

К. В. КОСИКОВ

ГИБРИДИЗАЦИЯ КАК ФАКТОР ИЗМЕНЧИВОСТИ У МИКРООРГАНИЗМОВ

ПРИРОДА ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ К СБРАЖИВАНИЮ САХАРОЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 X 1948)

Виды дрожжей *Saccharomyces ellipsoideus* и *S. globosus* отличаются друг от друга по способности сбраживать сахара. *S. ellipsoideus* сбраживает: глюкозу, галактозу, сахарозу, рафинозу и мальтозу. *S. globosus* сбраживает только глюкозу и галактозу. Гибриды между этими видами, как показали наши исследования (¹⁻³), в первом поколении сбраживают все сахара, как и *S. ellipsoideus*, т. е. проявляют полное доминирование; во втором половом поколении, вследствие расщепления, среди культур из одной споры получены 4 группы гибридов, различающихся по способности сбраживать сахара. Из этих 4 групп 2 вели себя как исходные родительские виды; остальные 2 были промежуточными между ними. Одна из этих промежуточных групп сбраживала сахарозу и рафинозу, но не сбраживала мальтозы, вторая сбраживала мальтозу, но не сбраживала сахарозы и рафинозы.

Определение способности культур сбраживать тот или иной сахар проводилось в трубках Дунбара на среде: сахара 20%, экстракта дрожжевого автолизата (Difco) 0,3%. Если в течение 10 суток выделения CO₂ не наблюдалось, считалось, что испытываемая культура не способна сбраживать сахар. Те из наших гибридных культур, которые сбраживали сахарозу (каждые 2 культуры из 4, происходящих от 4-спорового гибридного аска), всегда начинали выделять CO₂ в первые сутки; не выделявшие CO₂ в первые сутки не давали этого выделения и в последующие 9 суток. Следовательно, проявление признака, связанного с образованием фермента сахаразы, наследовалось четко, никаких промежуточных форм, нуждающихся для сбраживания сахарозы в периоде адаптации, в пределах 10 суток, отмечено не было.

Был поставлен вопрос, можно ли гибридов, не сбраживающих сахарозы, приспособить к сбраживанию этого сахара, если содержать их на среде с сахарозой в течение более длительного периода времени. Будет ли какое-либо различие в приспособлении между гибридами, не сбраживающими сахарозы, и культурами исходного вида *Saccharomyces globosus*, также не сбраживающими этого сахара? Для выяснения этого вопроса были проведены три различных опыта по приспособлению к сахарозе.

Как уже отмечалось, среди гибридов *Saccharomyces ellipsoideus* × *S. globosus* были 2 группы, не сбраживающих сахарозы: I группа — не сбраживающие сахарозы, но сбраживающие мальтозу, и II груп-

па — не сбраживающие ни сахарозы, ни мальтозы. В опытах испытывалось по 12 культур из одной споры от каждой группы. Контролем служили 10 культур из одной споры *S. globosus*.

Опыт 1. Опытные культуры I и II групп гибридов и контроль в течение 97 суток содержались в пробирках с газоулавливателями на среде: сахарозы 2%, экстракта дрожжевого автолизата 0,3%. Оказалось, что в течение этого периода из 12 культур I группы начали сбраживать сахарозу 4. 1-я из них начала сбраживать на 11-е сутки, 2-я на 74-е сутки, 3-я на 94-е сутки и 4-я на 96-е сутки. Из II группы, как и из контроля, ни одна культура не начала сбраживать сахарозу.

Опыт 2. Опытные культуры и контроль содержались в трубках Дунбара на той же среде, как и в предыдущем опыте, с добавлением 0,5% глюкозы. В первые 3 дня было отмечено брожение во всех опытных и контрольных культурах по незначительному, но вполне отчетливому выделению CO_2 . Это брожение, с соответствующим размножением клеток, было за счет глюкозы, так как глюкозу сбраживают все виды рода *Saccharomyces*. Но после 3—4 дней брожение прекратилось во всех культурах вследствие того, что оставшаяся сахара не подвергалась гидролизу. Однако через короткий промежуток времени все культуры гибридов I группы начали сбраживать сахарозу, т. е. приспособились при этих условиях опыта за период от 6 до 12 суток после заражения пробирок. Брожение сахарозы продолжалось от 10 до 15 суток. Ни одна культура из II группы гибридов и из контроля не начала сбраживать сахарозу в течение 97 суток.

Опыт 3. Для более точного учета сбраживания испытуемого сахара опыт был проведен с теми же культурами в колбах с затвором Мейсля. Колбы взвешивались через сутки и убыль в весе вследствие выделявшегося при брожении CO_2 показывала интенсивность и продолжительность брожения. В каждую колбу вливалось 50 см³ среды: 2% сахарозы, 0,75% глюкозы и 0,5% экстракта дрожжевого автолизата.

Результаты опыта представлены на рис. 1. Первый подъем кривой относится за счет брожения глюкозы и для всех культур примерно одинаков. Второй подъем кривой обусловлен сбраживанием сахарозы. Здесь, так же как и в предыдущем опыте, все культуры I группы гибридов после сбраживания глюкозы довольно быстро начали сбраживать сахарозу (I). В отличие от предыдущего опыта, часть культур II группы гибридов (6 из 9) также начала сбраживать сахарозу, т. е. приспособилась в этих условиях опыта за период от 14 до 40 суток после посева (II). Из 8 культур контрольной группы только одна начала сбраживать сахарозу на 67-е сутки после посева ее в колбу (III).

Из приведенных данных следует, что время, требующееся для приспособления к сбраживанию сахарозы, неодинаково для различных гибридов. Те гибриды, которые не сбраживают сахарозы, но хорошо сбраживают мальтозу (I), значительно быстрее адаптируются к сахарозе, чем гибриды, не сбраживающие ни сахарозы, ни мальтозы (II). Для объяснения этого факта можно было бы предположить, что при соответствующих условиях мальтаза, появление которой у I группы гибридов естественно ожидать, начинает гидролизовать сахарозу, действуя как α -глюкозидаза. Weidenhagen (4) установил, что, действуя мальтазой на сахарозу при pH = 7 (оптимум для мальтазы), можно гидролизовать сахарозу с такой же скоростью, как и мальтозу. При оптимуме для действия сахаразы (pH = 4,7) мальтаза не разлагает сахарозы. Следует иметь в виду, что эти данные получены при эксперименте с растворами и могут не соответствовать тем процессам, которые происходят в живой клетке. Из наших экспериментов следует, что приспособление к сбраживанию сахарозы наступает значительно быстрее после предварительного сбраживания глюкозы. Выделяющийся при этом CO_2 может вызвать некоторый сдвиг pH в сторону кислотности, т. е. как раз в обрат-

ном направлении от оптимума мальтазы (исходный рН = 6,6). Далее, в последнем опыте большая часть гибридов II группы приспособилась к сахарозе, хотя эти культуры и не сбраживают мальтозы. В этом случае возможность объяснить гидролиз сахарозы мальтазой полностью отпадает.

Нам представляется наиболее вероятным объяснение полученных фактов, исходя из биохимических представлений о природе ферментов и их действия в живой клетке. Согласно теоретическим положениям, высказанным и обоснованным А. И. Опариним⁽⁵⁾, ферменты в живой клетке могут находиться либо в адсорбированном на клеточных струк-

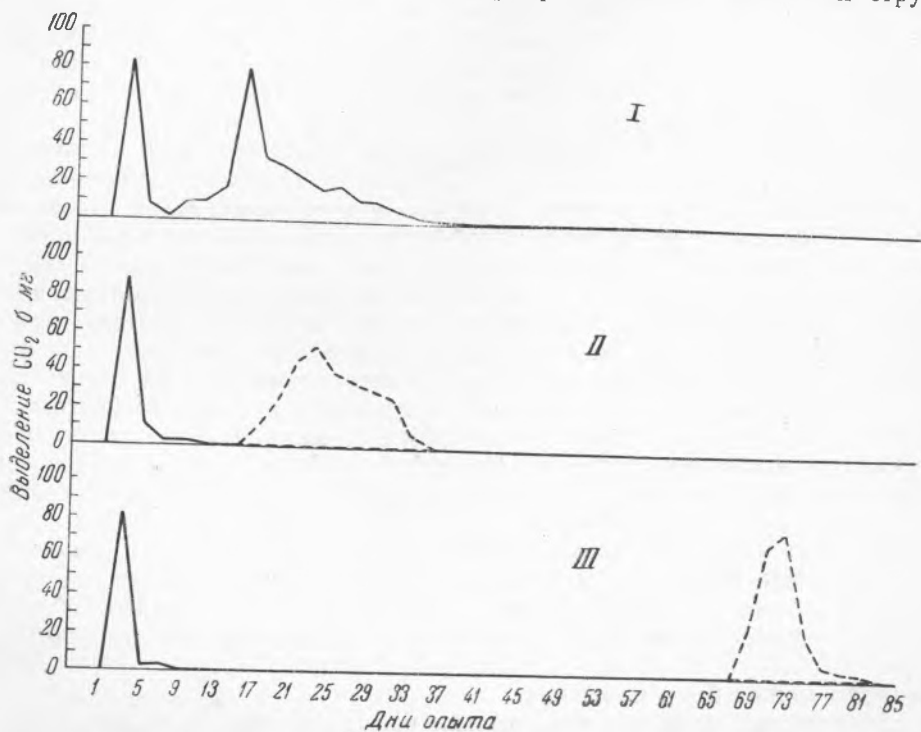


Рис. 1

турах состоянии, либо в растворенном виде. В состоянии адсорбции фермент может действовать синтезирующим образом, тогда как гидролитическое действие фермента может осуществляться только при переводе его в раствор. Дрожжевая сахараза считается типичным гидролитическим ферментом, однако А. Курсанову и Е. Исаевой⁽⁶⁾ удалось показать, что этот фермент, проникая через оболочку клетки из раствора, может адсорбироваться плазматическими структурами дрожжевых клеток.

Наши гибриды первого поколения хорошо сбраживают сахарозу, следовательно, они способны быстро продуцировать фермент сахаразу. Накопляющийся фермент внутри клетки может адсорбироваться на морфологических структурах цитоплазмы, например хондриозомах и др. При образовании спор гибридной клеткой первого поколения морфологические структуры цитоплазмы распределяются между всеми спорами, хотя, по всей вероятности, не так равномерно, как это известно в отношении распределения хромосом. В результате возникают споры, имеющие фермент в адсорбированном на цитоплазматических структурах состоянии. Часть из этих спор (обычно 2 из 4) дает начало культурам второго поколения, неспособным сбраживать сахарозу в течение

10 суток. Для них необходим более длительный период времени для приспособления, связанный с соответствующим изменением в клетке, чтобы фермент начал репродуцироваться в достаточном количестве. Это время может зависеть как от количества фермента, адсорбированного на цитоплазматических структурах, так и от качественных особенностей ферментных систем самих клеток. Из наших данных, например, следует, что наличие способности сбраживать мальтозу дает преимущества при приспособлении к сбраживанию сахарозы. Можно предположить, что фермент мальтаза в биохимическом отношении в какой-то степени родственен ферменту сахаразе, так как присутствие его в клетке способствует более быстрой репродукции последнего. Разнородность II группы гибридов по способности приспособляться к сбраживанию сахарозы может быть объяснена неравномерностью распределения адсорбированного на цитоплазматических структурах фермента сахаразы при спорообразовании.

Особенный интерес представляет факт приспособления к сахарозе контрольных культур *Saccharomyces globosus*. Проводя биохимическим путем определение активности сахаразы у различных форм дрожжей, В. В. Юркевич не обнаружил какой-либо активности этого фермента в клетках культуры *S. globosus*.

Если для приспособления гибридов I и II групп необходимо допустить стимулирующее влияние сахарозы при выработке системы репродукции фермента сахаразы в клетке, предполагая наличие этого фермента в адсорбированном состоянии на цитоплазматических структурах, то для объяснения приспособления контрольных культур *Saccharomyces globosus* необходимо также предположить и возникновение самого фермента под влиянием сахарозы. Специфический субстрат в данном случае выступает как активный фактор, направленно вызывающий возникновение новой, специфической ферментной системы в клетке.

Следует отметить, что возникшие таким путем изменения в клетках, как показали наши исследования (неопубликованные данные), при замене в субстрате специфического углевода, вызвавшего приспособление, другим углеводом могут исчезнуть. Это показывает, что возникшая в процессе приспособления система репродукции фермента неустойчива и легко может быть нарушена.

Можно предположить, что только частые и повторные изменения в том же направлении могут наследственно закрепить приобретенную дрожжевыми клетками в процессе приспособления способность быстро репродуцировать фермент вне зависимости от предварительного выращивания их на специфическом субстрате, как это имеет место в отношении тех гибридов, которые начинают сбраживать сахарозу в первые сутки, и исходного вида *Saccharomyces ellipsoideus*.

Поступило
5 IX 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. В. Косиков, Микробиология, 16, в. 6 (1947). ² К. В. Косиков, ДАН, 61, № 4 (1948). ³ В. И. Кудрявцев и К. В. Косиков, Микробиология, 16, в. 6 (1947). ⁴ W. Weidenhagen, Ergebnisse der Enzymforschung, 2, 90 1935. ⁵ А. И. Опари́н, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6 (1937). ⁶ А. Курсанов и Е. Исаева, Биохимия, 9, в. 5 (1944).