ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

# POPIS OBJAVU K DIPLOMU ČÍS. 27

Prihlásené: 09. 12. 74 (PO 68-74)

Právo prednosti od 24. 10. 73

Zverejnené: Výskum inhibície rastu plesní na potravinárskych surovinách rastlinného pôvodu za sťažených klimatických podmienok, Výskumný ústav potravinársky (knižnica), Bratislava

Udelené: 02. 12. 82
Vydané: 15. 06. 83

MDT
576.34

Autor objavu: ŠUBÍK JÚLIUS, RNDr., CSc., BRATISLAVA

Názov objavu: **Spôsob a miesto účinku antifungálneho antibiotika mucidinu**

Predmet objavu: Jav spočívajúci v existencii špecifickej inhibície mitochondriálneho transportu elektrónov mucidinom v mieste cytochróm-**bc**$_1$-komplexu respiračného reťazca, v dôsledku čoho dochádza k inhibícii dýchania a rastu eukaryotických buniek, ktorých celková energetická potreba aeróbneho rastu je krytá s adenosintrifosfátem tvoreným oxidatívnou fosforyláciou.

K tomu, aby bunky húb rástli alebo prežívali je nutné, aby v nich prebiehali mnohé biochemické procesy. Podľa interferencie s týmito procesmi rôzne inhibítory môžu principiálne zasahovať do metabolizmu nukleových kyselín, bielkovín, sacharidov a lipidov, môžu interferovať s bunkovými membránami, s tvorbou bunkovej steny alebo s energetickými mechanizmami bunky.

V súčasnosti poznáme už pomerne veľa antifungálnych antibiotík. Napriek tomu však iba u niektorých z nich je rozriešený mechanizmus ich účinku (Gottlieb, D., Shaw, P. D.: Antibiotics. I. Mechanism of action, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967; Gottlieb, D., Shaw, P. D.: Ann. Rev. Phytopathol. 8, 371, 1970). Znalosti o mechanizme účinku antifungálnych antibiotík pomáhajú totiž nielen pri ich praktickom a rozumnom využití, ale sú nepostrádateľné i pre výskum ich analógov, ktoré by mohli byť ešte účinnejšie a lepšie uplatniteľné v praxi ako pôvodné.

Jedno z nedávno objavených antibiotík produkované bazídiomycétou Oudemansiella mucida je mucidin. Príprava tohto antibiotika je predmetom dvoch čsl. patentov (Musílek, V.: Čsl. pat. 136 492; Vondráček, M., Čapková, J., Šlechta, J., Benda, A., Musílek, V., Cudlín, J.: Čsl. pat. 136 495). Toto antibiotikum z hľadiska chemickej štruktúry je úplne nové. Podrobné mikrobiologické a klinické experimenty ukázali, že mucidín má výraznú antifungálnu aktivitu, pričom jeho relatívne nízka toxicita pre cicavce dovoľuje ho používať i v klinickej terapii mykóz. V tomto ohľade je mucidin z doteraz klinicky používaných antifungálnych antibiotík najprijateľnejší. Napriek tomu však mechanizmus jeho účinku dosiaľ rozriešený nebol.

Podstatou predloženého objavu je zistenie existencie špecifickej inhibície mitochondriálneho transportu elektrónov mucidinom v mieste cytochróm-$bc_1$-komplexu respiračného reťazca, v dôsledku čoho dochádza k inhibícii dýchania a rastu eukaryotických buniek, ktorých celková energetická potreba aeróbneho rastu je krytá s adenozíntrifosfátom tvoreným oxidatívnou fosforyláciou.

V súhlase s prvým zdelením (Musílek, V., Černá, J., Šašek, V., Semerdžieva, M., Vondráček, M.: Folia Microbiol. **14**, 377, 1969) potvrdil sa inhibičný účinok mucidinu na rast rôznych druhov vláknitých húb. Mucidin (200 — 500 $\mu$g) pridaný na povrch agarového semisyntetického média obsahujúceho glukózu (20 g/l) a inokulované spóry ($10^6$ spór/ml) inhiboval rast Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans, Penicillium italicum, Penicillium roqueforti, Penicillium cyclopium, Penicillium chrysogenum, Penicillium brevi-compactum, Mucor mucedo, Mucor racemosus, Botrytis cinerea, Rhizopus nigricans, Rhizopus oryzae, Paecilomyces varioti a Fusarium oxysporum. K inhibičnému účinku



mucidinu Mucor a Rhizopus boli najcitlivejšie. Zóny inhibície (priemeru 5 až 35 mm) boli však vo všetkých prípadoch pokryté jemnou vrstvou mycélia.

Nielen vláknitý rast rôznych húb, ale i klíčenie spór bolo inhibované mucidinom. Pri suboptimálnych koncentráciách mucidinu dochádzalo k zníženiu rýchlosti bobtnania konídií i rastu mycélia, avšak rastové výťažky v stacionárnej fáze rastu sa nezmenili. Stupeň inhibície klíčenia konídií Aspergillus niger ako funkcia koncentrácie mucidinu je udaná na obr. 1, kde na ose xc je koncentrácia mucidinu v $\mu$g/ml a na ose yp je percento klíčiacich konídií. Semisyntetické médium s glukózou (5 g/l) ako substrátom obsahovalo v objeme 2 ml $1 \times 10^7$ konídií a rôzne koncentrácie mucidinu udané na obrázku. Percento klíčiacich konídií sa stanovilo po 24 hod. statickej inkubácie pri 30 °C počítaním v Bürkerovej komôrke.

Keď konídie v neprítomnosti mucidinu boli už vyklíčené, konídie v prítomnosti relatívne nízkej koncentrácie mucidinu (25 $\mu$g/ml) mali ešte veľkosť dormantných konídií a neboli schopné inkorporovať ani $^{14}$C-leucín ani $^{14}$C-uracil do bunkového materiálu nerozpustného v kyseline. Obr. 2 udáva vplyv mucidinu na inkorporáciu $^{14}$C-leucínu konídiami A. niger v priebehu klíčenia, pričom t na ose x je čas v hodinách a r na ose y je $10^2$ imp/min/$10^6$ konídií. Reakčná zmes v konečnom objeme 10 ml obsahovala semisyntentické médium bez peptonu a kvasničného extraktu doplnené s 30 $\mu$g L-alanínu, 2,3 $\mu$mol $^{14}$C-leucínu (34,8 MBq/mmol), $2{,}5 \times 10^7$ konídií a 250 $\mu$g mucidinu, konečné pH 5,5, teplota 30 °C. Vo vyznačenom časovom intervale sa rádioaktivita bunkového materiálu nerozpustného v $HClO_4$ stanovila scintilačným spektrometrom Packard Tri-Carb. Obr. 3 udáva vplyv mucidinu na inkorporáciu $^{14}$C-uracilu konídiami A. niger v priebehu klíčenia, pričom t na ose x je čas v hodinách a r na ose y je $10^2$ imp/min/$10^6$ konídií. Experimentálne podmienky boli podobné ako v obr. 2 avšak miesto rádioaktívneho leucínu médium obsahovalo 3 $\mu$mol $^{14}$C-uracilu (40,0 MBq/mmol).

Za podobných experimentálnych podmienok dýchanie dormantných konídií i buniek mycélia A. niger bolo tiež inhibované mucidinom, ale stupeň inhibície bol menší ako s kyanidom. Respiračná aktivita konídií bola k mucidinu menej citlivá ako dýchanie myceliálnych buniek (tab. 1).

Tab. 1. Efekt mucidinu na respiračnú aktivitu konídií a mycélia A. niger. Polarografická nádobka v konečnom objeme 2 ml obsahovala $NaH_2PO_4$ (0,1 mol/l), glukózu (0,025 mol/l), konídie (9 až 14 mg suchej hmotnosti), alebo mycélium (8 až 15 mg suchej hmotnosti) a inhibítor, konečné pH 5,8, teplota 30 °C. Bunky mycélia rástli pri 30 °C 18 hodín v semisyntetickom médiu zo spórového inokula ($10^6$ konídií/ml).

| Inhibítor | Inhibícia dýchania (%) Konídie | Mycélium |
|---|---|---|
| 10 μg mucidin/ml | 71,4 | 88,6 |
| 25 μg mucidin/ml | 71,4 | 90,0 |
| 100 μg mucidin/ml | 79,6 | 91,5 |
| 1 μmol KCN/ml | 99,0 | 98,5 |

Ďalšie štúdium mechanizmu účinku mucidinu sa vykonalo s kvasinkami Saccharomyces cerevisiae, ktoré sú schopné rásť na glukóze, využívajúc ju ako zdroj uhlíka dokonca i za podmienok keď oxidatívna fosforylácia je nefunkčná (Šubík, J., Kováč, L., Kolarov, J.: Biochim. Biophys. Acta **283**, 146, 1972).

Dýchanie buniek S. cerevisiae bolo vysoko citlivé k inhibičnému účinku mucidinu. Obr. 4 udáva vplyv mucidinu na dýchanie celých buniek kvasiniek, kde c na ose x je koncentrácia mucidinu v μg/ml a p na ose y je percento inhibície respiračnej aktivity. Reakčná zmes v 2 ml obsahovala glutarát draselný (0,050 mol/l), $KH_2PO_4$ (0,010 mol/l), KCl (0,1 mol/l), glukózu (0,025 mol/l) alebo etanol (0,025 mol/l) a bunky (1,5 mg suchej hmotnosti) vyrastené do stacionárnej fázy v semisyntetickom médiu s glukózou (5 g/l), konečné pH 4,3, teplota 30 °C. Spotreba kyslíka sa merala polarograficky s vibračnou zlatou elektródou (Kollár, K.: Acta Facult. Rer. Natur. Univ. Commeniane **12**, 371, 1968). Ako vidieť z obrázku pri koncentrácii 0,2 μg/ml mucidin až úplne inhiboval oxidáciu tak glukózy, ako aj etanolu. Za anaeróbnych podmienok však spotreba glukózy bunkami kvasiniek z inkubačného média nebola ovplyvnená. Túto skutočnosť demonštruje obr. 5, ktorý udáva vplyv mucidinu na anaeróbny metabolizmus glukózy u kvasiniek S. cerevisiae. Na ose x tohto obrázku t je čas v minutách a na ose yg je spotreba glukózy v μg/ml. Inkubačné médium v atmosfére dusíka pri 30 °C obsahovalo citrát-fosfát (0,1 mol/l), pH 4,4, glukózu (0,050 mol/l), bunky kvasiniek (4,4 mg suchej hmotnosti/ml) a mucidin (0,1—5,0 μg/ml). Koncentrácia glukózy v supernatante po vyzrážaní buniek s kyselinou trichlóroctovou (50 g/l) sa stanovila ortotoluidínovým činidlom (Zender, R.: Clin. Chim. Acta **8**, 351, 1963). Symboly: o — bez mucidinu, c — 0,1 μg mucidin/ml, x — 0,5 μg mucidin/ml, n — — 1,0 μg mucidin/ml a — 5,0 μg mucidin/ml.

Efekt mucidinu na diferenčné cytochrómové spektrum intaktných buniek kvasiniek oxidujúcich glukózu za aeróbnych podmienok je znázornený na obr. 6. Spektrofotometrické kyvety v 3 ml obsahovali citrát-fosfát (0,050 mol/l), pH 4,3, glukózu (0,025 mol/l), bunky kvasiniek (25 mg suchej hmotnosti) a nasledovné prídavky: A — referenčná kyveta: bez prídavku, vzorková kyveta: 40 μg mucidinu; B referenčná kyveta: 150 μmol $H_2O_2$, vzorková kyveta: 80 μg mucidinu a 30 μmol D,L-laktátu alebo zrnká $Na_2S_2O_4$; D — referenčná kyveta: 150 μmol $H_2O_2$, vzorková kyveta: zrnká $Na_2S_2O_4$. Spektrá sa registrovali spektrofotometrom Hitachi Perkin-Elmer, model 356. Z obrázku je zrejmé, že mucidin indukuje redukciu cytochrómu **b**, ale neinhibuje oxidáciu cytochrómov **c** a **a** kyslíkom (obr. 6A, B). Naviac v prítomnosti mucidinu cytochrómy **c** a **a** boli redukovateľné laktátom alebo $Na_2S_2O_4$ (obr. 6 C). Tieto údaje indikujú, že mucidin je špecifický inhibítor respiračného reťazca, účinkujúci medzi cytochrómami **b** a **c** bez sekundárneho účinku na glykolýzu alebo syntézu polysacharidov.



V plnej zhode s týmto tvrdením je vplyv mucidinu na rast buniek S. cerevisiae v tekutom semisyntetickom médiu. Mucidin v koncentrácii 0,5 μg/ml úplne inhiboval rast kvasiniek na etanole (20 g/l) alebo glycerole (20 g/l) ako zdrojoch uhlíka. Na druhej strane mucidin v tom istom rozmedzí koncentrácií znížil aeróbny rastový výťažok buniek rastúcich na glukóze len na úroveň anaeróbneho rastového výťažku (obr. 7). Indukcia tvorby respiračne deficitných mutantov za týchto podmienok sa nepozorovala. Obr. 7 udáva vplyv mucidinu na aeróbne rastové výťažky kvasiniek S. cerevisiae, kde t na ose x je čas v hodinách a z na ose y je počet buniek $\times 10^6$ v 1 ml rastového média. Bunky kvasiniek rástli aeróbne z počiatočnej koncentrácie $5 \times 10^4$ buniek/ml pri 30 °C v semisyntetickom médiu obsahujúcom glukózu (5 g/l) ako zdroj uhlíka a rôzne koncentrácie mucidinu. Anaeróbny výťažok rastu v neprítomnosti antibiotika bol $4 \times 10^7$ buniek/ml. Symboly: 1 — bez mucidinu, 2 — 0,02 μg mucidinu/ml, 3 — 0,05 μg mucidinu/ml, 4 — 0,1 μg mucidinu/ml, 5 — 0,5 až 25,0 μg mucidinu/ml.

Rastový výťažok cytoplazmatického respiračne deficitného mutanta na glukóze nebol ovplyvnený mucidinom. Slabá inhibícia rastu buniek štandardného kmeňa ako aj mutanta sa pozorovala iba v prítomnosti veľmi vysokých koncentrácií mucidinu (100 μg/ml).

Tieto výsledky jasne demonštrujú spôsob biochemického účinku antifungálneho antibiotika mucidinu. Toto antibiotikum sa ukázalo byť selektívnym inhibítorom dýchania interferujúcim s mitochondriálnym transportom elektrónov v mieste medzi cytochrómami **b** a **c** respiračného reťazca.

Na základe znalostí získaných pri štúdiu energetiky klíčenia spór vláknitých húb, možno antifungálny účinok mucidinu vysvetliť primárnou inhibíciou bunečného dýchania. U plesní takáto inhibícia dýchania má za následok pokles cytozolického fosforylačného potenciálu (Atkinson, D. E.: Ann. Rev. Biochem. **35**, 85, 1966; Slayman, C. L.: J. Bacteriol. **114**, 752, 1973), s následnou redukciou bunečných syntéz a zastavením rastu. Na rozdiel od vláknitých húb, kvasinky S. cerevisiae sú vybavené dostatočnou kapacitou glykolýzy, ktorá je schopná udržovať vysoký cytosolický fosforylačný poten-

ciál (Kolarov, J., Šubík, J., Kováč, L.: Biochim. Biophys. Acta **267**, 465, 1972), takže inhibícia dýchania u týchto kvasiniek má za následok iba zníženie aeróbneho rastového výťažku na glukóze. Rast na nefermentabilných substrátoch (glycerol, etanol) je však inhibovaný úplne.

Pre detailnejšie posúdenie miesta a spôsobu účinku mucidinu bolo treba preštudovať ešte efekt tohto antibiotika na oxidatívnu fosforyláciu mitochondrií potkanej pečene.

Mucidin v koncentrácii 1 $\mu$g/ml mitochondriálnych bielkovín úplne inhiboval spotrebu kyslíka izolovanými mitochondriami meranú v prítomnosti NADH-regenerujúcich substrátov (pyruvát + jablčnan, $\alpha$-ketoglutarát + jablčnan) ako aj jantaranu. Obr. 8 udáva vplyv mucidinu na oxidáciu jantaranu izolovanými mitochondriami potkanej pečene, kde c na ose x je koncentrácia mucidinu v $\mu$g/mg mitochondriálnych bielkovín a p na ose y je percento inhibície spotreby kyslíka. Reakčná zmes v objeme 2 ml obsahovala manitol (0,250 mol/l), $KH_2PO_4$ (0,01 mol/l), jantaran draselný (0,010 mol/l), dinitrofenol (0,0001 mol/l), mitochondrie (2—4 mg bielkovín) a mucidin ako je udané v obrázku, konečné pH 7,4, teplota 30 °C. Z obrázku vidieť, že 50 % inhibícia dýchania je pozorovateľná už pri koncentrácii mucidinu 0,125 $\mu$g/mg bielkovín. Na druhej strane oxidácia N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenyléndiamín dihydrochloridu (TMPD) + + askorbátu nebola mucidinom (1—50 $\mu$g/mg bielkovín) ovplyvnená.

Spektrofotometrický záznam redox stavu flavoproteínov, cytochrómov **b** a **c**+**c**$_1$ v mitochondriách za prítomnosti mucidinu je znázornený na obr. 9. Reakčné médium pri teplote miestnosti v objeme 3 ml obsahovalo manitol (0,250 mol/l), $KH_2PO_4$ (0,010 mol/l), Tris-HCl (0,010 mol/l), KCl (0,010 mol/l), konečné pH 7,4 a nasledovné prídavky: MIT = 2,2 mg mitochondriálnych bielkovín/ml, MUC = 2 $\mu$g mucidinu/mg mitochondriálnych bielkovín, SUCC = 30 $\mu$mol jantaranu, PYR = 30 $\mu$mol pyruvátu, MAL = 15 $\mu$mol jablčnanu, TMPD = 0,6 $\mu$mol N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenyléndiamín dihydrochloridu, ASC = 22,5 $\mu$mol askorbátu. Časový priebeh rozsahu oxidácie a redukcie mitochondriálnych redox zložiek sa meral spektrofotometrom Hitachi Perkin-Elmer, model 356 v systéme dual (Chance, E.: in R. W. Estabrook and M. E. Pullman, eds., Methods in Enzymology, Vol. IV., Acad. Press, New York, p. 273, 1957). Tento obrázok jasne ukazuje existenciu tzv. „crossover point" medzi cytochrómami **b** a **c**+**c**$_1$. V tomto ohľade nenašli sa žiadne kvalitatívne rozdiely medzi efektom mucidinu a antimycínu A u mitochondrií oxidujúcich jantaran alebo pyruvát + jablčnan.

Obr. 10 udáva vplyv mucidinu na dinitrofenol indukovanú aktivitu ATPázy mitochondrií potkanej pečene, kde c na ose x je koncentrácia mucidinu v $\mu$g/mg mitochondriálnych bielkovín a p na ose y je aktivita ATPázy vyjadrená ako percento kontrolnej aktivity meranej v neprítomnosti mucidinu. Reakčná zmes v objeme 1 ml obsahovala 250 $\mu$mol manitolu, 25 $\mu$mol sacharózy, 30 $\mu$mol KCl, 10 $\mu$mol Tris-HCl, 6 $\mu$mol ATP, 0,2 $\mu$mol 2,4-dinitrofenolu, mucidin v koncentráciách udaných na obrázku a mitochondrie (1 mg bielkovín), konečné pH 7,4. Po 10 minutách inkubácie pri 37 °C uvoľnený anorganický fosfát sa stanovil v extrakte kyseliny trichlóroctovej metódou Sumnera (Sumner, J. B.: Science **100**, 413, 1944). Z obrázku je vidieť, že mucidin v koncentráciách dostatočných k inhibícii transportu elektrónov respiračným reťazcom neinhiboval dinitrofenol-indukovanú ATPázovú aktivitu mitochondrií. Iba pri relatívne vysokých koncentráciách mucidinu dochádzalo k signifikantnej inhibícii aktivity ATPázy. Aktivita ATPázy mitochondrií meraná v neprítomnosti dinitrofenolu bola len veľmi slabo ovplyvnená mucidinom (1—10 $\mu$g/mg mitochondriálnych bielkovín).

Tab. 2 uvádza údaje o oxidatívnej fosforylácii získané s mitochondriami oxidujúcimi TMPD + askorbát. Za použitých experimentálnych podmienok mucidin (0,62—12,5 $\mu$g/mg bielkovín) neovplyvnil stechiometriu spotrebovaného kyslíka a esterifikovaného fosfátu stanovenú manometricky postupom Chamalaun a Tagera (Chamalaum, R.A.F.M., Tager, J. M.: Biochim. Biophys. Acta **180**, 204, 1969), čo indikuje, že mucidin nemá odpojujúci ani inhibujúci účinok na transdukciu energie v mitochondriách potkanej pečene.

Tab. 2. Efekt mucidinu na oxidatívnu fosforyláciu mitochondrií potkanej pečene, meranú za prítomnosti TMPD a askorbátu ako substrátu. Hlavný priestor Warburgovej baničky v 2 ml obsahoval: sacharózu (0,050 mol/l), KCl (0,015 mol/l), EDTA (0,002 mol/l), Tris-HCl (0,050 mol/l), $KH_2PO_4$ (0,010 mol/l), ATP (0,0005 mol/l), glukózu (0,025 mol/l), 5. I. U. hexokinázy (Sigma, Typ III), 1 $\mu$g rotenonu, sérum albumín (1 g/l), TMPD (0,0002 mol/l), askorbát (0,0075 mol/l), 2,4-dinitrofenol (DNP), alebo mucidin (ako je vyznačené v tabuľke) a mitochondrie (3,2 miligramov bielkovín), konečné pH 7,4. Komínček Warburgovej flaštičky obsahoval 0,2 ml KOH (2 mol/l) a kúsok filtračného papiera. Meranie sa začalo po 7 minútach tepelného vyrovnania pridaním glukózy a hexokinázy z bočného ramena. Meranie sa skončilo po ďalších 20 minutách inkubácie pri 30 °C s kyselinou trichlóroctovou (50 g/l). Anorganický fosfát sa stanovil v supernatante metodou Sumnera (Sumner, J. B.; Science **100**, 413, 1944).

| Mucidin (μg/ml) | DNP (mmol/l) | O (μgatom) | $P_i$ (μmol) | P/O |
|---|---|---|---|---|
| — | — | 3,49 | 3,28 | 0,94 |
| — | 0,25 | 4,01 | 0 | 0 |
| 1 | — | 3,39 | 3,08 | 0,91 |
| 2 | — | 3,21 | 2,86 | 0,89 |
| 10 | — | 3,30 | 3,04 | 0,92 |
| 20 | — | 3,21 | 2,95 | 0,92 |

Kvalitatívne rovnaké údaje ako s mitochondriami potkanej pečene sa namerali aj s izolovanými mitochondriami kvasiniek S. cerevisiae.

Uvedené výsledky jednoznačne ukazujú, že mucidin je špecifickým inhibítorom mitochondriálneho transportu elektrónov na úrovni $bc_1$ komplexu respiračného reťazca, v dôsledku čoho v jeho prítomnosti dochádza k inhibícii dýchania a rastu eukaryotických buniek, ktorých celková energetická potreba aeróbneho rastu je krytá a ATP tvoreným oxidatívnou fosforyláciou v mitochondriách.

Z doteraz popísaných špecifických inhibítorov mitochondriálneho transportu elektrónov medzi cytochrómami **b** a **c** sú známe: hydroxynaftochinony (Ball, E. G., Anfinsen, C. B. Cooper, O.: J. Biol. Chem. **168**, 257, 1947), 2,3-dimerkaptopropanol (Slater, E. C.: Biochem. J. **45**, 14, 1949) a antibiotiká typu antimycínu (Rieske, J. S.: in D. Gottlieb, F. D. Shaw, eds, Antibiotics, Vol. I. Springer-Verlag, New York, p. 542, 1967) a 2-alkyl-hydroxychinolín-N-oxidu (Lightbown, J. W., Jackson, F. L., Biochem. J. **63**, 130, 1956).

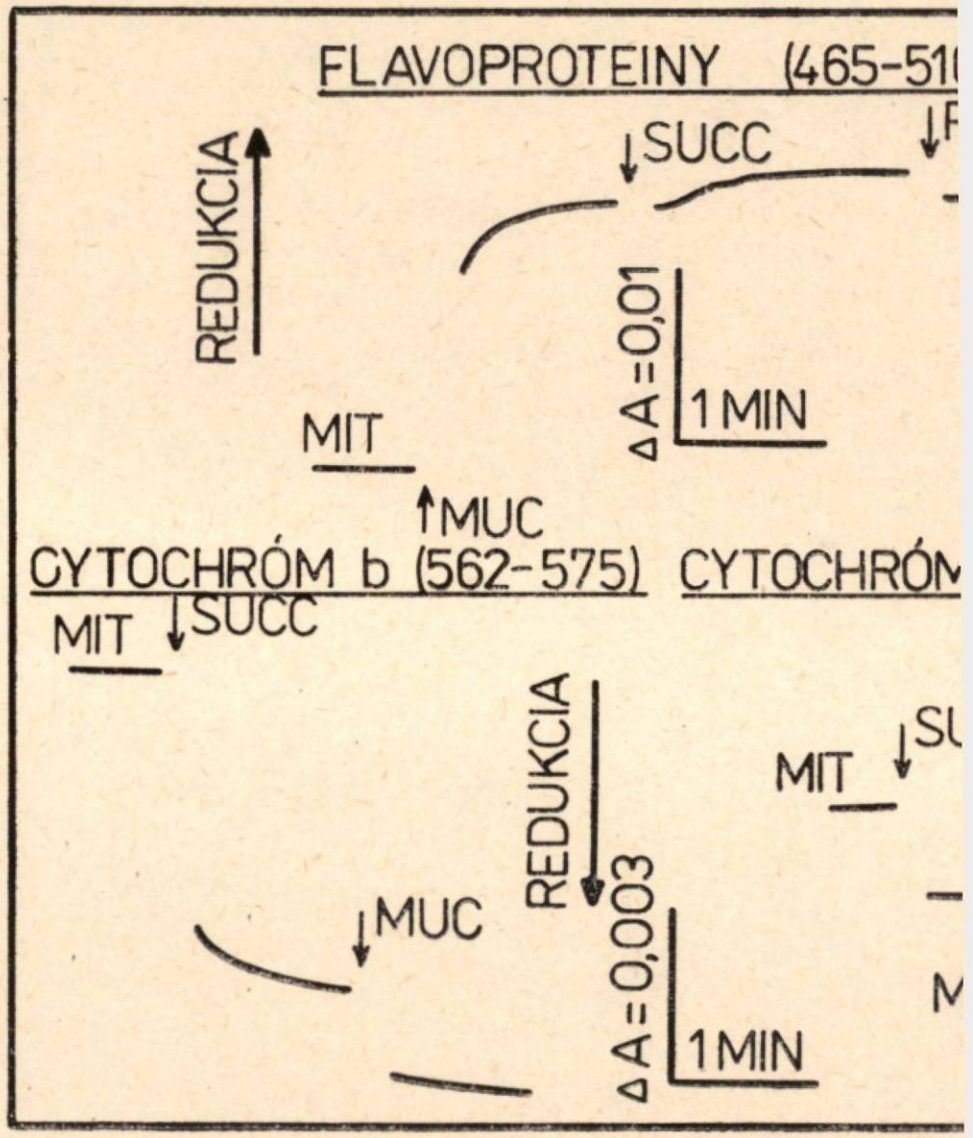
Predmet predkladaného objavu nachádza široké možnosti uplatnenia vo vede a výskume, v zdravotníctve, v poľnohospodárstve a potravinárstve. Možnosti jeho využitia sú predovšetkým v racionálnom prístupe pri klinickej terapii mykotických ochorení farmaceutickým prípravkom Mucidermin-SPOFA (Seznam československých farmaceutických přípravků 1976—78, SPOFA, str. 330) ako aj v boji proti poľnohospodárskym a potravinárskym škodcom (Behúň, M., Šubík, J.: Abstracts IV. Inter. Cong. Food Sci. Technol., Madrid 1974; Šubík, J., Dudíková, E., Takácsová, G., Behúň, M.: Sborník, Podiel vedeckovýskumných, inžinierskych a technických pracovníkov na plnení úloh potravinárskeho priemyslu SSR v 6. päťročnici, str. 319, Bratislava 1976; Šubík, J.: Sborník symposia o výchově zemědělských odborníků a vědecko-výzkumné práci na úseku zemědělství rozvojových zemí, str. 220, Praha 1976).

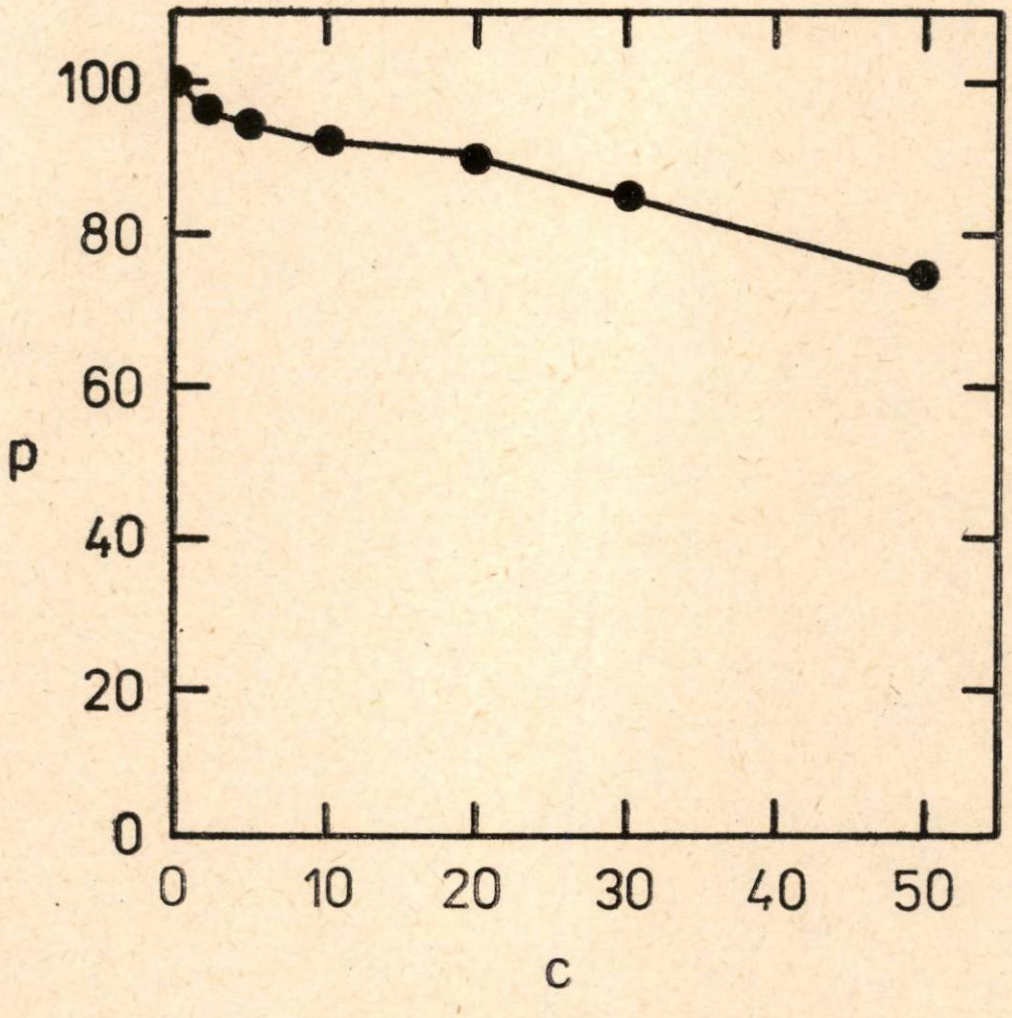
Tento objav stal sa neodmysliteľným základom pre výskum biochemických a genetických mechanizmov nežiadúcej rezistencie húb k mucidinu (Šubík, J.: FEBS LETTERS **59**, 273, 1975; Šubík, J.: in Genetics and Biogenesis of Choloplasts and Mitochondria, Th. Bücher, W. Sebald, S. Werner, eds., North-Holland, p. 473, Amsterdam 1976; Šubík, J., Kováčová, V., Takácsová, G.: Europ. J. Biochem. **73**, 275, 1977; Šubík, J., Takácsová, G.: Molec. Gen. Genet. **161**, 99, 1978) čo viedlo k objavu génov lokalizovaných na mitochondriálnej DNA, ktoré kontrolujú rezistenciu kvasiniek k mucidinu a ktoré sa súčasne podieľajú na tvorbe ubichinol-cytochróm **c** reduktázy v mitochondriách eukaryotických buniek.

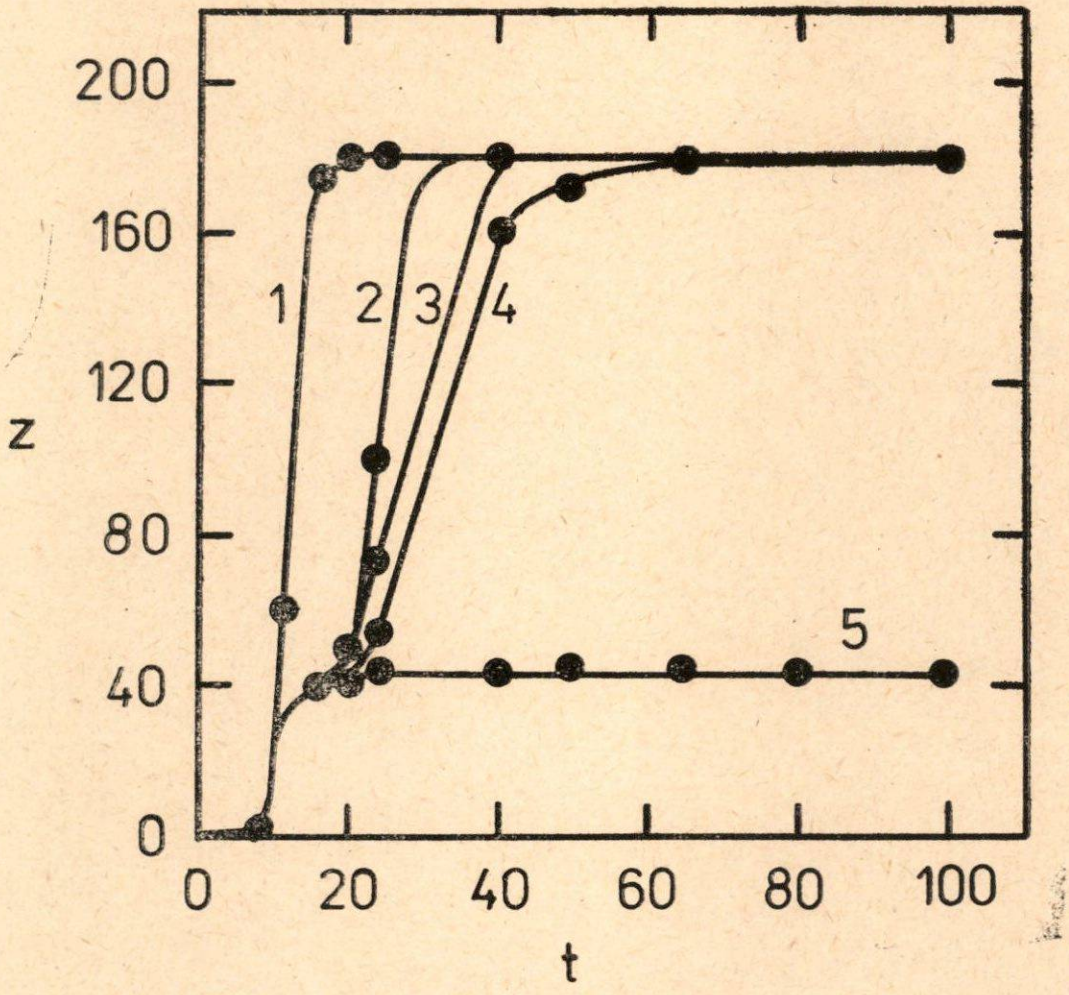
Predmetný objav dal tiež podnet k izolácii mutantov kvasiniek rezistentných k mucidinu (Šubík, J.: Aut. osvedčenie č. 184 089; Šubík, J., Takácsová, G.: Aut. osvedčenie číslo 197 796), ktoré sú využiteľné v základnom výskume pri štúdiu štruktúry, funkcie, biogenézy a genetiky organel, v hygienickej službe a v priemysle antibiotík pri mikrobiologickom stanovení rôznych antifungálnych látok v prítomnosti mucidinu ako aj pri výskume a získavaní prírodných alebo syntetických analógov mucidinu s cielene volenými biologickými parametrami.

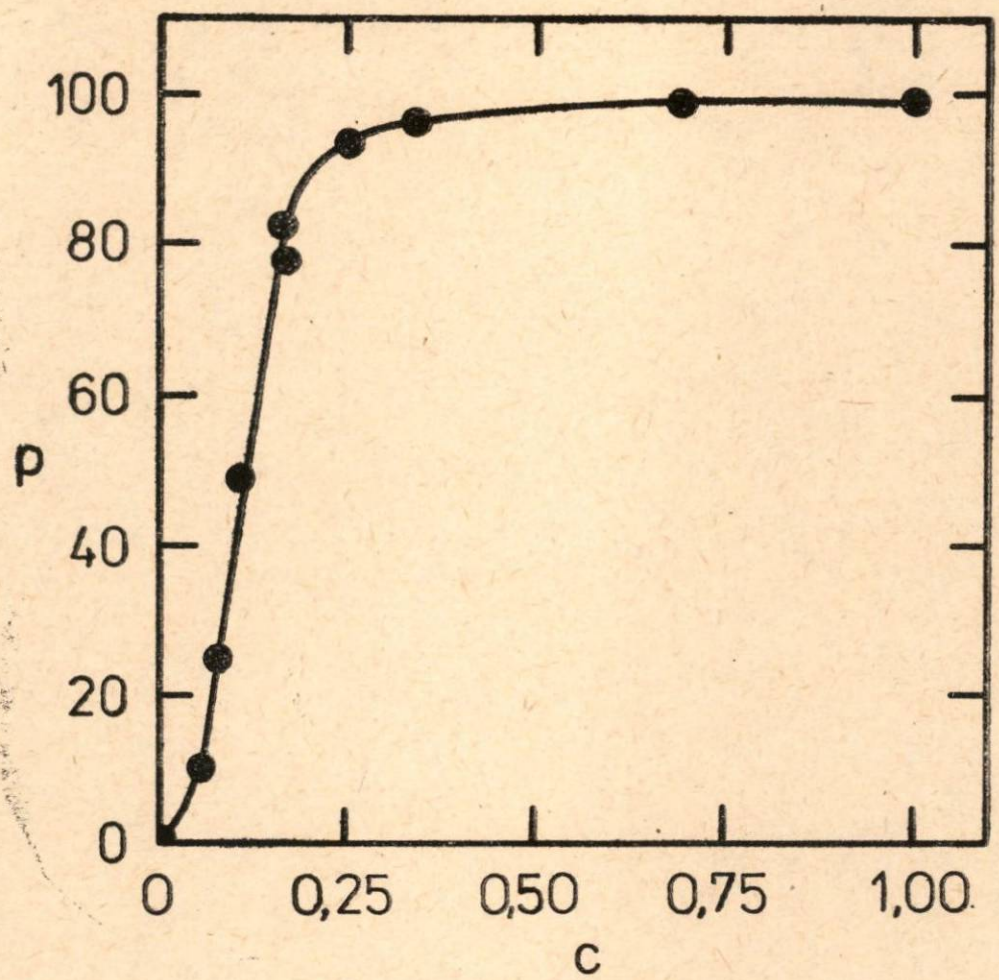
Berúc v úahu vyššie uvedené skutočnosti, možno dnes už jednoznačne konštatovať, že mucidin predstavuje jeden z významných nástrojov štúdia energetických mechanizmov eukaryotických buniek ako aj genetiky ich organel, čo okrem vyššie citovaných prác autora objavu dokumentujú i viaceré práce zahraničných autorov (viď referáty medzinárodnej konferencie v Bandlow W., Schweyen, R. J., Wolf, K., Kaudewitz, F.: Mitochondria 1977, Genetics and Biogenesis of Mitochondria, Wlter de Gruyter and Co., Berlin, New York, 1977).

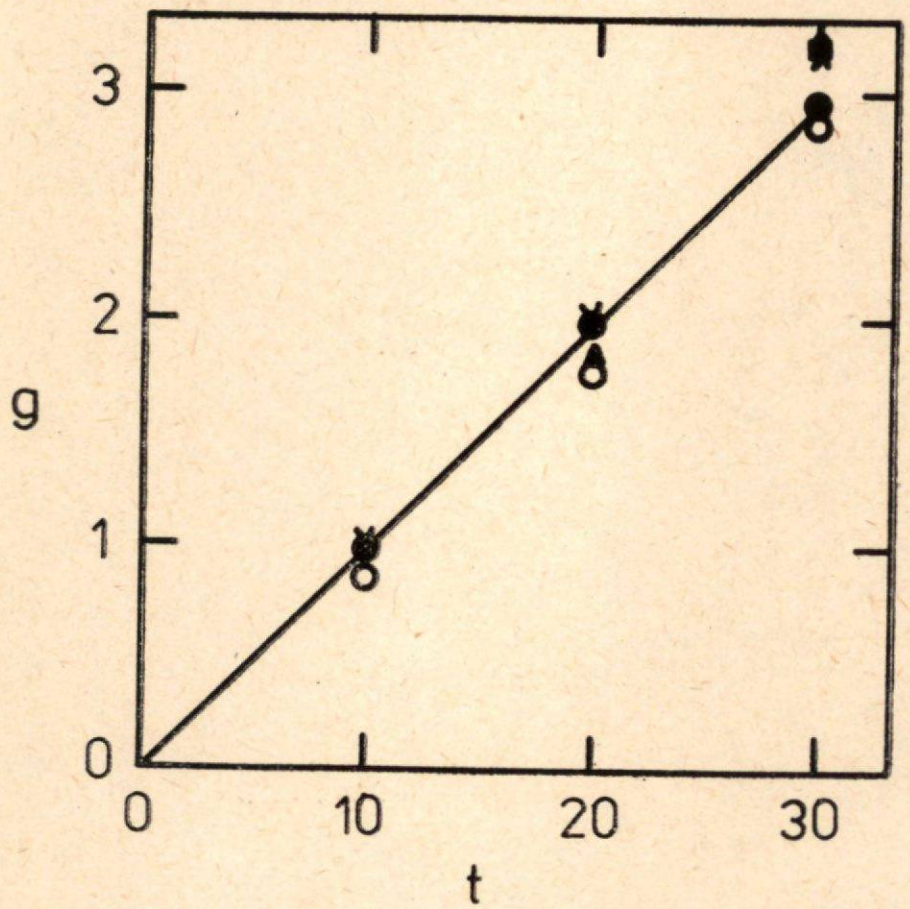
Severografia, n. p., závod 7, Most

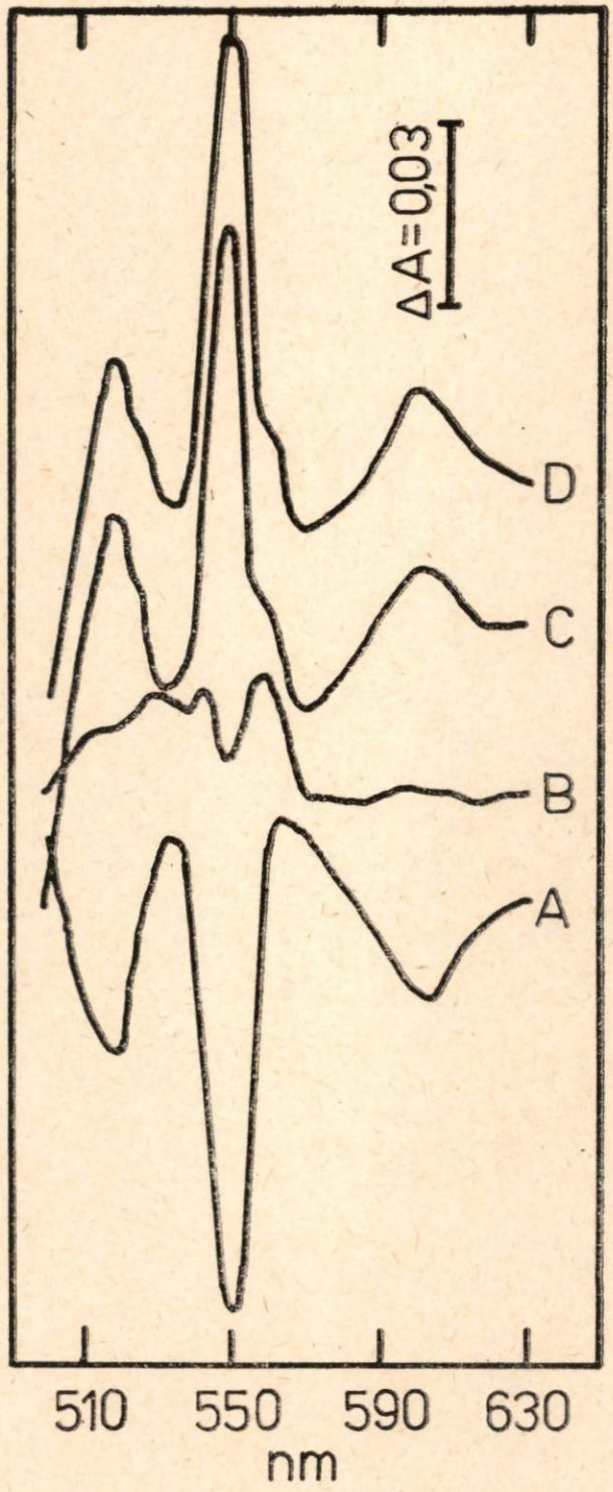

FLAVOPROTEINY (465-51
REDUKCIA
SUCC
ΔA=0,01
1 MIN
MIT
MUC
CYTOCHRÓM b (562-575)
CYTOCHRÓM
MIT
SUCC
REDUKCIA
MUC
ΔA=0,003
1 MIN

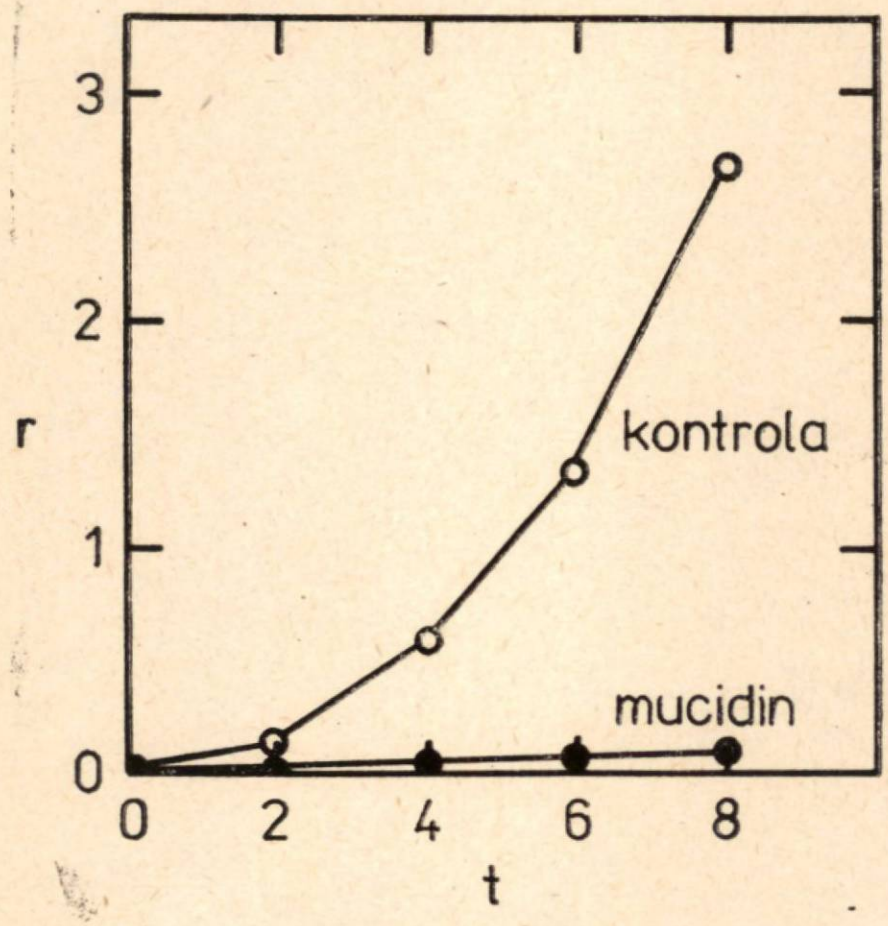

100
80
60
40
20
0
p
0
10
20
30
40
50
c

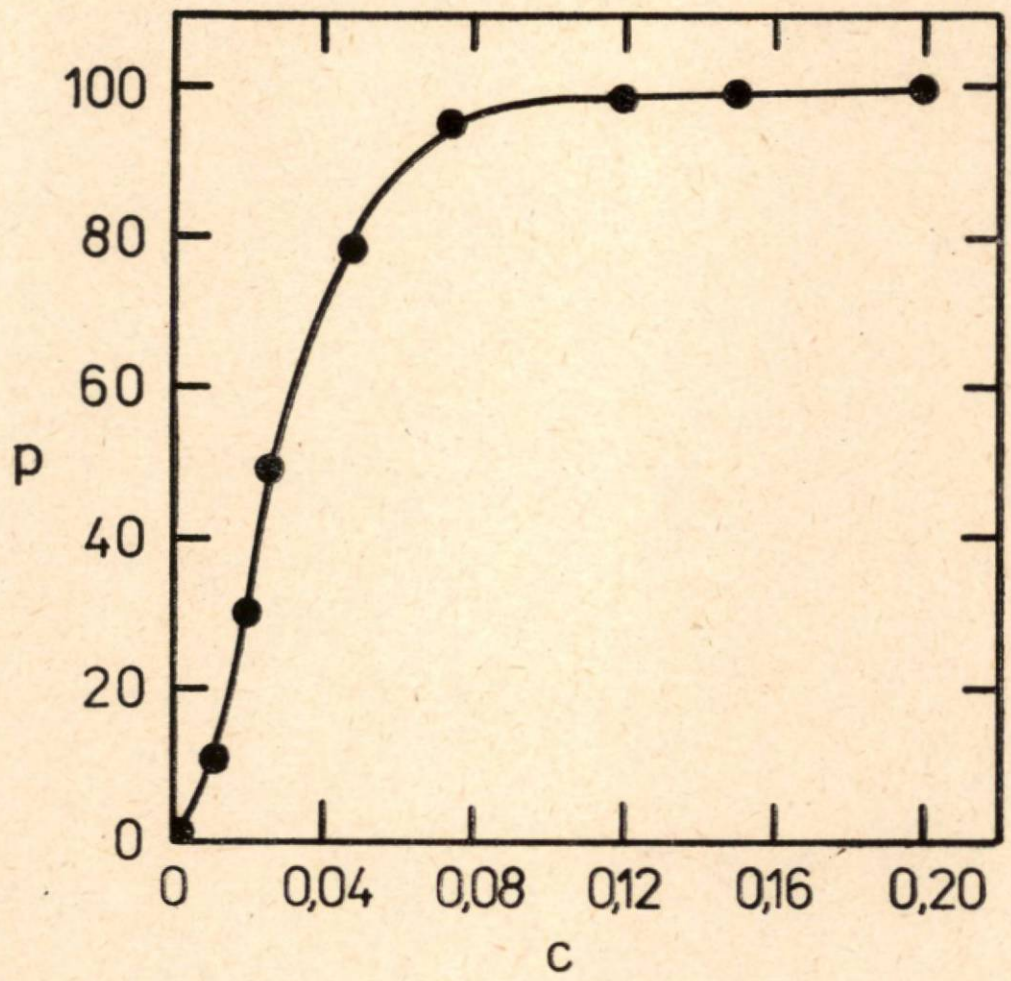

200
160
120
80
40
0
z
0
20
40
60
80
100
t
1
2
3
4
5

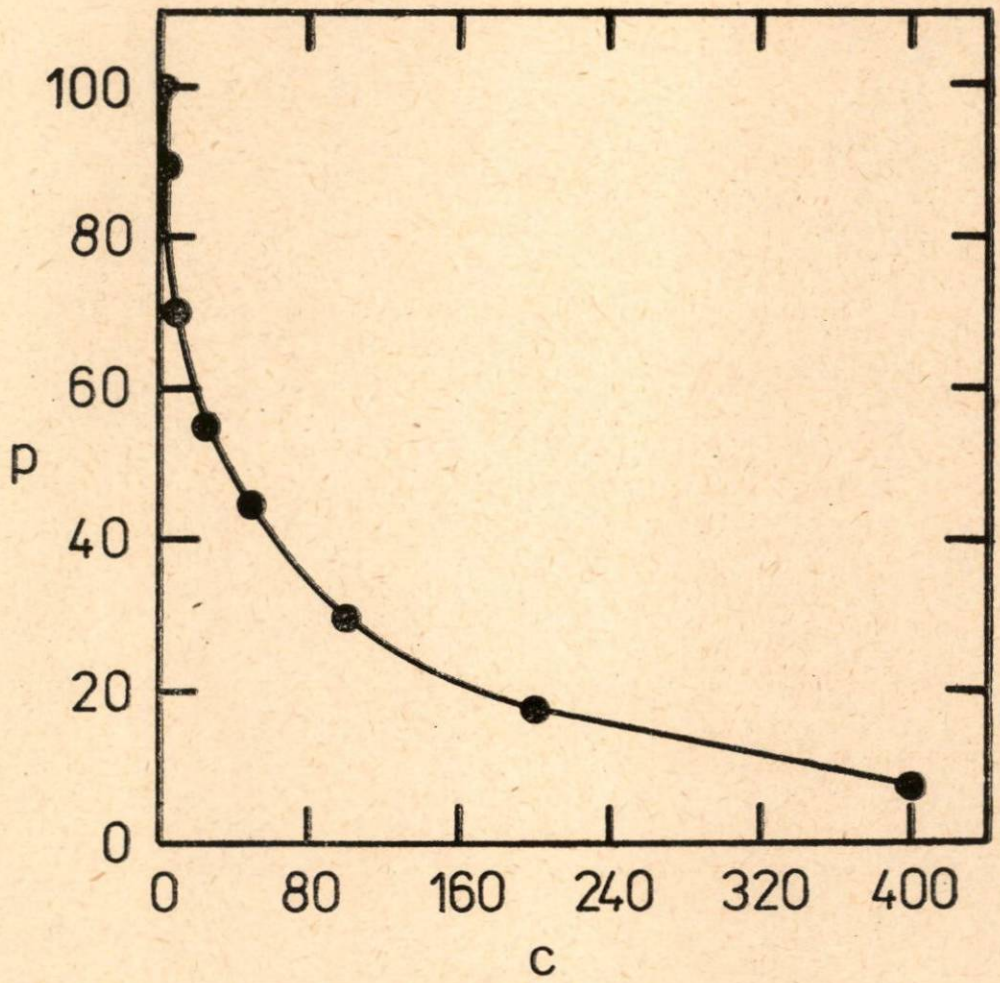

100
80
60
p
40
20
0
0
0,25
0,50
0,75
1,00
c

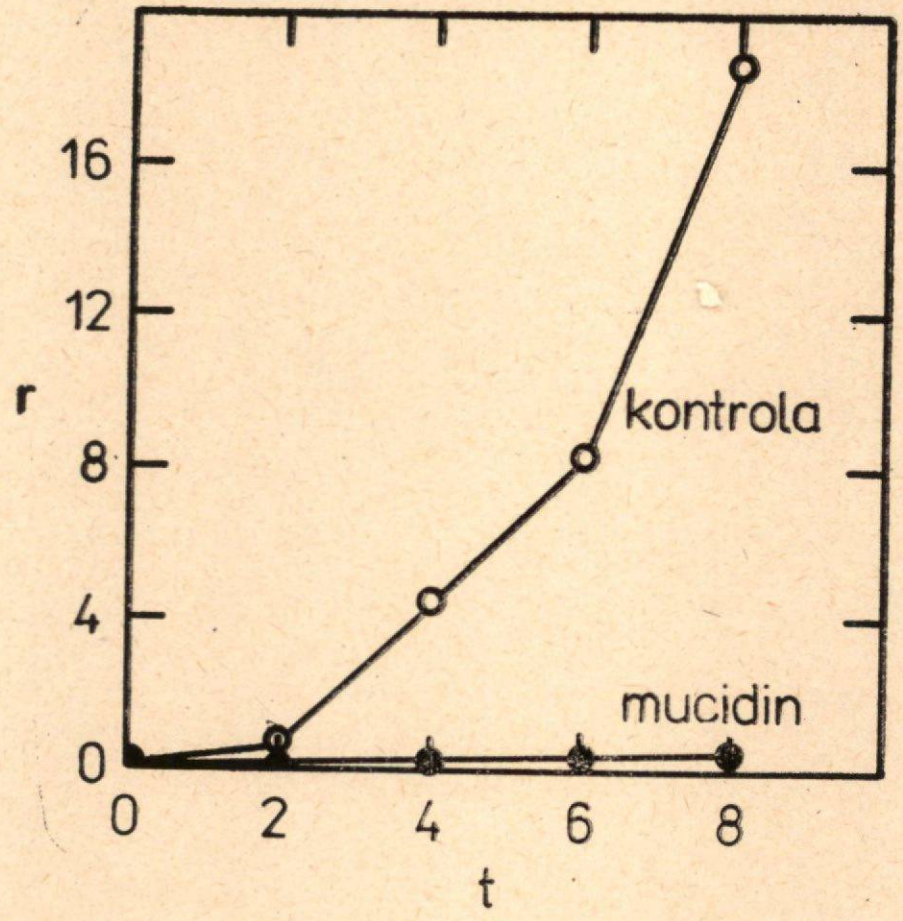

3
2
1
0
g
0
10
20
30
t


ΔA=0,03
D
C
B
A
510
550
590
630
nm


3
2
1
0
r
kontrola
mucidin
0
2
4
6
8
t


100
80
60
40
20
0
p
0
0,04
0,08
0,12
0,16
0,20
c


100
80
60
40
20
0
p
0
80
160
240
320
400
c


16
12
r
8
4
0
kontrola
mucidin
0
2
4
6
8
t