

NÉHÁNY ADAT A DIFENILAMIN KAROTINIDSZINTÉZISRE GYAKOROLT HATÁSÁRA VONATKOZÓAN

SCHNEIDER GYULA, MATKOVICS BÉLA

Szegedi Tudományegyetem Szerves Kémiai Intézete,
Szeged

ZSOLT JÁNOS

Szegedi Tudományegyetem Növényélettani Intézete,
Szeged

Az irodalomban többen foglalkoztak azzal, hogy a mikroorganizmusokban található karotinoid festékek szintézisét a difenilamin bizonyos koncentrációkban gátolja [2, 3, 7, 8]. A difenilaminnak a karotin festékre való erős hatását a mikroorganizmusok színhalványodása is sokszor már mutatja. Vizsgálatokat végeztünk a *Lupinus luteus* gyökérgumóiból izolálható légköri nitrogénkötő mikroorganizmussal [4], mely igen dús karotinoidtartalmúnak bizonyult. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a karotinoid festékek kvalitatív és kvantitatív elemzésével kövessük a difenilamin hatását. Hogy minden kétséget kizáróan azonosíthassunk egy karotinoid festéket egy már ismert szerkezetű festékkel, kristályosan kellett volna a mikroorganizmusból izolálnunk. Ez az egzakt módszer túlságosan sok vizsgálati anyagot igényelt volna. A karotinoid festékek azonosítását ezért a következő adatok figyelembevételével végeztük el:

1. oldószerek között való megoszláskor észlelt viselkedése,
2. kromatogramban mutatott helyzet,
3. keverékkromatogram,
4. spektrum adatai látható fényben (AM).

Ezeknek az adatoknak alapján tájékoztató jellegű eredményeket kívántunk adni a mikroorganizmusban levő karotinoid festékek változásáról difenilamin hatására.

Kísérleti rész

NÉMETH GYÖRGY 1953-ban a *Lupinus luteus* gyökérgumóiból egy piros pigmentet képző és a légköri nitrogént kötő mikroorganizmust izolált (5—6). Vizsgálatainkat ezzel a törzzsel végeztük [4].

Kísérleteinkben az egyes tenyészeteket ROUX-palackban tenyésztettük az alábbi összetételű táptalajon:

I. sz. táptalaj:	5 g	babkivonat
	2 g	szaharoz
	0,2 g	KH_2PO_4
	0,3 g	NaCl
	0,2 g	CaCO_3

2 g agar-agar
100 ml desztillált víz

II. sz. táptalaj: A fenti I. sz. táptalajhoz 5 mg difenilamint tettünk.

III. sz. táptalaj:

1	g	szárított élesztő
1	g	szaharoz
0,5	g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,1	g	KH ₂ PO ₄
0,05	g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0,01	g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
0,01	g	NaCl
2	g	agar-agar
100	ml	desztillált víz
20	g	difenilamin

A táptalajokat 110 °C-on 20 percig sterilizáltuk, majd kémcsőtenyészetekkel beoltottuk. A tenyésztés 20 °C-on 10 napig történt. A difenilamint tartalmazó és az összehasonlítóként felhasznált tenyészetek növekedési sebességében semmiféle különbség nem mutatkozott. Az egyes tenyészetek színében azonban lényeges különbség volt észlelhető. Addig, amíg az I. sz. táptalajon növekedett telep élénk piros színű, a II. sz. táptalajon levő telep halvány krémszínű és a III. sz. táptalajon kifejlődött telep teljesen színtelen volt.

A tizedik nap után a telepeket a táptalaj felületéről lekapartuk, fiziológias konyhasóoldattal lemostuk és centrifugálás után a leülepedett részt infravörös lámpa alatt Na₂S₂O₄ jelenlétében megszáritottuk.

A festékek kivonására, szétválasztására és azonosítására a következő módszert találtuk a legalkalmasabbnak, amely az irodalmi adatok szerint a leginkább használatos a karotinoidok feldolgozásakor [1].

A szárított mintákat alkoholos közegben kvarchomokkal finomra eldörzsöltük, majd az így kapott pépből a festékeket éterrel vontuk ki. Az alkoholtartalmú éteres részt vízzel kimostuk és 20%-os metanolos KOH-dal egy éjjelen át szobahőmérsékleten szappanosítottuk. Az így nyert száraz maradékot 1 : 1 arányú petroléter-metanol elegyben oldottuk, majd víz hozzáadásával epifázisos és hipofázisos részre választottuk szét a festékkeveréket. (Oldószerek között való megoszlás.) Az epifázisos festékeket Ca(OH)₂-on petroléterből, a hipofázisos festékeket pedig CaCO₃-on benzol—petroléterből kromatografáltuk. Az egyes festékek spektrumainak adszorpciós maximumait látható fényben (LÖWE—SCHUMM rácsspektroszkóppal) határoztuk meg. A spektrum meghatározása után az egyes frakciókat tovább kromatografáltuk, míg egységes festékhez jutottunk, melyek azonosítása a már ismert festékek keverék-kromatogram, ill. spektrum alapján történt.

Eredmények részletezése

10 g piros szárított készítményt, amelyet difenilaminmentes táptalajon kontrollképpen tenyésztettünk, a fent megadott módszerrel extraháltunk és a kromatografáláshoz előkészítettünk. A kromatografálás előtt mind az epi-, mind a hipofázisos festékből koncentrációmeghatározást végeztünk.

Epifázisos festék mennyisége: 255 gamma/10 gramm
 Hipofázisos festék mennyisége: 30 „ „
 Összesen: 285 gamma/10 gramm

Epifázisos festékek		gamma/10 g	AM benzolban		AM petroléterben	
E1	Torulin	34	536	499	518,5	485
E2	Torulin	97	536	499	518	485
E3	γ -carotin	55	508	476	492	460
E4	β -carotin	44	497	462	483	452

Hipofázisos festék		gamma/10 g	AM benzolban		AM petroléterben	
H1	Torularhodin	25	558	(519)	539	503

10 g halvány krémszínű készítményt, amelyet 5 mg/l difenilalanin táptalajhoz tételével nyertünk, extraháltunk és kromatografáláshoz előkészítettünk. Az anyagban levő kevés festék miatt csak a kromatografálás előtt tudtunk koncentrációmeghatározást készíteni, az egyes festékeket külön-külön nem határoztuk meg.

Epifázisos festék mennyisége 95 gamma/10 gramm
 Hipofázisos festék mennyisége 15 gamma
 Összesen: 110 gamma/10 gramm

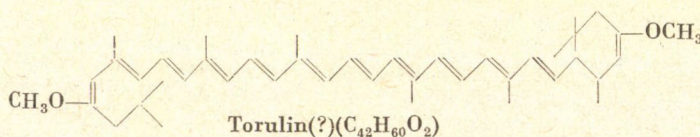
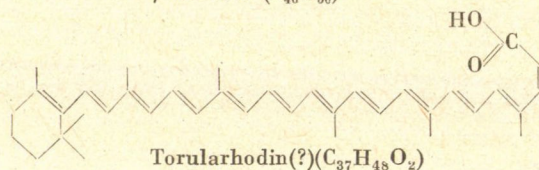
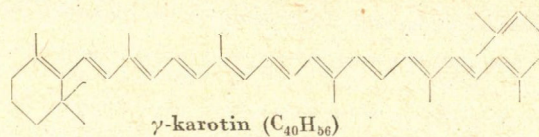
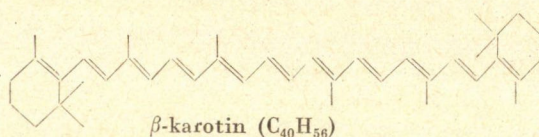
Epifázisos festékek		gamma/10 g	AM benzolban		AM petroléterben	
E1	Torulin		536	(498)	518	484
E2	γ -carotin		508	476	492	(460)
E3	β -carotin		497	(462)	483	452

Hipofázisos festék			AM benzolban		AM petroléterben	
H1	Torularhodin		558	(518)	539	503

10 g színtelen készítmény, melyet 20 mg/l difenilamin táptalajhoz tételével nyertünk, nem tartalmazott hipofázisos festéket. Az epifázisos festék koncentrációja is igen alacsony volt.

Epifázisos festék mennyisége: 40 gamma/10 gramm

Epifázisos festékek		AM benzolban		AM petroléterben	
E1	Torulin	536	(498)	518	484
E2	β -carotin	(496)	(462)	483	452



Eredmények megvitatása

A kontroll tenyészetekben 285 γ /10 g száraz anyagra vonatkoztatott össz-karotinoidot találtunk, amely kb. 8 : 1 arányban oszlott meg az epi- és hipofázisos festékek között. Ugyanis 255 γ /10 g epifázisos festék mellett 30 γ /10 g hipofázisos festék volt kimutatható. Az epifázisos festékek főtömegét a torulin tette ki, amely a $Ca(OH)_2$ (kalciumhidroxid) oszlopon intenzív rózsaszín és ciklámen színnel adszorbeálódott, összmennyisége 131 γ /10 g volt.

A másik két epifázisos karotin a β - és γ -karotin volt, amelyek sárga színnel adszorbeálódtak.

Egyetlen hipofázisos festékként a torularhodin volt kimutatható 30 γ /10 gnyi mennyiségben.

5 mg/l DFA táptalajhoz tétele esetén a telepek halvány rózsaszínűek és összkarotinoid-koncentrációjuk 110 γ /10 g-ra csökkent. Ebből az epifázisos festékek mennyisége 95 γ /10 g-ot tesz ki, míg a hipofázisos festékeké 15 γ /10 g-ot.

Főleg a torulin az, amelynek a mennyisége igen alacsonnyá válik.

20 mg/l DFA esetén az összkarotinoid koncentráció 40 γ /10 g lesz. Ilyenkor kromatográfiával csak két epifázisos festék, a torulin és β -karotin mutatható már ki.

Összefoglalás

Sikerült megállapítanunk, hogy egy, a légköri nitrogént élénken kötő piros pigmentet képző élesztő törzs, amely a *Rhizobiumok* mellett bizonyos *Lupinus luteusok* légköri nitrogént kötő gümőiben él, a haemoprotein mellett főleg különböző karotinoidoktól nyeri a színét.

Ezen színes karotinoidok szintézise DFA-al gátolható és ilyenkor elsősorban a torularhodin és β -karotin mennyisége csökken, de a többi színes karotin össz mennyisége szintén lényegesen alacsonyabb lesz.

IRODALOM

1. CHOLNOKY L., K. GYÖRGYFY, E. NAGY, M. PÁNCZÉL: Vizsgálatok a karotinoid-festékekről. I. A vörös paradicsom-paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) festékei. MTA VII. Oszt. Közl. 5, 419—441 (1955).
2. COHEN—BAZIRE, G., R. Y. STANIER: Specific inhibition of carotinoid synthesis in a photosynthetic bacterium and its physiological consequences *Nature* 181, 250—254 (1958).
3. GOODWIN, T. W., H. G. OSMAN: General cultural conditions controlling carotenoid synthesis in the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* *Biochem. J.* 53, 541—546; (1953), 56, 222 (1954).
4. NÉMETH GY., B. MATKOVICS: Ein neuer, ein rotes Pigment erzeugender und den atmosphärischn Stickstoff bindender Mikroorganismus *Naturwiss.* 44, 621 (1957).
5. NÉMETH GY.: Nyírségi Mezőgazdasági Kísérleti Intézet Évkönyve 74 (1954).
6. NÉMETH GY.: *Ibid* 102 (1955).
7. SCHLECHTA, L., O. GABRIEL, O. HOFFMANN—OSTENHOF: Separation of carotinoid synthesis from fat synthesis in *Rhodotorula gracilis* by diphenylamine *Nature* 181, 268 (1958).
8. TURIAN, G.: Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un Bacille paratuberculeux III. Inhibition de la pigmentation par la diphenylamine *Helv. Chim. Acta* 33, 1988—1993 (1950).