/w). [4] Treatment with sucrose (50% w/w). [5] Treatment with sodium chloride (12% w/w). [6] Treatment with salicylic acid (+0,5% w/w).

Fig. 10. Effect of heat treatment at 60° C on the leakage of purine and pyrimidine derivatives. Ordinate: extinction modulus at 260 $m\mu$. Abscissa: duration of heating at 60° C (mins.)

Table 1. The Effect of Chemical and Physical Agents on the Destruction of Yeast and on the Leakage of Amino Acids from the Cells. (1) Chemical agents added (% by weight). (2) Destruction of cells (in % of initial viable count). (3) Leakage of amino acids. (4) Chemical agents. (5) Inorganic compounds. (6) Acids. (7) Salts. (8) Oxidizing agents. (9) Organic compounds. (10) Fat solvent. (11) Toluene. (12) Alcohols. (13) Methanol. (14) Ethanol. (15) Amyl Alcohol. (16) Phenol. (17) Thymol. (18) Aldehyde. (19) Formaldehyde. (20) Ketone. (21) Acetone. (22) Formic acid (23) Acetic acid. (24) Caprylic acid. (25) Palmitic acid. (26) Lactic acid. (27) Benzoic acid. (28) Salicylic acid. (29) Esters. (30) Methyl ester of p-hydroxybenzoic acid. (31) Esters of bromoacetic acid (mixture). (32) Dye. (33) Acriflavine. (34) Carbohydrate. (35) Sucrose. (36) Physical agents (37) Heating. (38) Freezing. (39) Grinding with quartz sand. (40) The compound did not dissolve completely. (41) The compound was allowed to act for only 3 hrs. (42) The compound was allowed to act for only 20 mins. (With the other chemical agents the duration of exposure was 24 hrs.) The temperature of exposure was 0 to 4° C in all experiments.

Table 2. The Effect of Chemical Agents on the Leakage of Amino Acids from the Yeast Cell. (1) Chemical Agents. (2) % by weight. (3) Total N in the supernatant (4) Ethanol. (5) Formaldehyde. (6) Salicylic acid. (7) Glycerol.

Table 3.: The Effect of Sulphurous Acid on the Yeast Cell. (1) Concentration of SO₂ (% by weight). (2) Microscopical examination (after 24 hrs. exposure at 0 to 4° C). (3) Destruction of cells. (4) Paper chromatogrammes [amino acid spots in the regions indicated by the R_F (%)-values]. (5) Form of the cells. (6) Vacuoles. (7) Granula. (8) Round, entire, turgid. (9) Oval, shrunken. (10) Weak spot.

Table 4. The Effect of Ethanol on the Yeast Cell. (1) Concentration of alcohol (% by weight). For (2) to (10) see: Table 3.

Table 5. The Effect of Amyl Alcohol on the Yeast Cell. (1) Addition of amyl alcohol (% by weight). (2) Microscopical examination (after 3 hrs. exposure at 0 to 4° C). For (3) to (9) see: Table 3.