

ZSIRSAVAK ÉS ZSIRSAVSZÁRMAZÉKOK SZEREPE ÓSZI ÉS TAVASZI

BUZÁK FAGYÁLLÓSÁGÁBAN

Doktori dolgozat

Vigh László

Biokémiai Intézet

1977.

B1459



TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1.
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
	1. Az alacsony hőmérsékletek által okozott károsodás tényezői	4.
	2. A jégképződés mechanizmusát befolyásoló tényezők	6.
	3. Membránok, membránlipidek	9.
	4. Alkohokok és viaszok	11.
III.	CÉLKITŰZÉS	14.
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16.
V.	KISÉRLETI EREDMÉNYEK	
	1. A különböző buzafélék zsírsavösszetételének vizsgálata	30.
	2. 1- ¹⁴ C jelzett ecetsav és zsírsavak felvétele és belépülése buzafélék zsírsavjaiba	31.
	3. 1- ¹⁴ C oleát felvétele és beépülése egy ismeretlen neutrális lipidbe	36.
	4. Az ismeretlen anyag beazonosítása	40.
	5. A buzákban található szabad zsíralkohokok szétválasztása levélfelszíni /viasz/ és un. "belső" alkoholokra	42.
	6. Alkohokok gázkromatográfiás vizsgálata	49.
	7. Alkohokok hatása a lipidek fázisátmeneti hőmérsékletére	55.
	8. Linolén alkohol hatása a lipidek vízáteresztő képességére	58.
VI.	AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	60.
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	69.
VIII.	RÖVIDÍTÉSEK	71.
IX.	IRODALOM	72.

I.

B E V E Z E T É S

A Föld egész növényzetének elterjedésében az egyes fajok és fajták különböző éghajlati övekben való természetes előfordulásában, az egyik legfontosabb tényező a növények hőtűrőképessége.

A hideg- és fagyérzékenység nem csak növényenként változik, de egyazon növény esetében is eltér a különböző évszakokban, sőt a különböző fejlődési állapotokban is. Bizonyos növényfélék nagymértékben alkalmasak az akklimatizálódásra, mások kevésbé, megint mások egyáltalán nem. A növények hideg- és fagy-tűrőképessége igen sok nézőpontból vizsgálható. Az igen nagy számú értekezésben termodinamikai, fizikai, kriobiológiai alapelvek és a biokémiai és biofizikai szemlélet előtérbe helyezése is megtalálható. Ennek megfelelően az eltérő érzékenység és a sejtkárosodás mechanizmusa tekintetében is számos, egymástól látszólag független hipotézis látott napvilágot. Mielőtt ezeket a következő fejezetben áttekintenénk, vizsgáljuk meg, hogyan oszthatók fel a növények az eltérő hideg, ill. fagy-tűrőképességük alapján, és melyek azok a tényezők, amelyek a pusztuláshoz vezetnek, és amelyekkel a későbbiekben részletesen foglalkozunk.

a/ Hidegérzékeny növények:

Sejtjeikben már enyhe 0°C és 15°C között/ körülmények között is komoly károsodások lépnek fel. Az alacsony hőmérséklet következtében lipidjeik fázisváltozást szenvednek,

ezzel egyidejűleg membránjaik elveszítik szemi-permeabilitásukat, rideggé válnak, a membránokhoz kötött enzimek aktivációs energiája a többszöröse is nőhet.

b/ Korlátozott fagyűrőképességek:

Az ide tartozó növények számára a víz fagyáspontja feletti hőmérsékletek csak kisebb, védhető veszélyt jelentenek. A károsodás elsősorban a víz megfagyására, a jég okozta igen sokoldalú stresszre vezethető vissza. A legtöbb növény ugyanakkor - ha már túlélte a fagyási hőmérsékleteket - bizonyos mennyiségű jég jelenlétét is képes eltűrni. A korlátozott fagyűrőképességű növények egyik alcsoportjába tartozó tavaszi búzafélék, a burgonya, a borsó közös tulajdonsága, hogy legfeljebb néhány fokos fagyot képesek túlélni.

A másik alcsoport növényei, így pl. a téli búzafélék, a káposzta, stb. rendelkeznek az akklimatizálódás képességével, -20°C -os hőmérsékleteket is elbírnak elfagyás nélkül.

c/ Mélyen tuhuló növények:

Elsősorban fás, erdei növények, amelyek sejten belüli vízkészlete különböző okok miatt vagy képes elhagyni a sejtet, vagy tuhul, és ezért nem fagy meg.

Mivel ebben a disszertációban a tavaszi és őszi búzafélék hideg- és fagyűrését vizsgáljuk, ezért a továbbiakban a korlátozott fagyűrőképességű növények csoportjával foglalkozunk

részletesebben.

A gyors hőmérsékletváltozás okozta fagyveszély közvetve vagy közvetlenül a megfagyott víz és a membránok szerepével hozható összefüggésbe.

Amikor a növényi sejtek megfagynak, jég képződik: ha a keletkezett jég intracelluláris, ez azonnali pusztulást jelent a növény számára. A télálló növényeknél extracelluláris jégképződéssel kell számolni: a jégkristályok a sejtfalon kívül, általában annak szomszédságában képződnek.

Mindazok a tényezők, amelyek az intracelluláris fagyást képesek meggátolni, továbbá szerepet játszanak egy alacsony hőmérsékleten megfagyó, mozgékony, rugalmas és magas vízáteresztőképességű membrán megtartásában vagy kifejlesztésében, együttesen felelősek a jó télállóságért.

II.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

1/ Az alacsony hőmérsékletek által okozott károsodás tényezői

A végleges és irreverzibilis károsodás egyik oka minden esetben a fénymikroszkóppal jól látható jégkristályok sejten belüli képződése, tehát az intracelluláris fagyás. Bár a membránok sérülése a legkézzelfoghatóbb jele az intracelluláris fagyásnak, a fagykárosodás sejtszinten történő magyarázatában ez az ok csak egy a sok közül /mechanikai stressz, dehidratáció, stb./.

Mivel a természetben az 1°C/h sebességű hűlésnél csak igen ritkán lép fel nagyobb sebességű hőmérsékletváltozás, ezért a fenti sebességnek megfelelően a sejten belüli víz nagy része a sejtközi állományba távozik, és bizonyos hőmérsékleti tartományban ott is fagy meg.

Bár ez az extracelluláris jégképződés tekintélyes mértékű károsodás a protoplazma számára, az intracelluláris fagyás elkerülése a leglényegesebb módja a túlélésnek.

Mivel a mesterséges szárítás igazoltan kisebb veszély, mint a jégképződéssel járó ekvivalens száradás, ezért a jégkristályok jelenléte, a kiszáradás, továbbá a lipidek fázisszeparációja okozta károsodások nyilvánvalóan együttesen hatnak. A sejtkárosodással kapcsolatos hipotézisek nagy része a fehérjék ép-ségben maradását, a szerkezet és a funkció egységét hangsúlyozza. Ilyen pl. az "élet víz" /vital-water/ hipotézis, amelynek lényege



az, hogy bizonyos mennyiségű kötött víz elvesztése a fehérjék irreverzibilis megváltozásához vezet.

A "szulfhidril-diszulfid" elképzelés szerint az alacsony hőmérsékletek hatására eltérő rezisztenciájú növényekben a fehérjék szulfhidril csoportjai eltérő mértékben oxidálódnak és kapcsolódnak diszulfid hidakká.

A "kisózásos" hipotézis alapja az, hogy az extracelluláris fagyással egyidejűleg a sejten belül nagymértékben megnőhet az ionkoncentráció, toxikus szintet is elérve.

Direkt bizonyítékok vannak a fehérjék oldhatóságának csökkenésére és alegységekre történő disszociációjára a fagyást követően /1, 2, 3, 4/. Ciklikus fagyasztás és felmelegítés szintén megnövelte a fehérjék denaturációját /5/. Bizonyos krioprotektív anyagok, így pl. glicerol, dimetil-szulfoxid, etilén-glikol gátolták a fehérjék denaturációját fagyasztás közben /6, 7/. A száradás- és fagystressz hatásának másik leglényegesebb oldala a membrán /8, 9, 10, 11/.

Thilakoid membránokban a foszforiláció szétkapcsolódik fagyasztás közben /12, 13/. Fejlődő buzanövényekből izolált mitokondriumok légzési aktivitását vizsgálva Lyons és Raison /14/ beszámoltak arról, hogy az oxidatív aktivitás sebessége a hideg-érzékeny növényeknél erősen lecsökkent, miközben kimutatható volt a membránlipidek fázisváltozása.

Összefoglalva, a károsodás két legfőbb tényezője a jégkristályok képződése és a membránok fizikai-kémiai állapotának megváltozása.

2. A jégképződés mechanizmusát befolyásoló tényezők

a/ Fagyáspontcsökkenés:

Ugy tűnik, hogy a fagyáspontcsökkenés önmagában nem kizárólagos oka a megfagyás elkerülésének. Ugyanakkor valószínű, hogy a téli búzák akklimatizációs képességében nagy szerepe van a fagyasztás közben fellépő oldott anyag koncentráció-növekedésének, ami a sejten belüli fagyáspontcsökkenéshez vezet /15, 16/. Abban az esetben, ha a növény képes túrni a dehidrációt, úgy közvetlen kapcsolat mutatható ki a fagyáspontcsökkenés és a fagytürés között.

b/ Tuhulás, jégkristályképződés:

Mint ismeretes, a tiszta víz egyenletes hőelvonással bizonyos körülmények között -38°C -ig tuhútható. /Ez az ún. homogén nukleációs hőmérséklet./ A természetben a tuhulást számos körülmény gátolja: a dér, a hó, a talaj jége, amint érintkezik a tuhult növényvel, ott azonnal megindul a jégkristályképződés. Ugyanakkor a kezdeti tuhulás mértéke befolyással van a kristálymagok képződésének helyére és eloszlására is. Szintén hatással van a tuhulásra a növények kora és érettsége: Öregebb növények kevésbé képesek tuhulásra. Szemben a néhány fokos fagyáspontcsökkenéssel, több tíz fokos tuhulás az ún. mélyen tuhuló növények /deep supercooling plants/ esetében különösen jelentős. A sejttel közvetlen szerephez jut az intracellulá-

ris fagyás megakadályozásában /17/, mivel a sejtfal mikrokapillárisai olyan kicsik, hogy megakadályozzák a jégmagok és csirák képződését a sejten belül.

c/ A kristályok eloszlása és a kristályok növekedési sebessége:

A lassu extracelluláris fagyás során képződő jég frontjának terjedési sebessége és a kristályok képződésének helye a túlülés szempontjából szintén jelentős tényezők. Általában a víz olyan helyeken fagy meg, ahol a jég a legkisebb veszélyt jelenti a növény számára. Azt is kimutatták /18/, hogy a fagyot jobban tűrő növényekben a víz bizonyos jégképző helyekre vándorol /"jégképző központok"/, ahol a jég növekedése nem ütközik nagyobb ellenállásba: ezáltal kisebb a mechanikai károsodás esélye. Ugyanakkor a kevésbé fagytüreő növényekben a jégkristályok eloszlása sokkal diffuzabb, ennél fogva hatása sokkal rombolóbb.

A lehülés gyorsasága a jégkristályok növekedésére és méretére van hatással. A gyors fagyás eredményeképpen sok kis apró kristály képződik, a víz nagy része nem képes elvándorolni a rendelkezésre álló rövid idő alatt a jégképző centrumokba.

d/ A lehülés és felmelegedés sebessége:

A hűtési sebesség és a túlülés kapcsolatát több szerző is vizsgálta /19/. A legtöbb kifagyasztható víz a növé-

nyekben 0°C és -10°C között kristályosodik, és amint arra már az előző pontban utaltunk, alacsonyabb hűtési sebességnél a jég extracellulárisan és főleg olyan kitüntetett helyeken képződik, amelyek képesek befogadni a növekvő jégkristályokat /20, 21, 22/.

Eltérő téliállóságu búzákkal végzett kísérletekből kiderült, hogy a víz megfagyása $-2,6^{\circ}\text{C}$ -on kezdődött minden esetben, viszont továbbra is ugyanezen a hőmérsékleten tartva a növényeket, a teljes jégképződés befejezése növényenként különböző ideig tartott. Míg a gyengén hidegtűrőkben kb. 60 percig, addig a jó hidegtűrőkben 30 perc alatt megfagyott a szövetek vıztartalma, kivéve természetesen az ún. "kötött" vagy "ki nem fagyasztható" vizet. Legújabb vizsgálatok szerint az ún. kötött víznek nincs köze a fagytüréshez, sőt, éppen azokban a búzafélékben találtak -40°C -on ki nem fagyasztható vízből kevesebbet /levélsúlyra számítva/, amelyek a legjobb hidegtűrők /23/. Az ismételt fagyasztás és felmelegítés szintén növeli a fagyás veszélyét. Pl. a teljesen akklimatizálódott téli búzákat -19°C -t is túléltek, de két lehűlésből és felmelegítésből álló ciklusos előkezelés után -12°C -on elfagytak.

e/ A szövetek nedvességtartalma:

A szövetek nedvességtartalma és fagytürés-képessége között egyértelmű kapcsolat van. Ha a levelek fagyhatás előtti

viztartalma magas, akkor az elfagyás veszélye jóval nagyobb, mint az alacsony nedvességtartalmuaknál. A sejtek belső, továbbá a levelek teljes nedvességtartalma legfőképpen a sejtmembránok ill. a levélfelsőszini viaszok minőségével, permeabilitásával függ össze, amelyekre a későbbiekben részletesen kitérünk. A legtöbb növény gyökérének nagyobb a viztartalma mint a szárnak és a leveleknek, és valószínű, hogy ez az egyik oka annak a közismert ténynek, hogy a gyökér magasabb hőmérsékleten fagy meg.

3. Membránok, membránlipidek

A sejtfa és a membránok megakadályozhatják a jégfront bejutását a sejtekbe, vagyis az extracelluláris fagyás intracellulárisá válását. A sejten belüli jégképződés megakadályozása azonban önmagában nem elégséges a túléléshez. A sejtmembrán és a sejtrészek /mitokondriumok, kloroplasztisz, stb./ membránjainak lipidjei normális körülmények között az ún. folyékony-kristályos állapotban vannak. Abban az esetben, ha a környezet hőmérséklete annyira lesüllyed, hogy eléri a membránlipidek ún. tranzíciós hőmérsékletét, úgy a membránlipidek fázisváltáson mennek át. A szilárd-gél állapotba került membránlipidek a membránok összes funkcióját károsan befolyásolják. A tranzíciós hőmérséklet alatt elveszik a membrán szemipermeabilitása, merev lesz és töredezett. A membránhoz kötött enzimek aktivációs energiája megnövekszik, a sejt végül elpusztul. Természetesen a membránok viselkedését a lipideken kívül más tényezők is befo-

lyásolják - így elsősorban a fehérjék -, ezek a hatások azonban elhanyagolhatók a lipidek szerepéhez képest.

A membránlipidek fázisváltózási hőmérsékletének csökkentésében, mozgékonyaságuk növelésében és általában a membránok működésében az alábbi tényezők játszanak szerepet.

a/ A jelenlévő lipidek minősége:

Az egyes lipidfélésegek fázisváltózási hőmérsékletének mérésére ma már több módszer is ismeretes, így pl. differenciál termikus analízis /DTA/, elektronspin-rezonancia- és magnágneses rezonancia spektroszkópia /ESR, NMR/, turbidimetria, fluoreszkáló festékek módszere, stb.

Többféle tranzícióméréssel is igazolták, hogy az azenos zsírsavakkal észterezett különböző foszfolipidek tranzíciós hőmérséklete eltér /a palmitinsavval észterezett szintetikus foszfatidil-kolin és foszfatidil-etanolamin tranzíciós hőmérséklete között kb. 25°C differencia van/. E különbségek, amelyek a zsírsavaktól függetlenek, a foszfolipidek ún. "fej-csoportjának" /head group/ szabad rotációjával kapcsolatosak. A rotáció mértéke a poláros csoportok térbeli elhelyezkedésétől, a szomszédos lipidmolekulák töltésétől és elhelyezkedésétől, a közeg pH-jától, illetve a mélonként kötött víz mennyiségétől függ. Az eltérő hideg, ill. fagyűrőképeségű növények akklimatizációja során megváltozik azok lipidösszetétele. Pl. a hideg hatására megnövekedő mennyiségű galaktolipidek - amelyek fő-

leg a kloroplasztiszokban található - feltehetően kapcsolatban állnak a fotoszintetikus elektrontranszportlánc lipofil tagjaival és a fotoszintézis hatásosságát is befolyásolják /24/.

b/ A zsírsavak minősége:

Ismeretes, hogy a zsírsavak lánchosszának csökkenése, ill. az alkil láncban előforduló kettős kötések számának növekedése a zsírsavak olvadáspontját csökkentik. Ez a tény, igen nagyhatású lehetőség a membránlipidek tranzíciós hőmérsékletének csökkentésében, hiszen mindegyik lipidfőleiség közös komponensei az észterezett zsírsavak. A búzában található legfontosabb zsírsavak a következők: palmitin-, sztearin-, olaj-, linol- és linolénsav, vagy szimbolikusan sorra: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3. /Az első szám a lánccszáma, a második pedig a lánccszámban lévő kettőskötéseknek a száma./

Az irodalomban sok olyan adat található, amelyek azt igazolják, hogy az egyes szervezetek a környezet hőmérsékletéhez való adaptáció eredményeként megnövelik zsírsavjaik telítettségét. A növényekben található legtelítetlenebb zsírsav a linolénsav: mennyisége a hőmérséklet csökkenésével 10-20 %-kal is megnövekedhet /25, 26, 27, 28, 29, 30/.

4. Alkoholok és viaszok:

A legtöbb növény felszínét egy sokkomponensű lipidkeverék borítja, amely gyakran kristályos formában van jelen, és amelyet

növényi viaszoknak nevezünk.

A növényi viaszok legáltalánosabb komponensei a szénhidrogének, viaszészterek, szabad alkoholok és savak. Ketonok, másodrendű alkoholok, diolok, aldehidok, hidroxiketonok stb. kis mennyiségben szintén megtalálhatók bennük. A viaszok legalapvetőbb funkciója a szervezetek megvédése a környezet különböző veszélyeivel szemben, ill. a növények vízháztartásának szabályozása. A viaszok, funkciójuknak megfelelően, elsősorban a levelek, a szár és a gyümölcsök felszínén fordulnak elő /31/.

A különböző búzák levélfelszíni viaszkomponenseinek arányára és mennyiségére vonatkozó leírásokkal az irodalomban nem találkozunk. A β -diketonok, OH- β -diketonok, ill. a buzafélek viaszkomponensei között legnagyobb arányban jelenlévő szabad zsíralkoholok között esetleg fennálló reakciókapcsolatról egy szerző tesz említést /32/.

A zsíralkoholok keletkezésére a növényi szervezetekben több lehetőség is adódik. A legvalószínűbb az, hogy kétféle enzim, az acil-CoA redukáz és az aldehid redukáz savból és aldehidből közvetlenül alkoholokat állít elő. Az aldehidet vagy az acil-CoA redukáz direkt termékei, vagy más reakciók, esetleg L -oxidáció köztitermékei. Exogén jelzett zsírsavak / C_{12} - C_{18} / gyors inkorporációját alkoholokba fiatal káposztalevelekben megfigyelték már /33/. Egyébként más levélfelszíni viaszkomponensek is a levelek belsejében képződnek, és valószínű, hogy a kutikulában lévő pórusokon keresztül választódnak ki oda. A kiválasztódás igen gyors: a jelzett ecetsavból $25^{\circ}C$ -on

szintetizálódó paraffinok aktivitásának 1-2 %-a volt csak a
levelek belsejében, a többi a levelek felszínén /34/.

III.

C É L K I T Ű Z É S

Amint az az előzőekből kitűnt, a különböző téliállású növények alacsony hőmérsékleteken bekövetkező károsodásának két fő oldala van: a membránlipidek hidrofób részenek fázisváltozása és a szövetekben /sejten belül vagy kívül/ megfagyó víz okozta roncsolás.

Az adaptációs mechanizmus, amelynek révén a téli búzafélék a tavasziakkal szemben képesek -10 , -20°C -os hőmérsékleteket túlélni, lényegében még ismeretlen.

Ugyanakkor a primer károsodások okának és módjának egyre egzaktabb behatárolása /elsősorban a differenciál termál analitikai /DTA/, és magmágneses rezonancia spektroszkópiás /NMR/ módszerek révén/ ma már egyértelműen azt mutatja, hogy két - egymással szorosan összefüggő - irányba folytatott kísérletek vezethetnek megoldáshoz.

E két irány a növények lipidjének és vízháztartásának vizsgálata.

Az elmondottakkal összhangban, mi a disszertáció készítése előtt, ill. aközben is - figyelembe véve a műszerek adta lehetőségeket - a növények lipidanyagcseréje és a hőmérséklet kapcsolatával foglalkoztunk.

Célunk az volt, hogy a következő problémákra keressünk választ:

- a/ Van-e kapcsolat a búzák eltérő télállósága és a bennük lévő zsírsavak összetétele között.
- b/ léteznek-e egyéb lipidszerű anyagok a búzafélékben, amelyek hozzájárulhatnak a fagytűrés fokozásához.
- c/ ha léteznek a b/ pontban említett anyagok, akkor azok hogyan fejtik ki hatásukat.

IV.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinket a következő fajokkal végeztük:

Triticum Spelta

Triticum Chartlicum

Triticum Aestivum

A Triticum Aestivum fajon belül az alábbi fajtákkal kísérleteztünk:

Penjamo 62

Miranovskaja 808

Kavkaz

Short Mexican

Cerros

Bezosztaja

A fenti buzafélék az SzBk Genetikai Intézetének buzafajta gyűjteményéből származtak. A kísérletek során felhasznált 6-7 napos csirabvénnyeket csapvizzel átitatott szűrőpapíron, 5-7000 lux fényerejű lámpákkal megvilágított Petricsészékben termesztették.

Felhasznált vegyszerek:

Az $1-^{14}\text{C}$ nátrium acetát /fajl.akt.: 58,1 mCi/mM/ és $1-^{14}\text{C}$ olajsav /fajl.akt.: 58,8 mCi/mM/ a Radiochemical Centre Amersham,

míg az $1\text{-}^{14}\text{C}$ laurinsav /fajl. akt.: 10 mCi/mM/ $1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitinsav /fajl. akt.: 59,9 mCi/mM/ $1\text{-}^{14}\text{C}$ sztearinsav /fajl. akt.: 52,0 mCi/mM/ $1\text{-}^{14}\text{C}$ olajsav /fajl. akt.: 59,9 mCi/mM/ és $1\text{-}^{14}\text{C}$ linolsav /fajl. akt.: 59,8 mCi/mM/ a New England Nuclear készítménye volt.

Kísérleteink során használtunk még triciált vizet /fajl. akt.: 1,4 Ci/ml/.

A 8-anilino-naftalin-szulfonát /ANS/ a Fluka Ag készítménye volt.

A szintetikus L- α -dipalmitoil- β -lecitin, és a foszfátid sav a Nu Check Prep cégtől származott.

Radioktív prekurzorok bevitele

Az ecetsav kivételével minden prekurzor K-sóját képeztük, majd a desztillált vízben oldott K-sók koncentrációját úgy állítottuk be, hogy az ul-onként 2×10^5 cpm zsírsavsót tartalmazzon. Ezután egy 10 ul-es Hamilton fecskendővel 2 ul-t befecskendeztünk a fenti oldatból a búzák hipokotiljébe. Bizonyos esetekben az $1\text{-}^{14}\text{C}$ jelzett zsírsavak sóit 0,25 M szukrózt tartalmazó 0,1 M K-foszfát pufferbe tettük /pH = 7,4/ /1 uCi zsírsav/1 ml puffer/, majd az így elkészített oldattal végeztünk inkubálást. A csiránövények leveleit borotvapengével 1-2 mm-es szeletekre vágtuk, és a szeletek súlyát megmérjük. Ezután a levélszeleteket /1 g levélszelet/10 ml a fent ismertetett puffer/ különböző ideig és különböző hőmérsékleteken tartottuk. A kísér-

let végén a be nem épülő radioaktivitás egy jelentős részét acetátos inkubálás esetén bő telített Na-acetátos, más esetben tömény K-sztearátos mosással távolítottuk el a levelek felszínéről.

A lipidek extrahálása

A megfelelő körülmények között /idő, hőmérséklet/ történő inkubálás befejeztével a fiatal leveleket apró darabokra vágtuk, súlyukat megmértük és Potter-féle homogenizátorban, forró izopropilalkoholban elhomogenizáltuk. Az izopropilalkohol a levelekben igen aktív foszfolipáz D inaktiválása céljából szükséges /35/. Végül az extraktumhoz a levél súlyának 20-szorosát kitevő mennyiségű kloroform:metanol = 2:1 elegyét adtuk és a homogenizátumot 3 órán át állni hagytuk. A fázisokat 0,1 M KCl-al szétválasztottuk, majd a továbbiakban a kloroformos extraktot elosztottuk. Abban az esetben, ha a levélfelszíni viaszokat és a visszamaradó lipideket különválasztottuk, a következő módon jártunk el: Az ecetsavas inkubálás befejezése után a leveleket 30 másodpercig forró petroléterbe máztottuk, és a levelek maradék lipidjeit a már ismertetett módon csak ezután extraháltuk ki. A levél felszínéhez tapadó és fel nem szívódott jelzett ecetsavat úgy választottuk el a jelölődő viaszkomponensektől, hogy a petroléteres fázist inaktív acetáttal telített vízzel többször összeváztuk, míg a vizes fázis aktivitása háttér szintre nem süllyedt.

A lipidkomponensek vékonyrétegekromatográfiás elválasztása

A foszfolipidek, galaktolipidek, szabad zsírsavak és alkoholok elválasztását petroléter:éter:ecetsav = 80:20:1, valamint acetón:benzol:víz = 91:30:8 arányu elegyével szilikagél G lapon végeztük.

A levélfelszíni viaszok komponensekre történő elválasztása szilikagél G lapokon benzol futtatószerrel történt. A zsírsavmetilészterek telítetlenség szerinti szétválasztásához AgNO_3 -al impregnált szilikagél G lapokat használtunk. A szolvens petroléter:éter:ecetsav = 85:15:1 arányu elegye volt.

A foltokat minden esetben 0,006 %-os Rhodamin GG és 8 %-os KOH vizes oldatának 1:1 arányu elegyével hívtuk elő és UV fény alatt detektáltuk /36/.

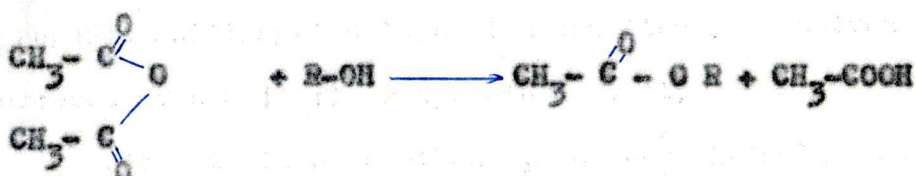
A zsírsavak metilezése, az alkoholok acetilezése és oxidációja CrO_3 -al

A különböző lipidstrukturákhoz kötött vagy szabad zsírsavakat 80°C -on 5 % HCl-t tartalmazó metanollal metileztük, olyan ampullákban, amelyeket a leforrasztás előtt CO_2 -al fuvattunk le. Kb. 2 óra eltelte után az egyes zsírsavkomponensek átmetileződtek. Az ampullák tartalmát kéncsővekbe vittük át, majd azonos mennyiségű vizet és 2 ml petrolétert hozzáadva alaposan összeráztuk. A fázisok szétválása után a metilésztereket tartalmazó felső fázissal dolgoztunk tovább.

Az alkoholok acetilezéséhez mintánként 2 ml ecetsavanhid-

rid és 0,5 ml piridin elegyét használtuk. A reakció 75°C-on másfél óráig tartott, majd a lehűtött elegyhez 2 ml vizet adtunk, és az acetilezett terméket petroléterrel kicsttuk.

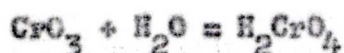
Ismeretes, hogy az alkoholok a különböző karbonsavhidridek hatására észterképződés közben acetileződnek. A gyakorlatban legáltalánosabban használt acetilező szer az ecetsavanhidrid. Az ecetsavanhidriddel végzett acetilezési reakciók során célszerű katalizátorként piridint használni. A reakció menete:



A zsiralkoholokból nyert acetátok kromatográfiás sajátosságai számunkra kedvezőbbek voltak, mint a szabad alkoholoké. Ezenkívül az acetilezés az alkoholok kimutatásának egyik lehetősége.

Az alkoholok CrO₃-os oxidációját úgy végeztük, hogy az előzőleg kloroformban felvett mintát szárazra pároltuk, és 2-3 ml acetonban felvettük. A kémcsöveget ezután +5°C-os vízbe tettük, a mintához 3 csepp oxidálószerrel cseppentettünk. Az oxidálószerrel úgy készítettük, hogy 1 gr CrO₃-ot 3 ml vízben feloldottunk, majd hűtés és rázogatós közben 0,87 ml cc. H₂SO₄-at adtunk hozzá. Fél óra elteltével a vízzel leállított reakcióelegyből a zsírsavakat petroléterrel ráztuk ki.

A króm-trioxid és a kromátok erős oxidálószerrel. A CrO₃ a vízben igen jól oldódik, miközben krómsav keletkezik:



Töményebb oldatban a di-, tri- ill. tetrakrómsav van jelen, vagyis a króm trioxid képlete valójában $[\text{CrO}_3]_x$. Savak jelenléte a kondenzációnak kedvez:



Az oxidáció során a Cr/VI/ oxid Cr/III/ vegyületté redukálódik:



A fenti reakciók egyes termékeit a reakciók után minden esetben vékonyrétegen szétválasztottuk és a tiszta komponensekkel dolgoztunk tovább.

Denzitometriás vizsgálatok

Az alkoholok kloroformos oldatából ismert térfogatokat gyárilag készített szilikagél-G lapokra cseppentettünk, majd a foltokat réz/I/ acetát foszforsavas oldatával bepermeteztük. A lapokat ezután 30 percig 140°C -on tartottuk, közben a foltok megfeketedtek.

A feketedés mértékét Video-denzitométerrel határoztuk meg. Az ismert súly és feketedés párokból kalibrációs görbét készítettünk, méréshez és számoláshoz a görbék lineáris tartományát használtuk.

A foltok feketedéséből /dimenzió nélküli szám/ levontuk a folttal azonos területű tiszta, csak előhívószerral kezelt laprészlet feketedését. Az így kapott feketedés mérőszámával osz-

tottuk el a minta /lapra nem vitt részének rádióaktivitásból számolt/ aktivitását.

Az aktivitások /cpm/ és feketedések hányadosai tehát "önkényes egységben megadott" fajlagos aktivitásoknak tekintendők.

Infravörös és NMR spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópia a szerves vegyületek kvalitatív vizsgálatának az egyik legalkalmasabb módszere. Segítségével csaknem valamennyi funkciós csoport jelenléte felderíthető. A jellemző kötési- és csoportfrekvenciák értéke a szakirodalomban megtalálható.

A mágneses rezonanciaspektroszkópia /NMR/ az egyes funkciós csoportok azonosításának az infravörös spektroszkópiánál is hatásosabb lehetősége. Elve azon a tényen alapszik, hogy bizonyos atommagok mesterségesen létrehozott mágneses térben mágneses momentumuk révén az erővonalakkal meghatározott szöget zárnak be. Ha a maggal energiát közlünk, akkor az attól függően, hogy a molekula mely részében, milyen környezetben van, határozott frekvenciájú sugárzást nyel el, miközben az új kvantumállapotnak megfelelően a részecske mágneses momentuma és a mágneses tér közötti szög is megváltozik.

A magrezonancia analitikai célokra az ún. kémiai vonaleltolódás mérése alapján használható fel. A vegyületekben lévő protonok elnyelési sávja máshol van, mint egy ideális, csak protonokból álló rendszeré.

Esetünkben pl. a CH_3 , CH_2 és OH csoportok a fentiek alapján

jól elkülöníthetők voltak egymástól.

A vizsgálatokat a JATE Szerves Kémiai Tanszékén végeztük. Az előzőleg vékonyrétegekromatográfiásan tisztított, majd éterrel leoldott ismeretlen anyag spektrumát filmfázisban UNICAM SP 200 infravörös spektrofotométer segítségével vettük fel.

Az NMR spektrumok felvétele előtt az alkoholnak vélt anyag izocianát származékát képeztük az alábbiak szerint:



Az OH proton jele így jól azonosítható volt és lehetőség nyílt a hidroxil-csoport helyének megállapítására az alkil láncban belül. A spektrumokat CDCl_3 oldatból, "JEOL" készülék segítségével vettük fel.

/Az infra spektrum felvételét Kiss János, az NMR spektrumok felvételét és elemzését Dembi György tanszéki mérnökök végezték./

Gázkromatográfiás elemzések

A szerves és biokémiai analízisben a minőségi és mennyiségi meghatározás szempontjából egyaránt a legnagyobb teljesítményt nyújtó eljárás a gázkromatográfia. A több ezer elméleti tényer számmal egyenértékű töltött oszlopok segítségével a zsírsavak és származékaik főként a könnyebben illó észterformában igen eredményesen elemezhetők.

Mi a szétválasztásokat JEOL JGC 1100 típusu, lángionizációs detektorral működő gázkromatográfion végeztük. Ismeretes, hogy a gáz-folyadék kromatográfiában az álló fázis folyadék, amelyet

töltetes kolonnák esetében megfelelő szilárd hordozóra kell felvinni. A gázfázis esetünkben mindenkor N_2 volt. A minták betáplálását a kolonnába 10 μ l-es Hamilton típusú bemérő fecskendővel végeztük.

A zsírsavak metilésztereinek elválasztására megosztó fázisként 15 %-os DEGS-t, míg az alkoholok acetátjainak elválasztására 10 % EGSS-K-et használtunk. Mindkét esetben Gas Chrom.P volt a hordozó. Szabad alkoholok elválasztására 5 % SE-30 töltetet használtunk.

Jelzett minták aktivitásának meghatározásához a kolonnát elágasztattuk. A minta 10 %-a a detektorra került, 90 %-a pedig ezzel egyidejűleg a kolonnához csatlakoztatott üvegcsőben lévő vattára kondenzálódott. A radioaktivitásokat minden esetben TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer segítségével mértük, miután a vattára és a cső falára kondenzálódott radioaktív mintát egy meghatározott összetételű szcintillációs koktéliba kvantitatívan belemostuk /a koktél összetétele: 200 mg POPOP, 4 g PPO 1 liter toluolban/.

A csúcsok beazonosítását megfelelő standardok segítségével a következőképpen végeztük:

Ha a különböző lánc hosszúságu, de azonos telítettségű zsírsavak, zsiralkoholok, stb. észterszármazékai relatív retenciós idejének logaritmusát egy szemilogaritmusos milliméterpapíron a homológok szénszáma függvényében ábrázoljuk, akkor egyenest kapunk. Ha tehát egy keverék kémiai minőségét előre eldöntöttük, akkor a komponensek C-száma azok relatív retenciója alapján meg-



adható volt.

Az azonos telítettségű homológok gázkromatográfiája előtt a keveréket AgNO_3 -al impregnált szilikagél-G lapon választottuk szét. A lapról külön oldottuk le a monóén, dién, trién stb. foltokat. A csúcsok területét "háromszög" módszerrel számoltuk. Minden esetben figyelembe vettük a jelek eltérő erősítését /érzékenység/ és az alapvonal esetleges ingadozását.

A lipidek tranzíciós hőmérsékletének meghatározása ANS^- -el

Ha a megfelelő fluoreszkáló festéket /esetünkben β -anilinaftalinszulfonát, ANS^- / egy vizes foszfolipid liposzóma disperzióba tesszük és a rendszert meghatározott hullámhosszú fényel besugározzuk / λ_{exc} / a gerjesztett rendszer energiájának egy részét egy nagyobb hullámhosszon / λ_{em} / emittálja. A kapott fluoreszcens fény intenzitása / I_{tot} / két komponensből tevődik össze.

$$I_{\text{tot}} / \lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}} = Q^x c_D^x + Q c_D \quad /1/$$

a lipidekhez kötött / $Q^x c_D^x$ / és a vízben oldott szabad / $Q c_D$ / festéktől származó fluoreszcens fény intenzitásából / Q a festék "kvantumhasznosítási tényezője", c_D a festék koncentrációja/.

A lipidekhez nem kötött festéktől eredő intenzitás azonban elhanyagolható:

$$I_{\text{tot}} \approx I = Q^x c_D^x \quad /2/$$

A festékmolekulák /D/ és a jelenlévő lipidek által biztosított festék kötőhelyek /B/ kapcsolata igen egyszerű:



vagyis a komplex disszociációs konstansa, K_D -re írható:

$$K_D = \frac{k_d}{k_b} \quad /4/$$

mivel:

$$c_{Dtot} = c_D^x + c_D \quad /5/$$

$$c_{Btot} = c_B^x + c_B$$

A tömeghatás törvényét alkalmazva írhatjuk, hogy:

$$\frac{1}{c_D^x} = \frac{1}{c_{Btot}} + \frac{K_D}{c_{Btot} / c_{Dtot} - c_D} \quad /6/$$

Mivel c_{Btot} helyére írható, hogy $c_{Btot} = n c_L$, ahol n az egy lipidmolekula kötőhelyeinek a száma:

$$\frac{1}{c_D^x} = \frac{1}{n c_L} + \frac{K_D}{n c_L c_{Dtot}} \quad /7/$$

c_D -ot /7/-ből /2/-be behelyettesítve azt kapjuk, hogy

$$I = \frac{Q n c_L}{1 + \frac{K_D}{c_{Dtot}}} \quad /8/$$

A lipidekhez tapadó festék fluoreszcens intenzitásának I_2 és I_1 különbsége a lipidek fázisváltási hőmérséklete alatt és felett egy adott festék és lipidszámú koncentrációnál Q és n megváltozásából származik. K_D hőmérsékletfüggése elhanyagolhatóan kicsi. /Egyébként az általunk használt PC esetében valószínűleg Q értéke is igen csekély mértékben változik a hőmérséklettel /37/.

Tehát $I_2 - I_1 = \Delta I$ -re /8/ alapján írható, hogy :

$$\Delta I = \frac{\rho_2 n_2 - \rho_1 n_1 / c_L}{1 + \frac{k_D}{c_{Dtot}}} \quad /9/$$

A /9/ egyenlet alapján levezethető intenzitásváltozás tehát lehetővé teszi, hogy a lipidek szilárd-gél állapotból folyékony-kristályos állapotba történő fázisátmenetét /tranzíciós hőmérséklet, vagy T_c / a festék segítségével meghatározzuk.

A tranzíciós hőmérséklet leolvasásához a kapott intenzitás-hőmérséklet görbe alapján az intenzitások logaritmusát a hőmérséklet reciprok értéke függvényében ábrázoljuk. T_c megadását egy konkrét esetben a "Kísérleti eredmények" fejezetben tárgyaljuk./

Az ANS⁻-el történő mérést a következőképpen végeztük: Az előzőleg átkristályosított ANS⁻-ből 6×10^{-4} M vizes törzsoldatot készítettünk. A vezikulákat úgy állítottuk elő, hogy a szintetikus PC kivárat mennyiségét kloroformban feloldottuk, majd N₂ atmoszféra alatt egy vastag falú üveg centrifuga-cső falára pároltuk. Más esetekben a búzákból izolált zsiralkoholokat ismert súlyarányban hozzámértük a PC-hoz és együtt pároltuk a keveréket. Ezután a csőbe $4,2 \times 10^{-2}$ M vizes NaCl oldatot tettünk, majd 50-60°C-on 15 percig ultrahanggal kezeltük a lipideket. A kapott liposzóma szuszpenzióhoz ezután annyi ml ANS⁻ törzsoldatot adtunk, hogy a végső lipidkoncentráció $2,5 \times 10^{-4}$ M, az ANS⁻ koncentráció pedig $5,3 \times 10^{-5}$ M lett. A liposzómákat 40

percig állni hagyjuk 60°C-on, majd 3 ml-t a mérőküvetébe öntöttünk. A küvetébe egyidejűleg egy kicsi hőérzékelő fejet is elhelyeztünk, amely az intézet elektrotechnikai műhelyében készült. A lipidekhez kötött ANS⁻ fluoreszcens intenzitását különböző hőmérsékleteken termosztálható küvettaházzal ellátott Perkin-Elmer Spektrofotofluoriméterrel, az SZBK Biofizikai Intézetében mértük / $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$ volt/. X-Y típusú rekorder segítségével egyidőben regisztráltuk a minta hőmérsékletét és fluoreszcens intenzitását. A küvettaház hőmérsékletének folyamatos változtatását a küvettaházhoz csatlakoztatott ultratermosztáttal biztosítottuk.

Liposzómák vízáteresztőképességének vizsgálata

Ha a különböző foszfolipidek vizes diszperzióit ultrahanggal kezeljük, a foszfolipidek ún. liposzómákat képeznek. A kezelés időtartamától és a lipidek minőségétől függően kapott "gömböcskék" egy vagy több lipidrétégből állhatnak. E lipidrétégek, vagy ideális esetben réteg, igen alkalmas különböző modelkisérletek elvégzésére. Ha pl. a vezikulák képzése előtt triciált vizet teszünk a rendszerbe, akkor a vezikulák belsejébe szonikálással zárható víz kiáramlása, azaz a mesterséges "lipid membrán" permeabilitása /vizre/ aktivitásméréssel megállapítható. Egyébként a legkülönbözőbb anyagok, pl. drogok, koleszterol, észterezett telítetlen zsírsavak, stb. hatása a membránok permeabilitására és egyéb tulajdonságaira is eredmé-

nyesen tanulmányozhatók voltak foszfolipid vezikulák segítségével /38, 39/.

A liposzómák készítéséhez 4 mólszázalék foszfatidsavat tartalmazó szintetikus foszfatidilkolint /lásd felhasznált vegyszerek/ használtunk. Az előzőleg kloroformban felvett lipidkeveréket nitrogénnel egy vastagfalú centrifugacső falára pároltuk, majd hozzáadtunk 1 ml desztillált vizet, amely 1 μCi $^3\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott. Máskor az 50 μmol foszfatidilkolin-foszfatidsav keverékhez annyi 18:3 /linolén/ alkoholt adtunk, hogy mólarányuk 2:1 volt. Az ultrahangos kezelést pontosan 20 percig végeztük, majd a liposzóma szuszpenziót egy dializáló hüvelybe töltöttük. A hüvely egyik végét elzárítottuk, másik végébe egy olivás üvegcsövet dugtunk. A dializáló hüvelyt ezután 800 ml desztillált vízzel vettük körül, amelyet mágneses keverővel kevertettünk.

A dializáló hüvelyből az üvegcsövön át megfelelő időközönként 50 μl mintát vettünk ki és mértük az aktivitását. Kontroll kísérletként a már kész vezikulák vizes oldatához adtuk a triciált vizet és így mértük a triciált víz eltűnését a dializáló hüvelyből.

V.

K I S É R L E T I E R E D M É N Y E K

1. A különböző buzafélék zsírsavösszetételének vizsgálata

Intézetünkben a téli és tavaszi buzafélékkel végzett kísérletek egyik fő célja az volt, hogy kapcsolatot keressünk a buzafélék zsírsav anyagcseréje és télállósága között.

Ezekben a kísérletekben a buzák lipidjeit kizextraháltuk, a bennük lévő zsírsavakat megmetileztük és vékonyrétegekromatográfiás tisztítás után gázkromatografáltuk. A beazonosított csucsek területarányából kiszámítottuk a savkeverék %-os összetételét /1. táblázat/

1. TÁBLÁZAT

Zsírsavak %-os összetétele 25°C-on termesztett buzák leveleinek összlipidjeiben

Növény	Zsírsav /%/				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Penjamo	19,3	0,7	2,5	16,7	60,8
Miranovskaja	18,3	0,8	2,9	19,5	58,5
Spelta	20,8	0,8	2,6	23,6	52,1
Short Mexican	19,6	0,6	2,6	23,0	54,2
Kavkaz	12,6	0,5	3,3	19,0	64,5
T. Charticum	15,1	0,3	4,0	19,3	60,2

Amint az a táblázatból látható, a megvizsgált búzák zsírsavkészletének 50-60 %-a linolénsav, 18-20 %-a palmitin- és linolsav, 2-3 %-a olajsav, míg a sztearinsav mennyisége az 1 %-ot sem éri el.

Abban az esetben, ha a búzákat szántóföldön termesztették és így azok tartós hidegnek ill. fagynak voltak kitéve, akkor korábbi adataink szerint /40/ a linolénsavszint a télállóságnak megfelelően magasabb volt a téli búzában, mint a tavasziakban.

2. $1-^{14}\text{C}$ jelzett ecetsav és zsírsavok felvétele és beépülése búzafélék zsírsavjaiba

Felmerült a lehetősége, hogy jelzett ecetsav és különböző jelzett zsírsavak inkorporálódásának mérésével, eltérő hőmérsékleteken és különböző búzafélékkel végzett néhány órás kísérletek alapján következtessünk a búzák télállóságára.

Ha azonban a radioaktivitás zsírsavak közötti megoszlását összevetettük a tényleges zsírsavösszetétellel, kiderült, hogy a búzában legnagyobb mennyiségben jelenlévő linolénsav igen kis mértékben jelölődött. /2. táblázat/

A 2. táblázatban egy téli buza, a Kavkaz $1-^{14}\text{C}$ acetát, laurát, palmitát, sztearát, oleát és linoleátból jelölődő / 25°C , 4 óra/ zsírsavkészletének radiogaskromatográfiás elemzését foglaltuk össze. A 25°C -on végzett kísérletekhez hasonlóan, a $+5$ és -10°C -es inkubálások során sem jelölődött a linolénsav

a tényleges mennyiségével arányosan.

2. TÁBLÁZAT

Zsirsavak radioaktivitásának megoszlása Kavkázban,
1-¹⁴C jelzett prekursorokkal 25°C-on történő 4 órás inkubálás
után

Növény	Prekursor	Zsirsav %					
		16:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Kav- káz	acetát	18,9	19,9	3,2	17,2	37,2	3,6
	laurát	61,8	13,2	1,4	9,3	11,3	3,0
	palmitát	26,9	34,8	9,7	6,5	11,3	10,8
	sztearát	33,7	4,8	47,9	8,0	12,0	13,6
	oleát	21,3	5,6	2,6	24,1	22,7	23,7
	linolát	34,8	3,1	4,3	11,9	29,5	16,4

A különböző prekursorokból jelölődő olaj- és linolsav százalékok arányában következetesen ugyanazt a változást figyelhetjük meg, ha az inkubálási hőmérsékletet csökkentettük. Míg 25°C-on a linolsav, addig alacsony hőmérsékleteken az olajsav vett fel több aktivitást az egyes prekursorokból.

Az injektálásán kívül más módszereket is megpróbáltunk a jelzett prekursorok bevitelére. Így pl. inkubáltunk levélszeleteket foszfát pufferban /amelybe előzőleg belemértük a kívánt mennyiségű jelzőanyagot/, próbálkoztunk zárt térben jelzett CO₂ beépítésével is, amelyet különböző hig savakkal szabadítottunk

fel BaCO_3 -ból.

A kapott eredmények minden esetben a fentiekben ismertetett módon alakultak.

Mivel a téliállóság fokozása szempontjából a leghatásosabb zsírsav, a linolénsav aktivitásának százaléka olajsavas inkubálás után volt a legmagasabb, ezért több kísérletet végeztünk jelzett E-oleáttal. Meglepő módon az oleát aktivitásának 80-90 %-a már néhány percen belül felszívódott, sőt éppen a 0°C alatti hőmérsékleteken tudtuk az inkubálás befejezése után a legkevesebb olaj nem reagált olajsavat visszamérni.

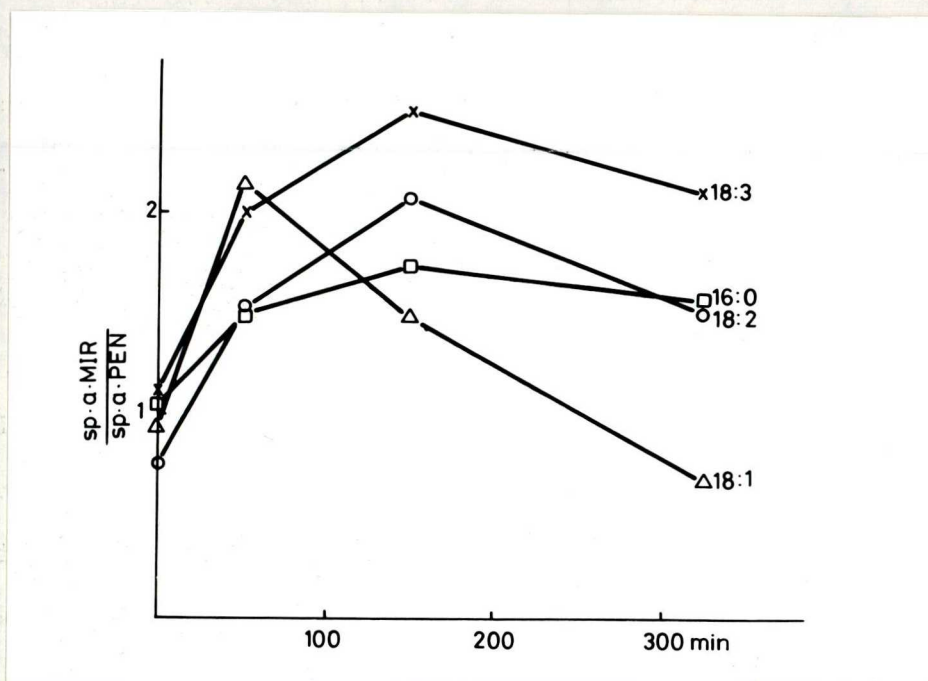
Amint az az előző fejezetből kitűnt, a gákkromatográfiás elemzések során a kolonnára töltött minták egy részét detektáltuk, másik részének pedig mértük a radioaktivitását. A radioaktivitások és csúcsterületek ismeretében mód nyílt a jelölődő zsírsavak fajlagos aktivitásának kiszámolására is.

6 óráig 25°C -on Miranovskaja /őszli buza/ és Penjamo /tavaszi buza/ levélszeleteket előinkubáltunk $1\text{-}^{14}\text{C}$ acetátos foszfátpufferben, majd az acetátos puffert eltávolítottuk, és a mintákat inaktív acetátos vízzel többször átmostuk. A minták egy részéből azonnal kiteraháltuk a zsírsavakat, másik részét pedig különböző ideig -10°C -on tartottuk.

A kísérlet során a Miranovskajában és a Penjamóban az acetátból jelölődő 18:3, 18:2, 16:0 és 18:1 fajlagos aktivitásainak hányadosa a különböző időknél az 1. ábrán látható.

A 25°C -os inkubálás végén a fajlagos aktivitások hányadosa 1 körüli érték, ami az inkorporáció azonos mértékét mutatja mind-

két növényben. A -10°C -os kezelés hatására /1. ábra/ a legnagyobb különbség a 18:3 arányban /majdnem háromszoros/, aztán a 18:2 arányban /közel kétszeres/, míg a 16:0 arányban másfélszeres volt az előinkubálást követő 3. órában.



1. ÁBRA

$1-^{14}\text{C}$ acetáttól Miranovskaja /MIR/ és Penjamo /PEN/ levél-szeletekben jelölték 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 fajlagos aktivitásainak /sp.a./ aránya 6 órás 25°C -on történő előinkubálás után, különböző időknél -10°C -on.

Az olajsav fajlagos aktivitása az első órában még a lino-lénsavnál is gyorsabban növekszik a Miranovskájában a Penjamóhoz képest, ezután azonban gyors csökkenés látható. Egyébként

ha az első ábrán feltüntetett zsírsavak fajlagos aktivitásainak abszolút értékét tekintjük /ami az ábrából nem látható/, a 25°C-os előinkubálást -10°C-on folytatva csak a 18:3 fajlagos aktivitása növekszik tovább alacsony hőmérsékleten. A többi sav esetében viszont ez az érték csökken.

A linolénsav fajlagos aktivitásának a különböző téliállású búzában eltérő mértékű, de lassu növekedése hideg hatására azt igazolja, hogy a növények már meglévő zsírsavkészlete még ilyen extra alacsony hőmérsékleten /-10°C/ is képes linolénsavvá átalakulni. Ugyanakkor - a linolénsav keletkezésének rátáját időben állandónak tekintve - számításaink szerint alacsony hőmérsékleteken a búzában a lipidek fázistranziációs hőmérsékletét számottevően lecsökkenteni képes mennyiségű linolénsavszint több napon keresztül sem áll be /40/.

A 16:0 és a 18:2 esetében az aktivitások abszolút csökkenésének a más savakká történő átalakulás, ill. a különböző sebességű ω -oxidáció lehet a magyarázata.

Az olajsavnak a többi zsírsavétől eltérő viselkedése a kísérlet egyik legfeltűnőbb részlete. Hogy az olajsav nem valamilyen, az ábrán fel nem tüntetett zsírsavvá alakul tovább, arról gázkromatográfiás szétválasztással többször meggyőződünk. A lánchosszabbítás révén keletkező 20:1, 22:1 stb. homológok kis mértékben ugyan jelölődtek exogén olajsavból, de nem az olajsav eltűnésének arányában.

Egyértelműen megállapíthattuk tehát, hogy az olajsav /akár

exogén, akár a növényben acetátból szintetizálódó/ valamilyen más anyaggá, de nem zsírsavvá alakult tovább és hogy e reakcióknak az alacsony hőmérséklet kedvezett.

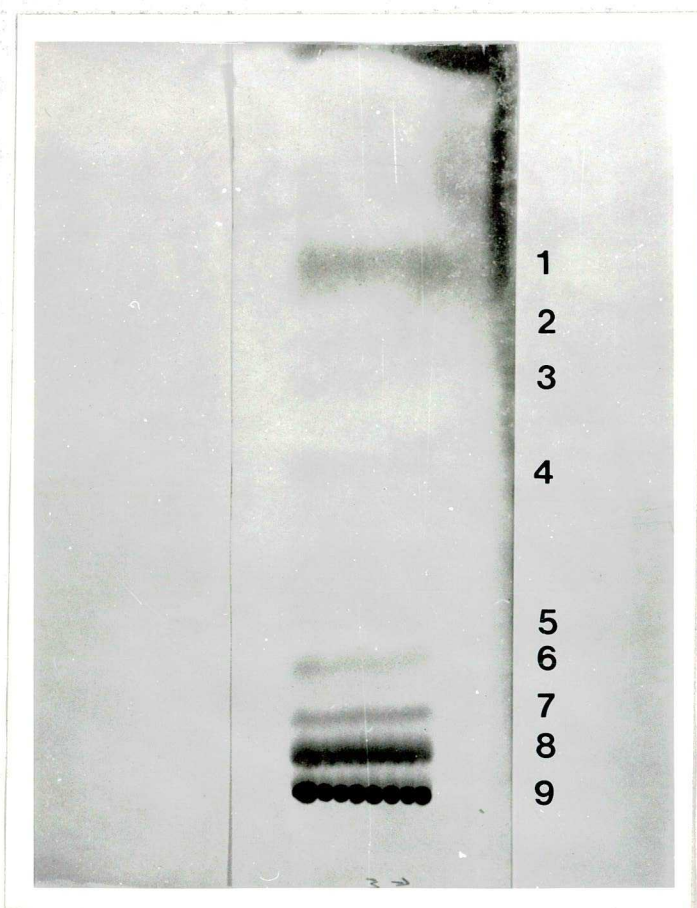
3. $1-^{14}\text{C}$ oleát felvétele és beépülése egy ismeretlen neutrális lipidbe

Az a tény, hogy az olajsav hideg hatására nagy mértékben jelölődött jelzett acetátból, továbbá, hogy az exogén olajsav a 0°C alatti hőmérsékleteken igen gyorsan felszívódott a búzák összlipidjébe, arra ösztönzött bennünket, hogy megvizsgáljuk, a zsírsavakon kívül milyen egyéb lipidszerű anyagokkal áll kapcsolatban az olajsav, amelyekről ha tudomást szerzünk, akkor képesek leszünk elszámolni a bevitt aktivitásokkal.

A búzák összlipidjeinek vékonyrétegkromatográfiás szétválasztására több lehetőség is kínálkozott. Mi olyan rendszert találtunk a legalkalmasabbnak, amelyben a foszfolipidek, galaktolipidek, szteroidok, szabad savak, trigliceridek és egyéb neutrális lipidek egy lépésben jól elkülöníthetők egymástól /2. ábra/.

A szétválasztásra elsősorban azért volt szükség, hogy az el nem reagált szabad zsírsavakat az inkubálások végétével eltávolítsuk a lipidextraktból. A jelzett ecetsavval vagy zsírsavakkal inkubált búzák lipidextraktját a 2. ábra szerint szétválasztottuk és az egyes foltok aktivitását megmértük. Meglepő módon a néhány százalékban jelölődő triglicerideken, viaszész-

tereken és szénhidrogének kivül bizonyos mintákban jelentékeny mennyiségű aktivitást találtunk a foszfolipidek és galaktolipidek foltja felett található - a kísérleteink kezdetén még ismeretlen - foltban /2. ábra 6. folt/. E foltok levélsúlyra vonatkoztatott fajlagos aktivitásai a különböző jelzett prekursorokkal -8°C -on történő inkubálások után az olajsav esetében a legmagasabbak /3. táblázat/.



Az egyes foltok:

1. szénhidrogének stb.
2. ismeretlen
3. viaszészter
4. trigliceridek
5. szabad sav
6. ismeretlen
7. koleszterol
8. galaktolipidek
9. foszfolipidek

2. ÁBRA

Buzalipidek szétválasztása szilikagél-G lapon

/petroléter:éter:ecetsav = 80:20:1/

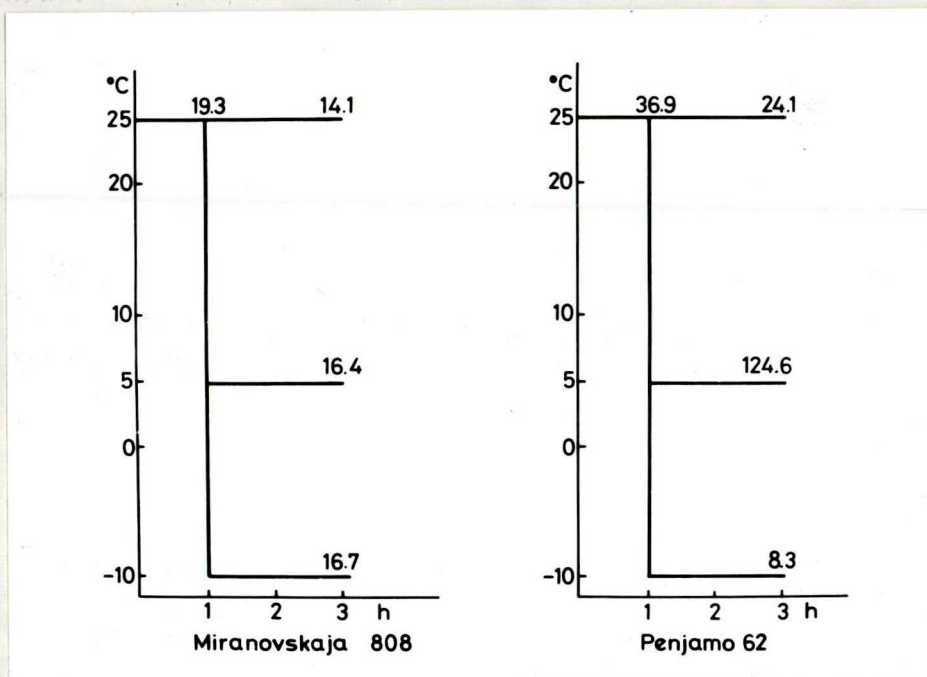
3. TÁBLÁZAT

Miranovskaja és Penjamo -8°C -on 14 óráig különböző $1-^{14}\text{C}$ jelzett prekursorokkal voltak inkubálva. /A prekursorok fajlagos aktivitása és levelenként bevitt mennyisége megközelítően azonos volt/. A táblázatban a szabad sav és az ismeretlen folt levélsúlyra számított fajlagos aktivitásait adjuk meg /cpm/g levél/

Prekursor / $1-^{14}\text{C}$ /	Miranovskaja ismeretlen folt levélsúlyra számított aktivitása /cpm/g $\times 10^3$ /	Penjamo
acetát	0,32	2,08
laurát	0,71	0,98
palmitát	1,10	1,34
sztearát	1,42	2,59
oleát	24,40	20,08
linolát	1,38	1,91

Az olajsavból jelölődő folt fajlagos aktivitásának pontosabb meghatározására az előző fejezetben részletesen leírt denzitometriás módszert alkalmaztuk. Az egy óráig 25°C -on jelzett olajsavval előinkubált Miranovskaja és Penjamo levelek egy részét továbbra is 25°C -on, más részét $+5^{\circ}\text{C}$ -on, ill. -10°C -on tartottuk. A minták összlipidjeiből a már ismertetett módon

elválasztott vizsgálni kívánt anyagot kloroformban felvettük és meghatározott térfogatarányban mértük az oldott anyag feketedését és aktivitását.



3. ÁBRA

25°C-on 1 óráig előinkubált Miranovskaja és Penjamo /prekurzor 1-¹⁴C olajsav/ további két óráig volt inkubálva +25, +5 és -10°C-on. Az ábrán a lipid-extraktból vékonyrétegen elválasztott ismeretlen folt radioaktivitásának /cpm/ és feketedésének /önkényes egység/ hányadosait tüntettük fel.

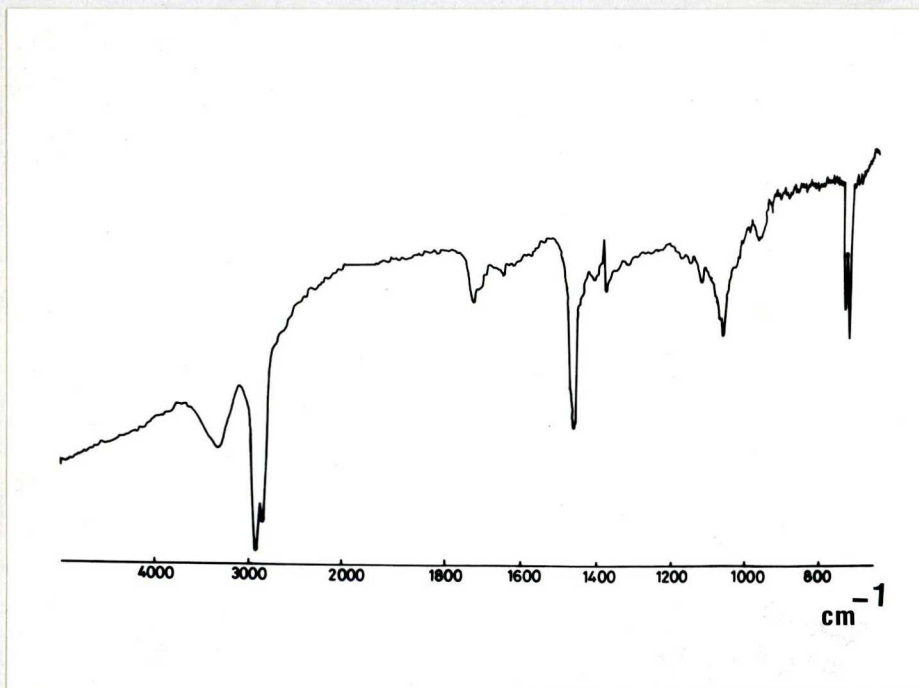
Az így nyert viszonyszámokat, amelyek az aktivitás-feketedés értékek hányadosai, a 3. ábrán foglaltuk össze.

A 3. ábrából kitűnik, hogy az olajsavból származó, és a

felt egységnyi mennyiségére vonatkoztatott aktivitás -10°C -on kétszer akkora a Miranovszkájában, mint a Penjamóban.

4. Az ismeretlen anyag beazonosítása

Az általunk vizsgált ismeretlen anyag beazonosítását az infravörös spektrumának felvételével kezdtük /4. ábra/.



4. ÁBRA

Miranovskaja lipidextraktból vékonyrétegekromatográfiásan olvászott ismeretlen anyag infravörös spektruma

A minta spektrumának elemzése során megállapítottuk, hogy az ismeretlen anyag jellemző kötési- és csoport frekvenciái

olyan asszociált alkoholek jelenlétére utalnak $/3350\text{ cm}^{-1}/$, melyeknek hosszú, valószínűleg telítetlen kötést is tartalmazó alifás alkil láncra van $/1460\text{ cm}^{-1}/$. Az 1700 cm^{-1} körül látható csúcs valószínű, hogy a lapon jól szét nem váló szabad savaktól származik. Természetesen a szinkép elemzése nem egyértelmű, főleg az OH vegyértékrezgést tekintve. A hidroxilcsoport molekuláris állapotától függően a rezgési sáv helye eltolódhat. De különböző okok miatt eltolódások léphetnek fel az OH csoport síkban és síkra merőlegesen történő deformációs rezgéseiben is.

Különösen zavaró lehet a minta esetleges nedvességtartalma. A víz OH vegyértékrezgési sávja átlapol a $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ között található szerkezeti OH csoportok sávjaival.

Mivel szárításkor $/P_2O_5$ felett, exikatorban/ sem változott a spektrum képe, valószínűnek tartottuk, hogy a megfelelő csúcsok nem a víztől származnak.

Az alkoholek OH csoportja helyének megállapítására és értékségének eldöntésére a minta NMR spektrumát is felvettük. A már ismerttetett módon előállított komplex vizsgálata megerősítette, hogy a minta többsége elsőrendű, egyértékű alifás alkohol, amelyben valószínű kis mennyiségű szabad sav és másodrendű alkohol is jelen van. A vizsgált anyag minőségére vonatkozó feltevéseinket kémiai reakciókkal is megerősítettük.

Az alkoholek acetilezésével nyert alkohol-acetátok hasonló módon viselkedtek a vékonyrétegen való szétválasztás során, mint a standard alkoholacetát.

Elvégeztük az alkoholok CrO_3 -os oxidációját és az oxidációs termékek fő tömege zsírsav volt. A kapott zsírsavakat megmetileztük, meggázkratografáltuk. /Erről a későbbiekben szó lesz./

Ha az ismeretlen anyagot szilikagél-G lapon benzolban futtattuk, az anyag két foltra vált szét. Az előzőleg jelzett ecetsavval jelölt mintákból nyerve a vizsgált anyagot, az aktivitásnak 90 %-a került a primer alkoholok feltjába, a maradék szekunder alkohol és zsírsav volt.

Ha a hiroxisavak, alkoholok, szabad zsírsavak és aldehidok elválasztására ajánlott vékonyrétegekromatográfiás rendszert használtuk /41/, a vizsgált anyag R_f értéke az alkoholokéval azonos volt.

Az ismertetett spektroszkópai és kémiai vizsgálatok alapján egyértelműen állítható, hogy az eddig ismeretlen anyag alifás egyértékű zsiralkohol keverék.

5. A búzában található szabad zsiralkoholok szétválasztása levélfelszíni /viasz/ és ún. "belső" alkoholokra

Abban az esetben, ha az 5-6 napos búzáék leveleiből homogenizátumot készítettünk és azt 700, 2000, 7000, 103000 g értékeken centrifugáltuk, azt tapasztaltuk, hogy az alkoholok minden frakcióban jelen voltak. A kísérletet jelzett ecetsavas előinkubálás után is megismételtük, a kiztrahált lipidek

15-30 %-a alkohol volt, igazolva az előző megfigyelést.

Mivel a zsíralkoholok /szabad és észterezett formában egyaránt/ a levélfelszíni viaszok komponensei, a levelek felszínéről /megfelelő "viaszoldószerrel", pl. petroléterrel/ leoldva a viaszokat, azt várhatnánk, hogy a levelek belsejében nem marad alkohol.

Jelzett acetáttal inkubálva Miranovskaja és Fenjamo leveleket, az előző fejezetben leírtak szerint szétválasztva a viaszok és viasztalanított levelek lipidjeit, más eredményre jutottunk.

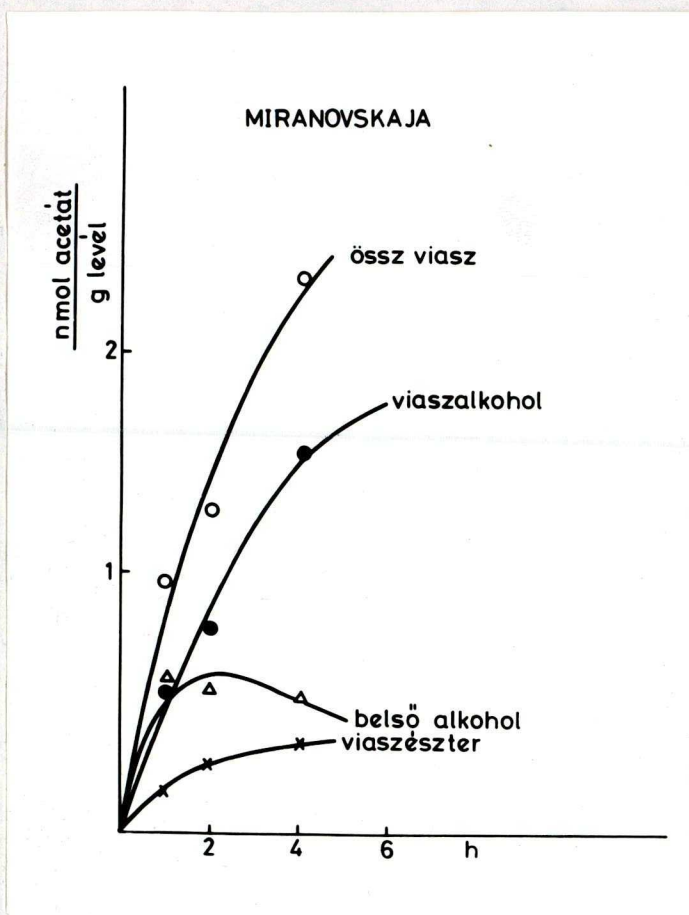
Amint az az 5. ábrából látható, a 25°C -on $1\text{-}^{14}\text{C}$ acetáttal inkubált Miranovskaja levelek levélfelszíni viaszaiban található aktivitás nagyobb része a viaszok alkoholjaiból származik, de a viaszalkoholokon kívül jelentős mennyiségű alkohol jelölődött a levelek belsejében is. /Ez utóbbiakat a továbbiakban "belső" alkoholoknak nevezzük./

A levelek felszínén található alkoholok egy része nem szabad, hanem zsírsavakkal észterezett viaszészter.

Több búzával /Bezosztaja, Short Mexican, Fenjamo/ is elvégeztük az előzőekben ismertetett kísérletet, és azt találtuk, hogy 25°C -on az 5. ábrán feltüntetett komponensek között a Miranovskájához hasonló kapcsolat van.

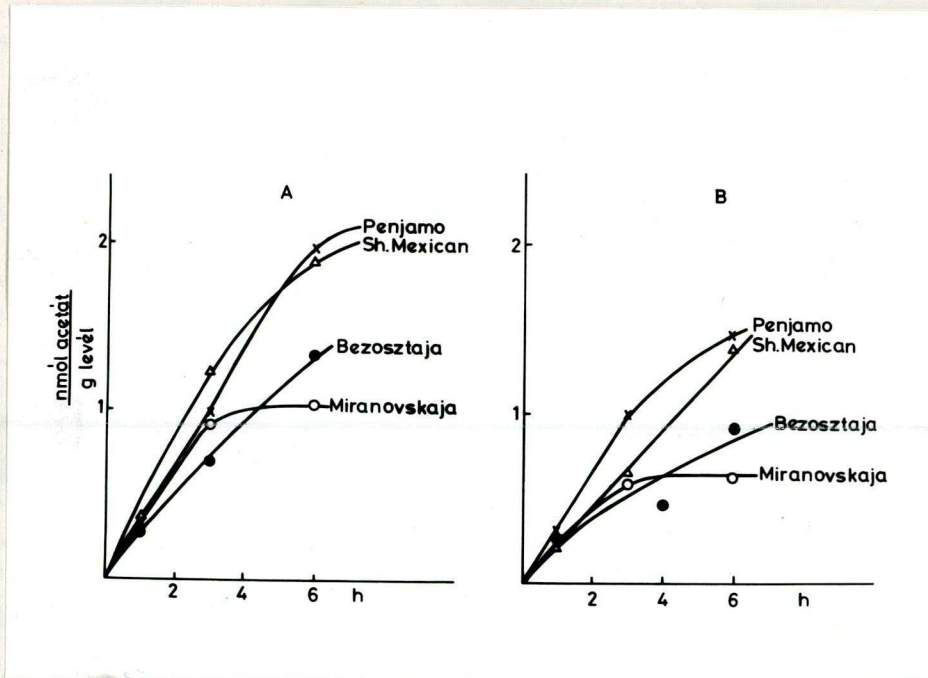
Az inkubálást $+5^{\circ}\text{C}$ -on végezve, igen lényeges különbséget fedeztünk fel a négy buza levélfelszíni viaszaiban és természetesen viaszalkoholjaiba inkorporálódó acetát mennyiségében /6. ábra/.





5. ÁBRA

$1-^{14}\text{C}$ acetáttal 25°C -on inkubált Miranovskaja levél-felszíni viaszaiba, ill. az azokból elválasztott levélfelszíni szabad és észterezett alkoholokba beépült acetát /nmol acetát/g levél egys./. Az ábrán a viasztalanított levelek "belső" alkoholjaiban inkorporálódott acetát mennyiségét is megadtuk.

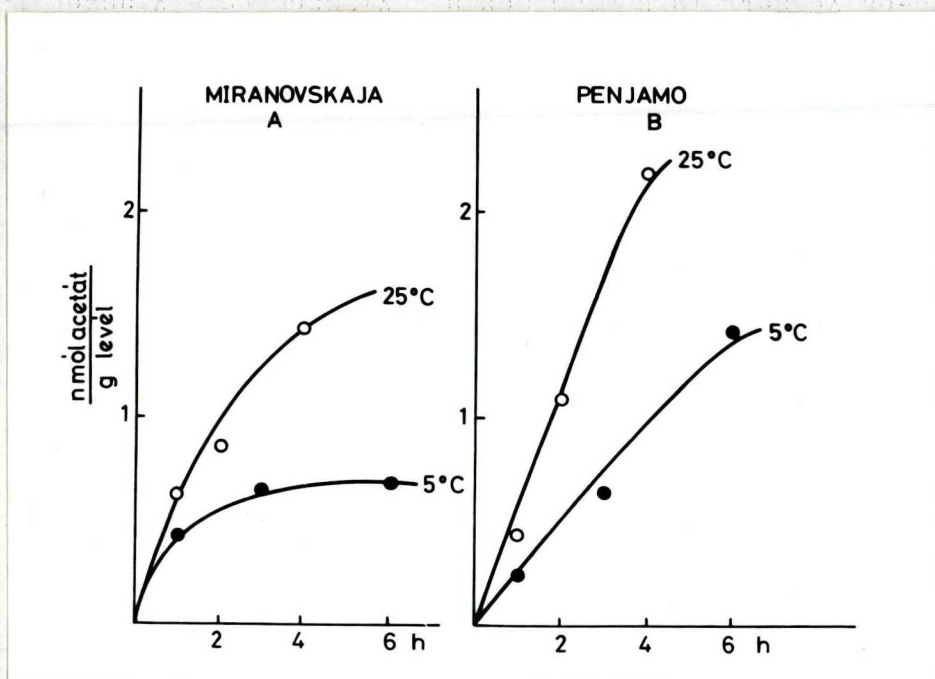


6. ÁBRA

Miranovskaja, Bezosztaja, Short Mexican és Penjamo levélfelszíni viaszaiban /A/ és a viaszokból kizextrahált alkoholokba /B/ beépült acetát nmol acetát/g levél egységben. Az inkubálást $+5^{\circ}\text{C}$ -on hajtottuk végre.

E különbségeket az alábbiakban foglalhatjuk össze:
A $+5^{\circ}\text{C}$ -on végzett inkubálás során a viaszok és a viaszok fő többségét kitevő szabad alkoholok acetátból történő szintézisének mértéke az inkubáció 5-6 óráját tekintve fordítottan arányos a buzafélék fagyállóságával. A Miranovskaja kb. fele annyi viaszalkoholt szintetizált $+5^{\circ}\text{C}$ -on, mint a Penjamo vagy a Short Mexican hasonló körülmények között.

Mind a viaszképzésben, mind a viaszalkoholok szintézisében egymástól legjobban eltérő őszi buza a Miranovskaja és tavaszi buza a Penjamo viaszalkoholjai acetát felvételét hasonlítottuk össze 25°C-on és +5°C-on, amint az a 7. ábrán látható.



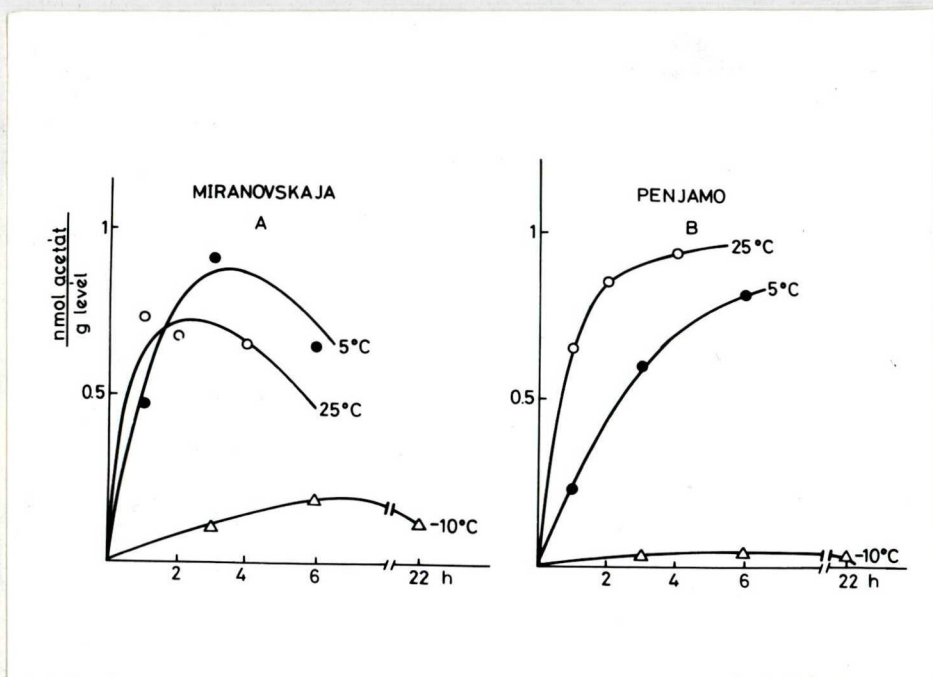
7. ÁBRA

Miranovskaja és Penjamo viaszalkoholjaiba beépült acetát /nmól/ acetát/g levél/ 25°C-on és +5°C-on.

Amint az az ábrából kitűnik, néhány óra alatt a Penjamo kb. kétszer annyi acetátot épít be viaszalkoholjaiba, mint a Miranovskaja a hőmérséklettől függetlenül.

Más a helyzet a viasztalanított levelek belső alkoholjaival. Meglepő módon a Miranovskajában $+5^{\circ}\text{C}$ -on több belső alkohol szintetizálódik /vagy lassabb a felszínre történő kiválasztódása/, mint 25°C -on. Bár $+5^{\circ}\text{C}$ -on a két növény belső alkoholjaiba felvett acetát mennyiségében alig van különbség, lényeges eltérést találtunk a -10°C -os inkubálások során.

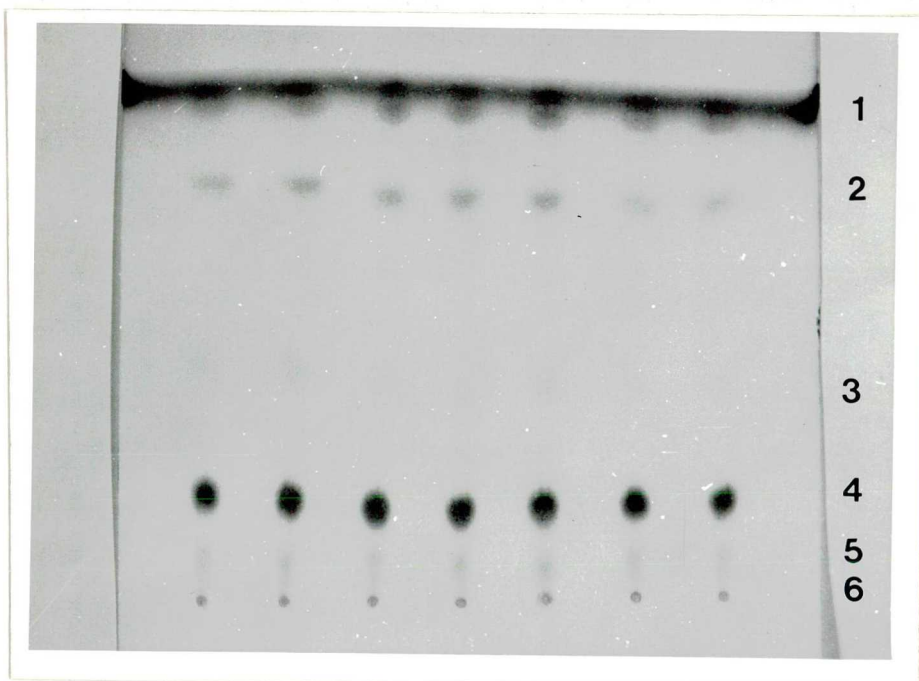
A fenti összefüggéseket foglalja össze a 8. ábra:



8. ÁBRA

Miranovskaja és Penjamo viasztalanított leveleinek alkoholjai. Az inkubálásokat $1\text{-}^{14}\text{C}$ acetáttal $25, 5, -10^{\circ}\text{C}$ -on végeztük, az alkoholokba beépült acetátot nmól acetát/g levél egységben adtuk meg.

Egyébként az általunk eddig vizsgált összes búzaféle levélfelszíni viaszainak vékonyrétegekromatográfiás analizisét elvégeztük. A vizsgálatok /a szétválasztás módját az anyagok és módszerek fejezetében ismertettük/ a jelzett mintákkal kapott eredményeket teljes mértékben alátámasztották: a búzák levélfelszíni viaszainak fő többsége elsőrendű alkohol. Ezenkívül megtalálhatók még a szénhidrogének, viaszészterek, másodrendű alkoholek és szintén kis mennyiségben OH- β -diketonok /9. ábra/.



9. ÁBRA

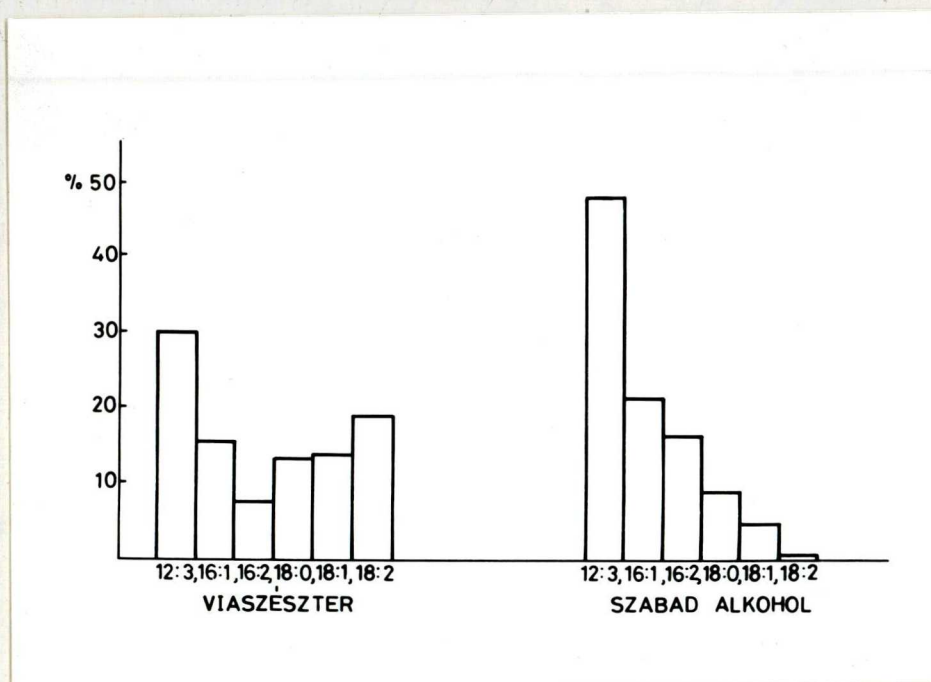
T. Chartlicum, Penjano, Miranovskaja, Kavkaz, Short Mexican, Cerros és Beosztaja búzák levélfelszíni viaszainak szétválasztása szilikagél-G lapon, benzol futtatószerrel. A foltok előhívását cc. $H_2SO_4:H_2O = 1:1$ arányu elegyével végeztük. Az egyes foltok: 1. szénhidrogének,

2. viaszészterek, 3. másodrendű alkoholo-
lok, 4. elsőrendű alkoholo-
lok, 5. OH-
- β -diketonok, 6. start.

6. Alkoholo- k gázkromatográfiás vizsgálata

Amint az előzőekben is utaltunk rá, a búzák zsiralkohol-
jainak egy kis része ún. viaszészter formában van jelen. Ha
a vékonyrétegen szétválasztott viaszok viaszészterfoltjait el-
hidrolizáltuk, és egyidejűleg metileztük, a nyert alkoholo-
kat és zsírsavmetilésztereket újabb vékonyrétegen való elválasztás-
sal külön-külön kinyerhettük. A kapott alkoholo-
kat, hasonlóan a levélfelsszini és belső szabad alkoholo-
khoz, több esetben úgy gázkromatografáltuk, hogy CrO_3 -os oxidációval az alkoholo-
kat zsírsavakká oxidáltuk /lásd előző fejezet/. A metilezett és vé-
konyrétegen tisztított zsírsavakat megfelelő standardok segít-
ségével azonosítottuk. Az azonosításnak ez a módja különösen a
telítetlen alkoholo-
k esetében volt fontos, mivel csak telített
alkohol standardjaink voltak. Az oxidációs termékek egyébként
az alkoholo-
k rendűségét is eldöntötték, hiszen a zsírsavak az
elsőrendű, a kis mennyiségben jelenlévő ketonok pedig a másod-
rendű alkoholo-
k oxidációs termékei. /Kísérleteink során a gáz-
kromatografált alkoholo-
k acetátjai ill. az azokból oxidációval
nyert zsírsavak a továbbiakban mindig az elsőrendű alkoholo-
kra vonatkoznak. A csekély mennyiségű másodrendű alkoholo-
kkal nem foglalkoztunk./

A már említett viaszészter-alkoholok és a viasztalanított levelek belső alkoholjaiból nyert zsírsavak összehasonlítását több buza esetében elvégeztük /10. ábra/. A 10. ábrán tett összehasonlításból kitűnik, hogy a belső alkoholok egy jelentős része 12:3 alkohol. /Vagyis az alkillánc 12 szénatomból áll és 3 kettős kötést tartalmaz./

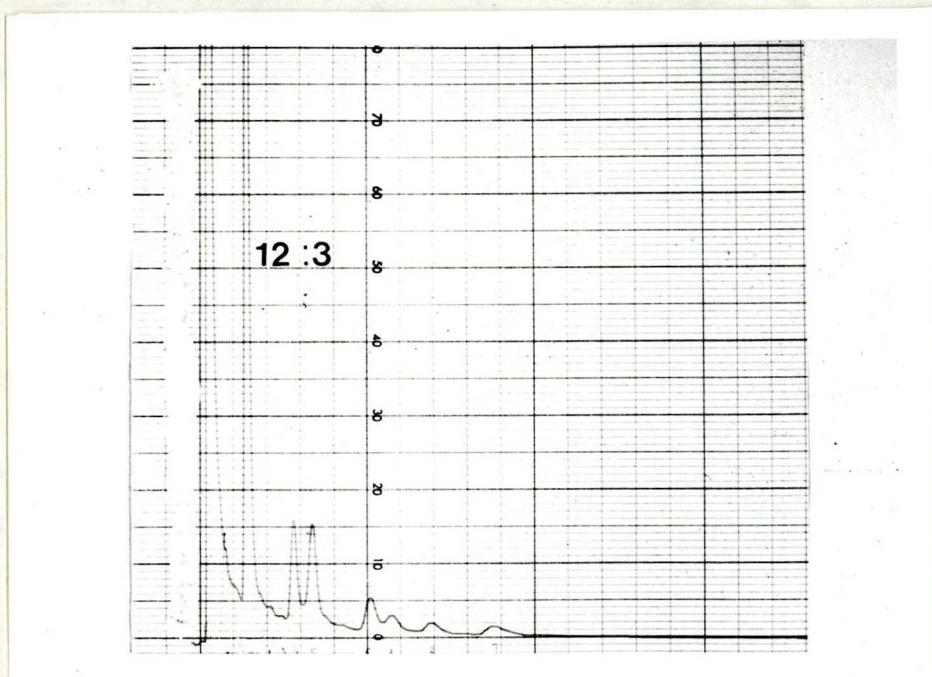


10. ÁBRA

Triticum Spelta viaszészter-alkohol és a viasztalanított levelek belső alkoholjainak CrO_3 -os oxidációjával előállított zsírsavmetilészter keverékek gázkromatográfiás analizise alapján számolt csúcsterületek. /A csúcsok területel összegének %-ában./

A viaszészterek alkoholjait főként a különböző telítetlenségű 18 szénatomszámú alkoholok és a szintén, de kisebb mennyi-

ségben jelenlévő alkohol teszi ki. A viaszok alkoholjainak zsírsavmetilészter formában történő gázkromatografálását néhány buza esetében szintén elvégeztük, az igen hosszú láncu $C_{20}-C_{36}$ alkoholek azonosítása nem volt elsődleges célunk, sőt megfelelő standardok hiánya miatt egyelőre nem is próbálkoztunk vele. Ezekből a kromatogramokból egyébként kitűnt, hogy a 10-18-as szénatomszámú alkoholek a szabad viaszalkoholek igen kis, legfeljebb a 8-10 %-át képezik. A viasztalanított Miranovskaja levelek belső alkoholjaiból oxidált zsírsavak metilésztereinek gázkromatogramja a 11. ábrán látható.



11. ÁBRA

Miranovskaja belső alkoholek CrO_3 -os oxidációjával előállított zsírsav metilészterek gázkromatográfiás szétválasztása EGSS-X megosztófázisban.

/Hordozó Cromosorb W./ A legrövidebb retenció idejű és legnagyobb csucs a 12:3 alkoholból oxidációval nyert zsírsav metilésztere. A további alkoholokból képzett zsírsavmetilészterek sorra: 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3.

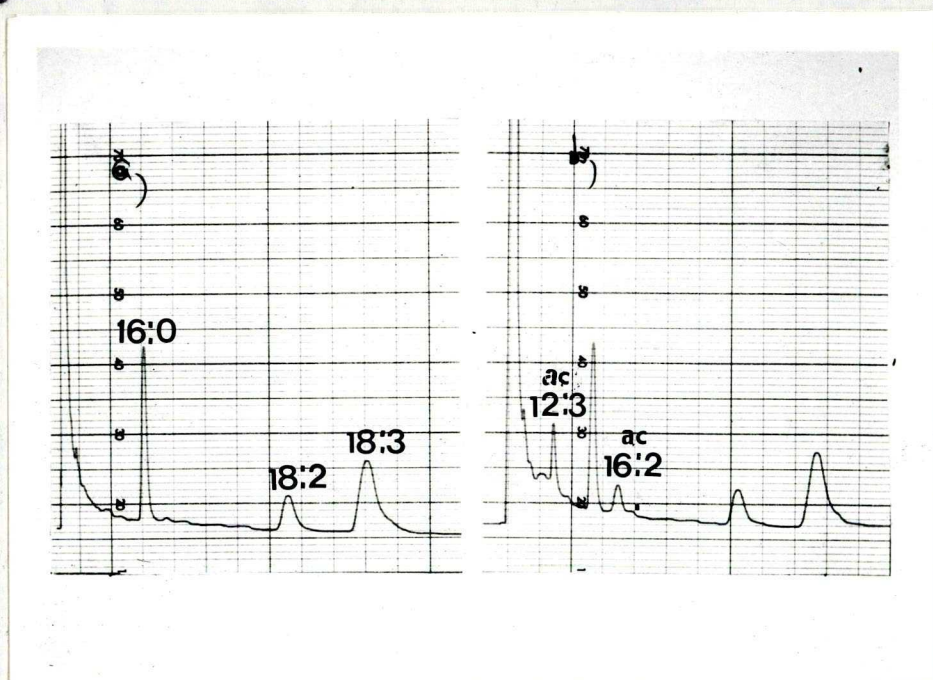
Amint azt a Spelta esetében már láttuk, a vizsgált tartományban az alkoholok /amelyek tehát legfeljebb szennyezésként tartalmazhatnak levélfelsszini viaszalkoholokat/ a Miranovskajában is legnagyobb mennyiségben 12:3 alkoholokból állnak. Ezek a "belső" alkoholok hasonló arányban voltak jelen az összes vizsgált buzafélében.

A 12:3 alkohol alifás láncában lévő kettős kötések számáról ugyanis meggyőződhetünk, hogy az alkoholokból oxidált zsírsavkeveréket 8 % AgNO_3 -al impregnált szilikagél-G lapon választottuk szét és csak a trién savak metilésztereit gázkromatografáltuk. A frakció egyetlen csucst adott, mégpedig a vár 12:3-at.

A Miranovskaja rövid szénatomszámú belső alkoholjai és a levelek össz. zsírsavkészlete arányának kvalitatív megítélésére együtt kromatografáltuk a zsírsavmetilésztereket és a belső alkoholok acetátjai /12. ábra/. Az ábrából látható, hogy a Miranovskaja zsírsavkészletének nagy részét háromféle zsírsav, a palmitin- linol- és a linolénsav alkotja. Az alkoholok acetátjai /amelyek kromatográfiás sajátosságai nyilván hasonlóak a zsírsavak metilésztereihez/ összehasonlíthatók a zsírsavakkal a megjelenő új csucsek nagyságát figyelembe véve.

A praktikusabbnak tűnő CrO_3 -os oxidációt a zsírsavak egy részének esetleges sérülése miatt nem alkalmaztuk.

Amint már említettük, különböző jelzett prekursorokkal inkubált búzák alkoholjai a centrifugálással nyert egyes membránstruktúrák lipidjei összaktivitásának egy jelentős hányadát tették ki. Penjamo gyökér homogenizátum mitokondrium és mikroszóma /7000 g és 103000 g/ lipidjeinek vékonyrétegen történő szétválasztását elvégezve azt találtuk, hogy a rövid szénatom-számú alkoholok ezekben a struktúrákban is jelen vannak /13. ábra/.

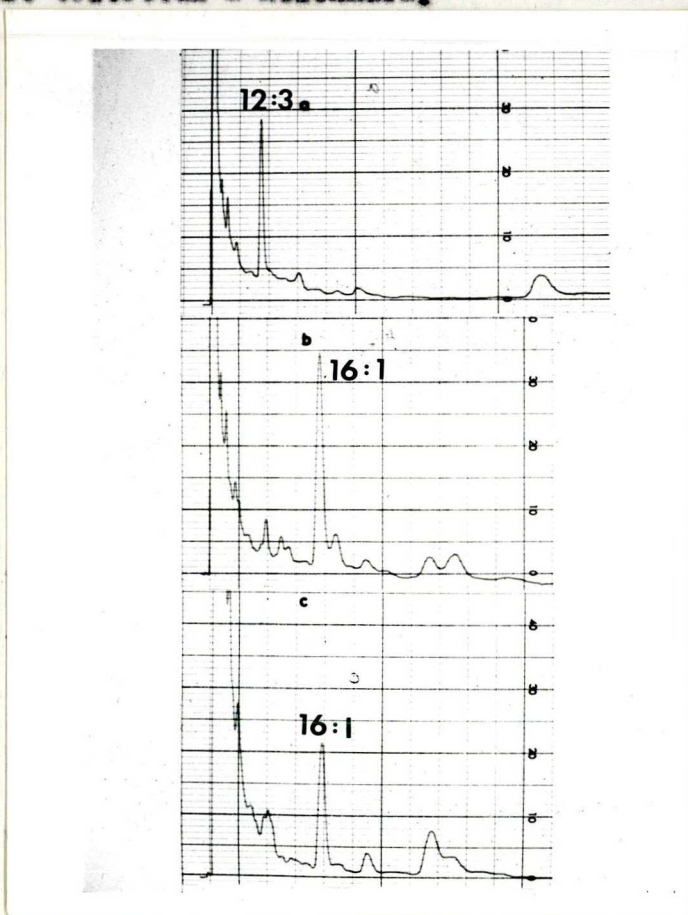


12. ÁBRA

Miranovskaja levél összlipidjeiből nyert metilészterek /a, balról jobbra: palmitinsav, linol- és linolénsav/ ill. ugyanezen zsírsavmetilészterek és a belső alkoholok acetátjai /b, 12:3 acetát, 16:0,

16:2 acetát, 18:2 és 18:3 acetát/ együtt kromatografálva. /Megosztófázis: EGSS-X/

Érdekes, hogy ezek az alkohokok, a levelek belső alkoholjaival összevetve szintén főleg telítetlenek, de többségüket a 16-C-számú, valószínű egy kettőskötést tartalmazó alkohol alkotja. Ez esetben is a CrO_3 -os oxidációval nyert zsírsavak metilésztereit töltöttük a kolonnára.



13. ÁBRA

Penjame viasztalanított levél /a/, ill. gyökér mitokondrium /b/ és mikroszóma /c/ alkoholokból CrO_3 -os oxidációval nyert zsírsavak metilésztereinek gázkromatogramja.

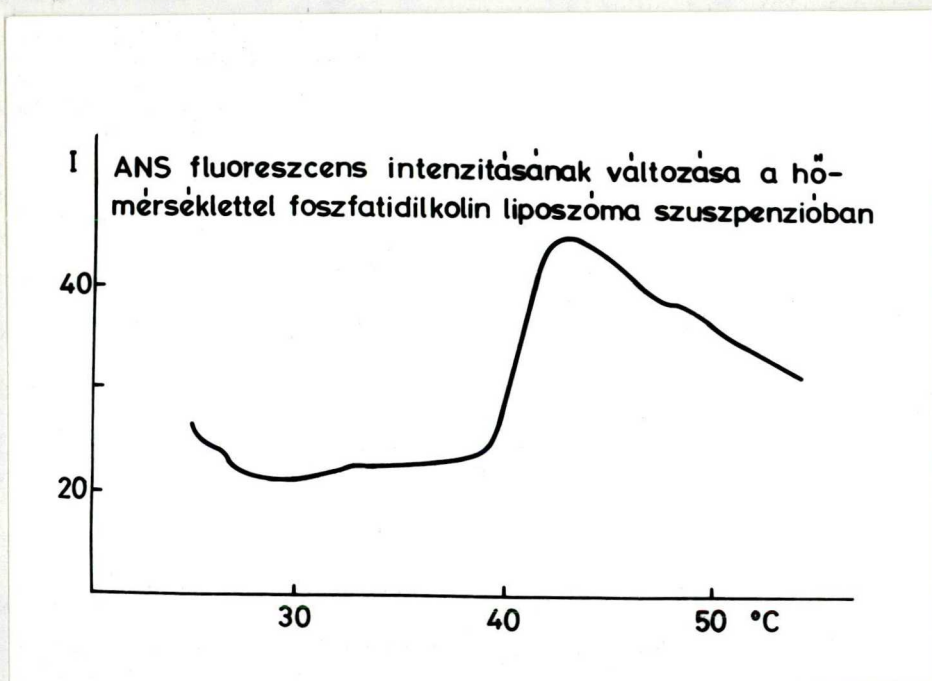
A levelek belsejében található, főként telítetlen kis szénatomszámú alkoholok szerepének felderítésére megvizsgáltuk, hogy ezek az alkoholok milyen kölcsönhatásokat gyakorolhatnak a környezetükben lévő különböző membránlipidekre.

7. Alkoholok hatása a lipidek fázistranziációs hőmérsékletére

Ismeretes, hogy bizonyos többgyűrűs merev szerves vegyületek, amelyek az öket gerjesztő monokromatikus fény egy részét magasabb hullámhosszon visszasugározzák, alkalmasak arra, hogy segítségükkel a lipidek fázisváltozásai hőmérsékletét megmérjük. Ezek a fluoreszkáló festékek /polaritásuktól függően/ képesek a lipidek /pl. foszfolipidek/ molekuláinak különböző helyihez kötődni, ezáltal információt adva a festék-lipid komplex viselkedéséről a különböző hőmérsékleteken. Mivel a lipidek fázisváltozásával egyidejűleg mind a komplex disszociációs állandója, mind pedig a lipidenkénti festék-kötőhelyek száma lényegesen megváltozik, az intenzitások hőmérséklettel való változásában egy ugrás tapasztalható, amelynek helye jelzi a lipidek olvadását vagy fagyását /lásd az előző fejezetet/.

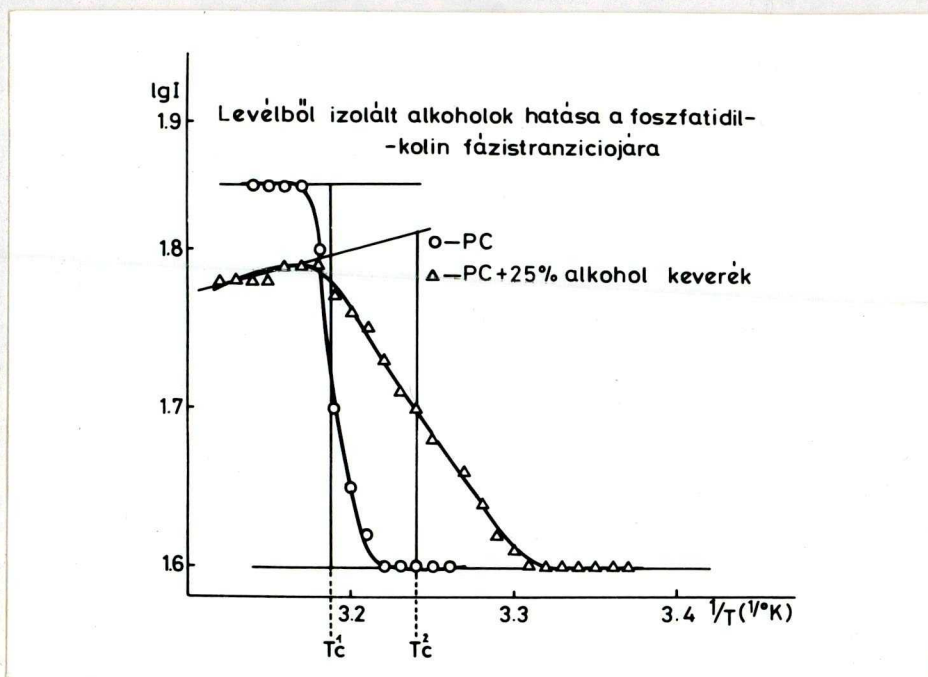
A szintetikus, két palmitinsavval észterezett foszfatidil kolinból ultrahanggal készített vezikulák $T_c = 41,5^\circ\text{C}$ /, amelyeket az általunk használt ANS⁺ fluoreszkáló festékkel a már leírtak szerint kezeltünk, igen alkalmasnak látszottak különböző idegen lipidszerű molekulák, így az alkoholok fázistranziációt befolyásoló hatásának vizsgálatára /14. ábra/. Amint az a 14. ábrán

látható, a valóságnak megfelelően az intenzitás hirtelen változása kb. 30°C -nál kezdődött és kb. 42°C -nál fejeződött be. A különböző buzák /előzőleg viasztalanított/ leveleiből kinyert belső alkoholok mért mennyiségét annyi foszfatidil kolinhoz adtuk, hogy az így kapott foszfatidil kolin-alkohol keverék 25 súly % alkoholt tartalmazott. A lipidkeverékből ezután a már ismert módon vezikulákat képeztünk és mértük az ANS⁻-sel kezelt rendszer fluoreszcens intenzitásának változását a hőmérséklettel. Mivel - a már részletezett összefüggések alapján - a festék-lipid komplex fluoreszcens intenzitását a hőmérséklet reciprokának függvényében ábrázolva a lipidek tranzíciós hőmérséklete alatti és feletti hőmérsékleteken egyeneseket kapunk, ezzel az ábrázolással egyszerűbb a tranzíciós hőmérsékletek meghatározása /37/. A már említett egyenes szakaszok között úgy húzunk egy, az abszcisszával párhuzamos szakaszt, hogy ezt a legi függvény megfelelően /15. ábra/.



14. ÁBRA

ANS⁻ fluoreszcens intenzitásának változása a hőmérséklettel foszfatidil kolin liposzóma szuszpenzióban. Az intenzitásokat önkényes egységben mértük.



15. ÁBRA

Foszfatidil kolin és 25 % belső alkohol keveréket tartalmazó PC liposzóma szuszpenziók tranzió hőmérsékletének meghatározása ANS⁻-el. A fluoreszcens intenzitások logaritmusát ábrázoltuk a Kelvin fokban megadott hőmérsékletek reciprokok értékének függvényében.

$$1/T_c^1 = 40,6^\circ\text{C} \text{ és } 1/T_c^2 = 35,5^\circ\text{C} \quad T = 5,1^\circ\text{C}/$$

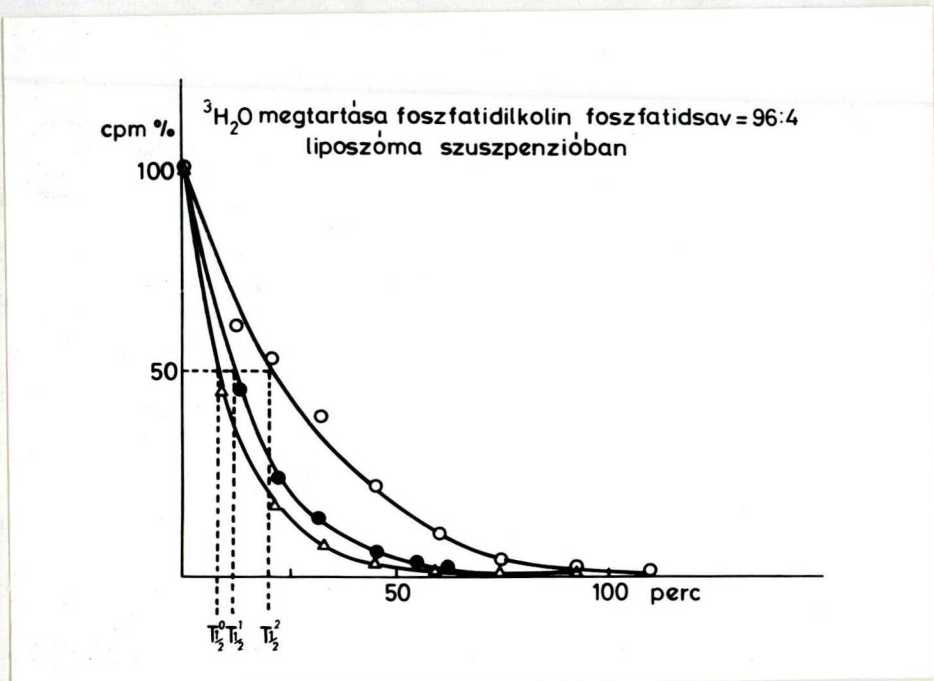
Amint az a 15. ábrából kitűnik, a különböző búzák belső alkoholjai mintegy 5°C-al leszállították a PC tranzió hőmérsékletét, az adott koncentrációviszonyoknál.

Nem búzákból származó szintetikus 14:0 alkohol és a már említett PC kölcsönhatását Horváth László tudományos munkatárs az SZBK Biofizikai Intézetében Raman-Lézer spektroszkópia segítségével kérésünkre megvizsgálta. Megállapította, hogy az alkoholak PC:alkohol=20:1 molaránynál már néhány fokkal lecsökkentették a rendszer tranzíciós hőmérsékletét. Kimutatható volt az is, hogy alkoholak jelenlétében a lipidek mozgékonyasága és ezzel együtt a fluiditása is megnőtt. Az alkoholak a foszfolipidekkel olyan gyenge komplexeket alkotnak, amelyekben a kétféle lipidmolekulák közötti összetartó erő részint az alifás láncban van der Waals, ill. az észterező zsírsavak karbonil csoportja és a primer alkohol OH csoportja közötti H-hid kötés eredménye.

8. Linolénalkohol hatása a lipidek vízáteresztő képességére

A molekuláris lipidrétegek vízáteresztő képességének változását alkoholak jelenlétében az előző fejezetben leírt modellkísérlet alapján, 18:3 alkohol segítségével végeztük. A (PC+PA):18:3 = 2:1 molarány alapján készített vezikuláknak megváltozik a permeabilitása a (PC+PA) liposzóma szuszpenzióban mértéhez képest. /16. ábra/ E kísérlet célja az volt, hogy a levelek belsejében található 12:3 alkoholak feltételezett sejtmembrán permeabilitás-szabályozó szerepét igazoljuk. A triciált víz kijutása a féligáteresztő hártván túli térbe a liposzómákba zárt víz lipidrétegen történő átdiffundálásának sebességétől is füg-

gött. Ha a vezikulákba alkoholok épültek be, a liposzómák permeabilitása nagymértékben megnövekedett. A triciált víz kijutásának félideje $T_{1/2}$ pontosan megadja a permeabilitás változásának mértékét. $T_{1/2}^0 = 8$ perc a vezikulák nélküli rendszerben, $T_{1/2}^1 = 12$ perc a PC-PA vegyes vezikulák jelenlétében, ha azokban alkoholt inkorporáltunk, míg $T_{1/2}^2 = 22$ perc PC-PA vezikulák esetében.



16. ÁBRA

Triciált víz kiáramlása, ha a $^3\text{H}_2\text{O}$ egy részét foszfatidil kolin:foszfatidsav=96:4 mól összetételű liposzómákba zártuk, ultrahangos kezeléssel /ooo/. Kontrollként / $\Delta\Delta\Delta$ / a triciált vizet a vezikulák előkészítése után adtuk a rendszerhez. ooo jel mutatja azt az esetet, amikor a vezikulák lipidjeinek 33 mol%-a 18:3 alkoholt volt.

$T_{1/2}$ az az idő, amely alatt a triciált víz aktivitásának 50 %-a marad a dializáló hüvely belsejében.

VI.

A Z E R E D M É N Y E K É R T É K E L É S E

Azok a kísérletek, amelyeket az eltérő télállóságu búzák zsírsavkészletének megváltozása és a fagyállóság közötti kapcsolat felderítése érdekében tettünk, azt mutatják, hogy a telítetlen zsírsavak szintézisének mértéke az alacsony hőmérsékleten, önmagában nem lehet felelős a 0°C alatti hőmérsékletek eltéréséért.

Az intézetünkben eddig folytatott kísérletek szerint az egyes lipidfélések arányának megváltozása szintén nem következik be olyan mértékben az alacsony hőmérsékleteknek kitett búzaféléken, amilyen mértékű változás biztosíthatná, hogy a membránlipidek tranzíciós hőmérséklete az egyébként a növény számára még elviselhető alacsony hőmérsékletek alatt legyen.

A különböző hideg- és fagyűrőképeségű növényekkel folytatott kísérletek is igazolják feltevésünk helyességét /42, 43, 44/.

Az a tény, hogy az $1-^{14}\text{C}$ acetáttal előinkubált búzák telítetlen zsírsavjainak fajlagos aktivitásaiban az inkubálást -10°C -on folytatva lényeges különbségek vannak, felveti annak lehetőségét, hogy e módszer segítségével eddig ismeretlen télállóságu búzák tűrőképességét előre megjósoljuk. De a fentiekből az is kitűnik, hogy a stressz-szerű hőmérsékletcsökkenés túlélése csak a zsírsavak szerepének figyelembevételével elfogadhatóan nem magyarázható. Elképzeléseink szerint az adaptációs mechanizmus időben

két fázisra választható szét. A linolénsav felhalmozódása hideg hatására csak lassan következik be /több nap vagy hét/, amelyet gyors zsiralkohol képződés előz meg. /Feltételezhető, hogy az alkoholokon kívül más zsirsavszármazékok, pl. hidroxisavak is keletkeznek hideg hatására./

Amint az az alkoholok fajlagos aktivitásainak denzitometria meghatározásából sejthető volt, főképpen exogén olajsavból jelölődő alkoholoknak szerepe van a fagyállóságok eltérésében. A búzában található alkoholok különválasztása un. belső és levélfelszíni viaszalkoholokra nagy előrelépés volt az alkoholok szerepének értelmezésében. A levélfelszíni viaszok és az ezekben legnagyobb mennyiségben jelenlévő viaszalkoholok $+5^{\circ}\text{C}$ -on történő szintézisének eltérő sebessége /a fagytűrésekben lassabb, a kevésbé télállóknál gyorsabb/ végső soron a viaszréteg vastagságának eltérését eredményezi az egyes búzafélékben. Amint a bevezetőben utaltunk rá, a viaszoknak fontos szerepe van a növények párologtatásának szabályozásában. Erősen viaszos levelek jobb víztartó képességgel rendelkeznek, esetükben nem is a kutikuláris, inkább a sztomatikus transpiráció érvényesült. Több szerző megfigyelte már, hogy a viaszok mesterséges eltávolítása, a növények normális vízvesztésének többszöröséhez vezet /45, 46/.

Az eltérő vastagságu viaszréteg tehát meghatározó tényező a fagykárosodásnak kitett búzafélék levelei nedvességtartalmának szabályozásában. Gusta, Burke és mások /47/ legújabb - különböző télállóságu búzák víz-jég fázisegyensúlyának $+10$ és -40°C közötti

un. pulzáló NMR módszerrel történő - vizsgálatai szerint, a szövetek meg nem fagyott víztartalmát /g folyékony víz/g száraz súly/ a csökkenő hőmérséklet függvényében ábrázolva, a buzák elfagyási hőmérsékletétől függetlenül, mindig azonos lefutású görbék, hiperbolákat kapunk. Az ilyen típusu, bármilyen növényre felvett görbék csak a szövetek $0-+5^{\circ}\text{C}$ közötti, szárazsúlyra vonatkoztatott nedvességtartalmában különböztek egymástól. /Ez az érték pl. a -24°C -on megfagyó buzákban harmadakkora volt, mint a -2°C -on megfagyókban./ A fagyveszély mértéke összefügg a szövetek 0°C alatti jégtartalmával, a képződő jég viszont annál kevesebb, minál kisebb volt a növény nedvességtartalma a megfagyás előtt. Különböző növények fagyasztás előtti mesterséges dehidratációja $7-8^{\circ}\text{C}$ -al növelte azok fagyállóságát. Mindazok a tényezők, amelyek a fagyveszélynek kitett növények nedvességtartalmát a legteljesebb egyedek optimális szintjére csökkentik, anélkül, hogy ez a növények elszáradásához vezetne, alapvető fontosságúnak az akklimatizáció ill. a várható maximális fagyűrőképesség szempontjából. Mivel méréseink alapján mind a viaszok, mind a viaszalkoholok $1-14^{\circ}\text{C}$ ecetsavból $+5^{\circ}\text{C}$ -on történő keletkezésének sebessége a legjobb télállóságú Miranovskajában a tavaszi Penjamoónak a fele, várható, hogy ezen a hőmérsékleten víztartalmuk is hasonló arányban alakul. Ez esetben pedig, a viaszok és viaszalkoholok egyszerű kinetikai és analitikai vizsgálata komoly lehetőséget jelent a buzafélék fagyállóságának megítélésében.

Amint a bevezetőben utaltunk rá, a membránok akklimatizáció-

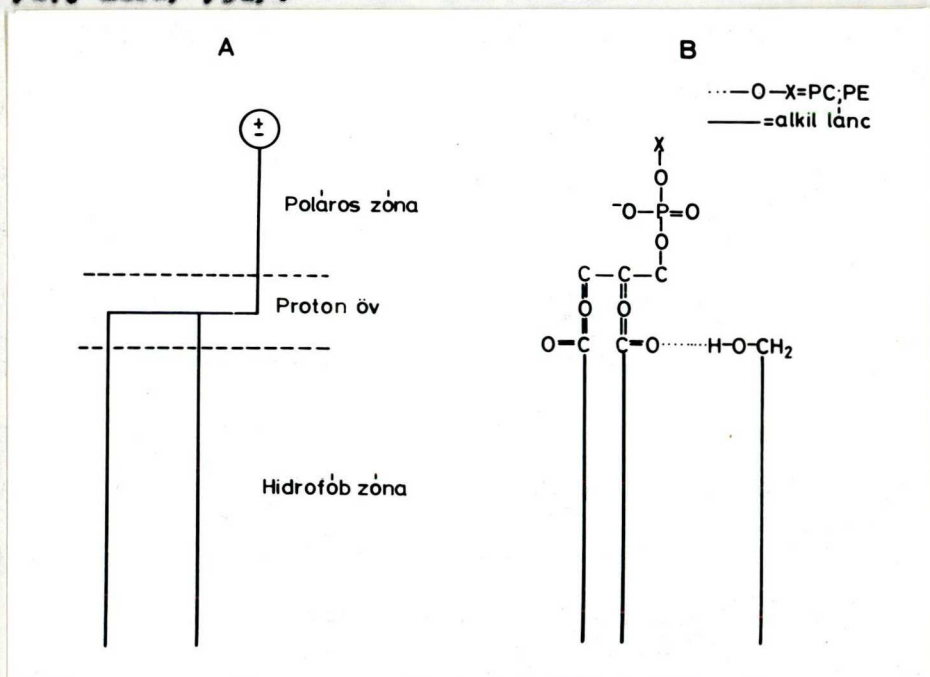
ját nem elégséges csak a telitetlen zsírsavak felszaporodására visszavezetni. A membránok és membránlipidek viselkedését sok, ma még ismeretlen tényező is befolyásolhatja /48/. E tényezők közül mi azokat próbáltuk tekintetbe venni, amelyek bizonyíthatóan hatással vannak a membránlipidek tranzíciós hőmérsékletére és a membránlipidek permeabilitására. A különböző hőmérsékleteken $-1-14^{\circ}\text{C}$ acetáttal inkubált, majd viasztalanított buzalevelek lipidjei aktivitásának egy jelentős hányada zsíralkoholokból származott. Ez, a főleg telitetlen és rövid szénatomszámú elsőrendű alifás alkoholokból álló keverék helye és funkciója alapján különbözik a levélfelszíni viaszalkoholoktól. Bizonyos tipikus viaszkomponensek, pl. viaszészterek vagy alkoholok jelenléte állati szervezetekben az irodalomból ismert /49/. Tudomásunk szerint növényekben csak a paraffinokról bizonyították be eddig, hogy bizonyos organeliumokban is /kloroplastisz, mitokondrium/ és nem csak a levelek felszínén funkcionálnak /50/. A levelek belsejében található és a levelek össz-zsírsavkészletével összemérhető mennyiségű zsíralkoholok egy jelentős része 12:3 alkohol, bár kis mennyiségben egészen hosszú szénatomszámú általunk még be nem azonosított komponensek is előfordulnak közöttük. Alacsony hőmérsékletek hatására ezeknek a belső alkoholoknak a mennyisége a jobb télállóságu buzafélék leveleiben nagyobb mértékben növekszik meg. A Miranovskajában a jelzett acetátból jelölődő teljes alkohol mennyiség egyharmada volt belső alkohol 25°C -on, $+5^{\circ}\text{C}$ -on viszont már fele. A Penjameban 25°C -on hasonlóak voltak az arányok, mint a Miranovskajában, viszont $+5^{\circ}\text{C}$ -on elmaradt a Miranovskajánál ész-



lelt arányváltozás. -10°C -on a Miranovskajában a $+5^{\circ}\text{C}$ -on mutatkozó tendencia tovább erősödött: szinte a teljes alkoholkészlet belső alkohol volt. Ugyanílyen körülmények között a Penjamban mindkét alkoholféléből csak csekély mennyiségű jelölődött. A különböző prekursorokkal folytatott kísérletek azt mutatják, hogy az alkoholok jelölődésében az olajsavnak kitüntetett szerepe lehet. Felmerül a kérdés, vajon a C_{18} -nál rövidebb alkoholok, legfőképpen a 12:3 miképpen keletkezik /ha egyáltalán keletkezik/ olajsavból az eredeti karboxil csoport szenének megtartásával.

A membránlipidek közt található zsiralkoholok és a növények hideg akklimatizációja közötti kapcsolatra azonban valószínűnek látszik, hogy megtaláltuk a választ.

A szabad zsiralkoholok elhelyezkedését az un. Brockerhoff-féle egyszerűsített membránmodell alapján következőképpen képzeljük /17. ábra/ /51/:

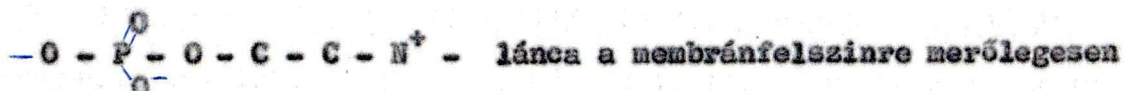


17. ÁBRA

**/A/ részlet a Brockerhoff-féle membrán-
modellből. /B/ Foszfolipid-alkohol
komplex.**

Az alkoholok apoláris láncukkal a membránok hidrofób övébe süllyednek. Alkil láncuk a foszfolipidek zsírsavláncaihoz hasonló módon viselkedik. Az alkoholok OH csoportja a foszfolipidek proton övéhez kapcsolódik. Az észterezett savak karbonil oxigénje kellően negatív parciális töltésű ahhoz, hogy szabad elektronjai révén H-hid kötést létesíthessen az alkoholok OH csoportjával. A β -OH szteroidok /pl. koleszterol/ hasonló módon függeszkednek a membránokban. Ugyanakkor a szteroidokhoz hasonlóan a zsíralkoholok e proton övében saját nukleofil oxigénjükön néhány móli vizet köthetnek meg. A foszfolipidek környezetében lévő víz /akár elektrosztatikusan, akár H-hid kötéssel kötött/ a molekulák natív konformációjának biztosításán túl, növeli a poláros csoportok szabad rotációját. A membránlipidek tranziációs hőmérsékletének csökkentésében azonban a legfontosabb szerepe az alkoholok telítetlen alkil láncainak van. A membránok hidrofób zónájának fluiditása annál nagyobb, minél erőteljesebben érvényesül az idegen molekula /itt zsíralkohol/ perturbációt növelő hatása. A kellően rövid vagy molekulánként több cisz-kettős-kötést tartalmazó, /és ezáltal megfelelően "szegzagos"/ esetleg hosszabb szénláncú alkoholok mennyisége a membránok belsejében mozgékonyágában reguláló szerepet játszik. Az alkoholok azonban

véleményünk szerint nem csak közvetlenül hatnak a tranzíciós hőmérsékletre. Jelenlétükkel a membránalkotó PC és főleg a PE nagyfokú szeparációját idézik elő. Röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján valószínű, hogy a PC molekulák poláros csoportjának

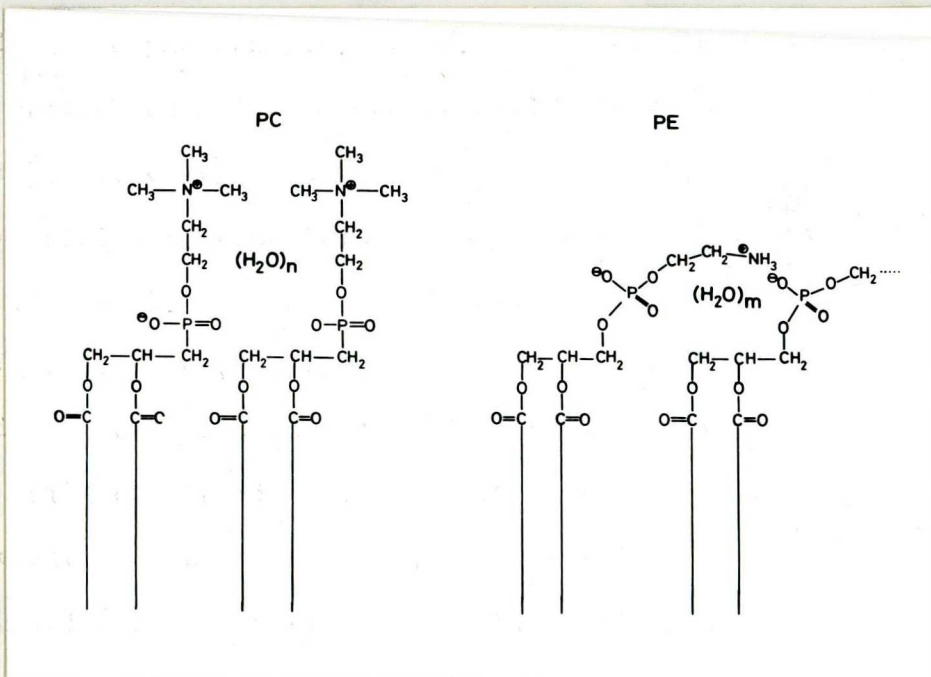


áll /52/. Ezzel szemben a szomszédos PE molekulák szorosan kapcsolódnak egymáshoz /18. ábra/. A kapcsolódás a kvartner N körüli protonok és a szomszédos molekulák foszfát csoportjai között az egyik legelfogadhatóbb magyarázata annak, hogy miért magasabb a tranzíciós hőmérséklete a PE-nek az ugyanazon savakkal észterezett PC-nél. Ha a szabad alkohol molekulák pl. a PE molekulák közé beékelődnek, akkor azok szoros illeszkedése fellazul. A poláris csoport kedvezőbb térállása a szabad rotáció növekedésén keresztül csökkenti a rendszer tranzíciós hőmérsékletét. A belső alkoholoknak az a képessége, hogy jelenlétükben a membránlipidek tranzíciós hőmérséklete lecsökken, módot nyújt arra, hogy az egyes buzafélék télállósága fokozódjék.

Az alkoholok szerepe a lipidek vízáteresztő képességének növelésében nem meglepő. A nagyobb fluiditású membránok nagyobb permeabilitását több szerző megfigyelte /53, 54/.

Modellkísérletünkben a 18:3 alkohol vízáteresztőképesség növelő hatását bebizonyítottuk. E ténynek a jelentőségét a következőkben látjuk: már utaltunk rá, hogy a szövetek alacsony nedvességtartalma önmagában nem biztosíték a jégkristályok okozta mechani-

kai károsodással szemben. A jó télállóságu növényekben, amelyek plazmamembránjának a vízáteresztő képessége pl. az alkoholok jelenléte miatt hideg hatására megnövekszik, a szövetek nedvességtartalmának jelentős része képes úgy megfagyni, hogy jégkristályok csak extracellulárisan képződjenek.



18. ÁBRA

A szomszédos PC és PE molekulák elhelyezkedése a membránokban /n > m/.

Ugyanilyen hűtési sebességeknél a fagyérzékeny növényekben a víz a sejtmembrán kis vízáteresztő képessége miatt intracellu-

lárisan fagy meg. Mindkét esetben egy termodinamikai egyensúly következik be tehát, amelynek hajtóereje a víz és a jég gőznyomás-különbsége.

Az egyensúly beállításának módja azonban - amely legfőképpen a sejttel vízáteresztőképességétől függ - a növény túlélése szempontjából döntő fontossága.

Az utóbbi időben több szerző foglalkozik olyan hormonszerű anyagokkal, amelyek a növényi sejtmembránok permeabilitását befolyásolják, és ezen keresztül fontos élettani hatással is bírnak /55/.

Ez a tény különösen aktuálissá teszi az alkoholekkel kapcsolatos vizsgálatainkat.

VII.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az eltérő télállóságu buzafélék lipidanyagcseréjét vizsgálva bebizonyosodott, hogy a membránokban és a levelek felszínén egyaránt található zsiralkoholoknak része van a növények fagyállóságának fokozásában.

Az alkoholok szerepe kettős. A levélfelszíni viaszalkoholok, amelyek az általunk vizsgált 3 faj és 4 fajta esetében a viaszok fő tömegét adják, szabályozó szerepet töltenek be a növények vízháztartásában.

Az ún. belső alkoholok, amelyek mind a levél, mind a gyökök sejterganeljumjainak membránlipidjei közt megtalálhatók, csökkentik e lipidek tranzíciós hőmérsékletét, és növelik a membránok vízáteresztőképességét.

A szövetek és sejtek alacsonyabb víztartalma, továbbá a nagyobb rendezetlenségű, fluidabb membránstruktúra bizonyítottan a legfőbb feltétele a növények nagyobb télállóságának.

Valószínű, hogy az alkoholokon kívül léteznek egyéb olyan lipidféleségek, amelyeknek hatása az alkoholokéhoz hasonló. A zsírsavak különböző származékai, pl. az α -hidroxisavak elvben szintén alkalmasak a tranzíciós hőmérséklet csökkentésére. Vizsgálatuk folyamatban van.

Az alkoholok és lipidek kölcsönhatásának befolyása a membránokhoz kötött enzimek aktivációs energiájára / és általában ezek-

nek az enzimeknek a működésére/ igen érdekesnek látszik.

Szintén a közeljövőben szeretnénk megvizsgálni, hogy a telítetlen alkoholoknak /főleg 12:3/ nincs-e szerepe a telítetlen zsírsavak keletkezésében. Eddigi adataink szerint a feltevés valószínű. Ez pedig tovább bővítené az alkoholok eddig megismert szerepét a buzafélék télállóságának fokozásában.

VIII.

RÖVIDÍTÉSEK

2:0	acetát
12:0	laurát
16:0	palmitát
18:0	sztearát
18:1	oleát
18:2	linolát
18:3	linoleát
T_c	a lipidek tranzíciós hőmérséklete
PC	foszfatidil kolin
PA	foszfatidsav
PE	foszfatidil etanolamin
ANS ⁻	8-anilin-naftalin-szulfonát

IX.

I R O D A L O M

1. Graves, D.J., Sealock, R.W., Wang, J.H. 1965
Biochemistry 2:290-295
2. Hanafusa, N. 1969. Freezing and drying of microorganism,
117-129. Univ. Tokyo Press
3. Khan, A.W., Davidkova, E., van den Berg, L. 1968
Cryobiology 4: 184-188
4. Kono, N., Ujeda, K. 1971.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 42: 1095-1100
5. Leibo, S.P., Jones, R.F. 1964
Arch.Biochem.Biophys. 106: 78-88
6. Chilson, O.P., Costello, L.A., Kaplan, N.O. 1965
Fed.Proc. 242: 55-56
7. Levitt, J. 1972. Responses of plants to enviromental
stress. New York: Academi. 697 pp.
8. Grenham, C.G., Daday, H. 1960.
Aust.J.Agric.Res. 11: 1-15
9. Kakau, S., Salt, R.W. 1968.
Can.J.Bot. 46: 1211-1213
10. Siminovitch, D., Gfeller, F., Rheume, B. 1967
Int.Conf.Cryobiol. 2:93-117
11. Williams, R.J., Hope, H.J. 1974
Plant Physiol. 79: 2241 /Abstr/
12. Heber, U.W., Santarius, K.A. 1964
Plant Physiol. 39: 712-719
13. Heber, U.W., Tyankova, L., Santarius, K.A. 1971
BBA 241: 578-592



14. George, M.F., Burke, M.J., Pellett, H.M., Johnson, A.G.,
1974. Hort-Science 9: 519-522
15. Johansson, N.O. 1970
Natl.Swed.Inst.Plant.Prot. 14: 364-382
16. Johansson, N.O., Krull, E. 1970
Natl.Swed.Inst.Plant.Prot. 14:343-363
17. George, M.F., Burke, M.J., Weiser, C.J. 1974
Plant Physiol. 50: 527-530
18. Dennis, F.G., Jr., Lumis, G.P., Olien, C.R. 1972
Plant Physiol.50: 527-530
19. Olien, C.R., 1974
Plant Physiol. 18: 387-408
20. Dorsey, M.J., 1974
Proc.Am.Soc.Hortic.Sci. 11: 130-137
21. Hatakeyma., Kato, J. 1965
Planta 65: 259-268
22. Wiegand, K.M. 1906
Bot.Gaz. 41: 373-424
23. L.V. Gusta, Burke, J.M., Kapoor, A.C. 1975
Plant Physiol. 56: 707-709
24. Krupa Z., Baszynski, T. 1975
BBA 408: 26-34
25. Berendson, H. 1974
Water-A Comprehensive Treatise 4: 327-342
26. Brandts, J.F., Fu, J., The Frozen Cell, 189-208
Ciba Found.Symp. London: Churchill. 487.pp 1970
27. Burke, M.J., Bryant, R.G., Weiser, C.J. 1974
Plant Physiol. 54: 392-398

28. Burke, M.J., George, M.F., Bryant, R.G. 1975
Water Relations of Foods, ed R.B. Duckworth,
111-135. London: Academic. 715 pp.
29. Chen, P. 1975. The study of freezing process... PhD thesis.
Univ. Minnesota, St. Paul 156 pp.
30. Childers, W.F. 1973 Modern Fruit Science.
New Jersey Sommerset. 185 pp.
31. Levitt, J. 1972. Responses of Plants to environmental
Stress, New York: Academic 697 pp.
32. Barber, H.N., Netting, A.G. 1968
Phytochemistry 7: 2089-2093
33. Kolattukudy, P.E.
Biochemistry 1965 4: 1844 1855
34. Kolattukudy, P.E. 1968
Science 159: 498-505
35. De La Roche I.A., Andrews C.J. 1973
Plant Physiol. 51: 468-473
36. Paul, P., Glash, Wagner, H. 1970
Journal of Chrom. 49: 488-492
37. Trauble H., Overath, P., 1973
BBA, 307: 491-512
38. Keizo Inoue, 1974
BBA 339: 390-402
39. Bittmann R., Blau, L., 1972
Biochemistry 25: 4831
40. Farkas, T., Déri-Hadlaczky É., Belea A., 1975
Lipids, 10: 331-334
41. Calliard, T., Matthew. 1976
424: 26-35 BBA

42. Singh I., De La Roche I.A., Siminovits D. 1976
/Rézirat/
43. Siminovitch, D., Singh, I., De La Roche I. A. 1975
Cryobiology 12: 144-153
44. Yoshida, S. Sakai, A. 1973
Plant Cell Phys. 14: 353-359
45. Hall, D.M., and Jones R.L. 1961
Nature 191: 95-96
46. Grnarevic, M. Radler F., 1967
Planta 75: 23-27
47. Isd. 23.
48. Isd. 42.
49. Blank M.L., Snyder, F., 1969
Lipids 5:337-342
50. Gulz, P.G., 1968
Phytochemistry 7: 1009-1017
51. Bieckerhoff, H. 1974
Lipids 9: 645-650
52. Jendrasiak G.L., Mendible J.C., 1976
BBA 424: 149-150
53. Wilson, G., Rose, S.O. 1970
BB Res.Comm. 38: 617-623
54. Kiyosawa K., Masashi T., 1973
Protoplasma 78: 203-214
55. Wright, S.T.C., R.P.W. 1969
Nature 15: 719-720

Ezután mondok köszönetet dr. Farkas Tibor tudományos főmunkatársnak, tényleges vezetőnek. Munkám során nagyon sokat segített elvi és gyakorlati tanácsaival.

Megköszönöm a munkában nyújtott segítséget Kiss János és Dombi György tanszéki mérnököknek /JATE, Szerves Kémiai Intézet/ és Horváth László tudományos munkatársnak /SzBK Biofizikai Intézet/.