

К. ОВЧАРОВ

**О ФЕРМЕНТЕ У ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ОТЩЕПЛЯЮЩЕМ  
МОЧЕВИНУ ОТ БЕЛКА**

(Представлено академиком А. А. Рихтером 18 VI 1938)

Исследованиями последних лет наши познания о путях образования мочевины в высшем растении значительно пополнились. Brunel и Echevin<sup>(6)</sup> показали, что у ряда высших растений идет интенсивный распад пуринов с накоплением аллантиина; распад происходит с участием ряда ферментов. Обнаружение Shorey<sup>(9)</sup> аллантиина в почве подтверждает выводы авторов. Ранее проведенные работы Klein и Taubek по выяснению мочевиного баланса у высших растений заставляют считать, что возникновение мочевины связано с распадом ряда органических веществ аргининоподобных, т. е. имеющих в своем составе радикалы мочевины.

У грибных организмов мочевина и ее превращение занимают видное место в азотистом обмене. Фитопатогенные грибы не представляют собой исключения; при своем сапрофитном и паразитном развитии они всегда образуют мочевину<sup>(1,3)</sup> и в незначительных количествах тиомочевину<sup>(3)</sup>.

При выращивании некоторых патогенных грибов на средах, содержащих белок, способность грибов образовывать мочевину заметно повышается. Наблюдается зависимость между накоплением мочевины в среде и скоростью роста гриба. Создается впечатление, что гриб подготавливает питательную среду, ферментативно отщепляя мочевину от белка в виде уже готового соединения, легко усвояемого организмом. Возможность самого процесса подтверждается исследованиями Wada<sup>(10)</sup>, обнаружившего в молоке и печени травоядных «редуктазу», фермент, отщепляющий мочевину от уреимидных групп в белке и в других соединениях. Азотистый обмен грибного организма и характер источников азотистого питания указывают на полную вероятность наличия у грибов фермента деурирования белков, подобного редуктазе Wada.

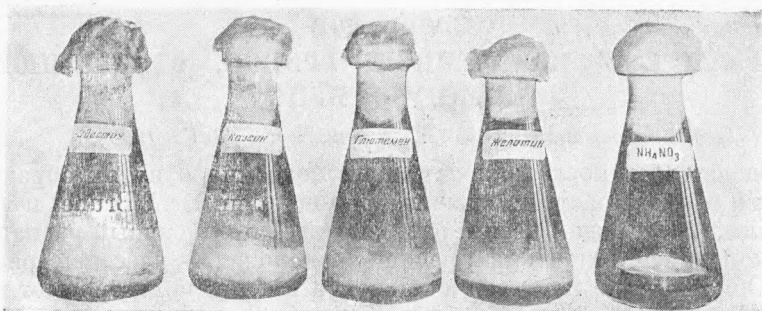
Предварительные опыты с воздействием на белок вытяжек из гриба и питательной среды после роста на ней гриба показали, что в присутствии антисептиков происходит отщепление мочевины в количествах, вполне достаточных не только для качественных установлений, но и для количественного определения.

Опишем примененный нами метод количественного определения активности фермента, деурирующего белок. В 4 колбы Эрленмейера вносились:

Колбы № 1 и 2 :	среды из-под гриба . . .	20 см <sup>3</sup>
	желatina . . . . .	1.5 г
	толуол + хлороформ	
Колбы № 3 и 4 :	среды из-под гриба . . .	20 см <sup>3</sup>
	толуол + хлороформ	

Все колбы оставлялись на сутки при температуре 33°. Этого времени достаточно, чтобы в колбах № 1 и 2 фермент, находящийся в среде, отщеплял заметное количество мочевины от желатины.

Через сутки в колбы № 1 и 3 добавлялось по 5 см<sup>3</sup> 10% уреазы и по 5 см<sup>3</sup> фосфатного буфера с рН = 6.78, и колбы помещались на 3 часа в термостат с температурой 33°, после чего в вакууме с магниезальным молоком при температуре 40—50° отгонялся образовавшийся аммиак. Разница между образовавшимся аммиаком в колбе № 3 и в колбе № 4 указывает на содержание мочевины в самой среде, а разница в содержании аммиака в колбе № 1 и в колбе № 2 минус содержание мочевины в среде указывает на интенсивность отщепления мочевины от желатины ферментом, находящимся в среде. Для примера расчетов приведем данные опыта 4 V 1938 г.



В качестве источника фермента белка взята среда из-под месячной культуры *Pythium de Baryanum*, выращенной на глюкозно-минеральной среде с эдонином как источником азота. Результаты определения аммиака следующие:

В колбе № 1	содержалось	12.6	мг
» » № 2	»	7.26	»
» » № 3	»	6.58	»
» » № 4	»	6.16	»

Вычитая из 6.58 мг 6.16 мг, мы получаем 0.42 мг аммиака мочевины, находящейся в среде, а вычитая из 12.6 мг 7.26 мг и 0.42 мг, получаем 4.92 мг NH<sub>3</sub> мочевины, отщепленной ферментом гриба от желатины. Деля пересчет на мочевины, получаем 10.53 мг мочевины. Описанным методом нами была определена активность фермента у трех патогенных грибов: *Verticillium albo-atrum*; *Botrytis cinerea* и *Pythium de Baryanum*. *V. albo-atrum* паразитирует в сосудах ксилемы растения, т. е. развивается вне окружения живыми клетками пораженного растения. *B. cinerea* обычно развивается на плодах, на частях растения, богатых запасными веществами, но жизненно ослабленных в силу неблагоприятных окружающих условий, на растениях, в тканях которых преобладает односторонний процесс белкового распада (4). *P. de Baryanum* поражает всходы и молодые растения различных видов, в сапрофитных условиях усваивает N из различных источников неорганических и органических, особенно хорошо развивается на мочеине (Дорохова) и некоторых белках.

Активность фермента мы определяли в питательной среде и в водной вытяжке из растертого гриба (эндофермент).

Активность ферментов у патогенных и сапрофитных грибов не является постоянной и в большой степени находится в зависимости от состава питательной среды. Для активности многих гидролитических ферментов микроорганизмов большое значение имеет введение в питательную среду веществ—субстрата ферментативной реакции: белков для активности протеаз,

крахмала для амилазы, пектинов для пектиназ и т. д. Механизм такой ферментативной адаптации не является еще окончательно выясненным, но имеется ряд точек зрения [Oppenheimer (8), более новая сводка у Сухо-рукава (4)].

Мы привели определения активности фермента у трех патогенных грибов. Ниже приводим данные активности фермента в 20-дневных культурах *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea* и *Pythium de Baryanum*, выращенных на разных белках. Показатели активности фермента в мг отщепленной мочевины приведены в табл. 1.

Таблица 1

Активность фермента

Источник азота	<i>Verticillium albo-atrum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Pythium de Baryanum</i>	
	Миц.	Среда	Миц.	Среда	Миц.	Среда
Эдестин* . . . . .	14.3	0.9	18.9	4.8	70.0	18.9
Глютенин* . . . . .	1.5	0.0	23.7	3.3	16.8	8.7
Желатина* . . . . .	6.6	0.9	20.8	2.0	31.5	1.5

Рост всех грибов на средах с эдестином, глютенином и казеином был различный, наилучший на эдестине. Картина роста видна из приводимого рисунка для 20-дневной культуры *Pythium* и из табл. 2 для *V. albo-atrum* и *Pythium de Baryanum*; для сравнения показан рост на азотнокислом аммонии.

Таблица 2

Источник азота	Сухой вес мицелия в г	
	<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Pythium de Baryanum</i>
Эдестин . . . . .	1.150	2.490
Казеин . . . . .	0.820	2.330
Глютенин . . . . .	0.730	2.050
Желатина . . . . .	0.200	1.630
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .	0.080	0.210

Повидимому исследуемый фермент имеет большое значение в усвоении азота грибами из белковых веществ и особенно в первый период роста, когда глубокие гидролитические процессы еще не прошли.

Предыдущими исследованиями, проведенными в Институте физиологии растений Академии Наук(5,1,2,3), доказано, что в состав токсических выделений патогенных грибов входят аммиак, мочевина и тиомочевина. Ядовитость мочевины для высших растений устанавливает также и David(7), исследовавшая действие мочи животных на проростки некоторых растений.

В своем сообщении мы указываем на один из путей образования мочевины патогенными грибами. Нами обнаружен у грибов фермент, отщепляющий мочевину от белка в питательном субстрате. Мы предлагаем его назвать д е у р е а з о й.

\* Эдестин получен из обыкновенной конопки, глютенин—из пшеничной муки; белки приготовлены по Osborn'у; желатина обычная, применяемая для микробиологических сред.

Активность деурезы находится в зависимости от азотистого состава питательной среды, при введении белков—от их природы. Деуреза выделяется грибами в питательную среду, но большая часть сохраняется в мицелии как эндофермент.

О свойствах деурезы и ее воздействии на различные растительные белки мы сделаем следующее сообщение.

Институт физиологии растений  
им. К. А. Тимирязева.  
Академия Наук СССР.  
Москва.

Поступило  
19 VI 1938.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. И. Гречушников, ДАН, № 8 (1936). <sup>2</sup> С. Медведева, ДАН, № 7 (1937). <sup>3</sup> К. Овчаров, ДАН, XVI, № 9 (1937). <sup>4</sup> К. Т. Сухоруков, К физиологии иммунитета растений (диссертация), Изд. Акад. Наук СССР (1938). <sup>5</sup> О. К. Эллидина, ДАН, IX, № 8 (1935). <sup>6</sup> A. Brunel et Echevin, C. R. Acad. Sci. URSS (1937); Rev. gén. bot., 50, 590 (1938). <sup>7</sup> R. David, Rev. gén. bot., 49, 588 (1937). <sup>8</sup> C. Oppenheimer, Die Fermente, 1, 417 (1925). <sup>9</sup> E. Shorey, Soil Science, 45, 3 (1938). <sup>10</sup> Wada, Proc. Imp. Acad. Tokyo, 10, 1 (1934).