

Г. С. КИТАВИН

К ВОПРОСУ О ЗНАЧЕНИИ ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ КАТАЛАЗЫ ГРИБОМ *ASPERGILLUS NIGER*

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 IX 1951)

При определении ферментативной активности в тех или иных живых объектах очень важно правильно оценивать степень изменения ее под влиянием различных факторов внешней и внутренней среды.

Недавно (1) нам удалось установить, что при действии сублетальных дозировок сулемы активность глюкозооксидазы и каталазы в аспергилле повышается в десятки раз. Подобное же возрастание каталазы, и притом за несколько часов, наблюдалось нами и на дрожжах (1, 2). Изменение осуществлялось в данном случае под влиянием чуждого организму фактора — ртути.

В излагаемых ниже опытах нам удалось, при исключении добавки железосодержащей соли из питательного раствора, получить грибной мицелий со значительно пониженным уровнем каталазы, который, однако, сильно возрастал через 2—3 часа после введения железа. Здесь мы имеем дело уже не с чуждым клетке фактором — сулемой, а с одним из факторов питания — железом, с которым организм встречается в любой естественной и искусственной среде обитания.

Выращивание гриба осуществлялось в конических колбочках объемом в 100 мл, на поверхности 40 мл питательного раствора, содержавшего 10% сахарозы, 0,3% NH_4NO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,02% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с добавлением 0,005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ или без него. Температура культивирования 32°. Кислоты определялись ранее описанным методом (3). Активность каталазы измерялась перманганатометрическим методом в модификации С. С. Елизаровой и М. Н. Мейсель по разности кипяченой и некипяченой проб (4) в 30 мг сырого веса гриба, а в опытах с сулемой — в $\frac{1}{3}$ объема взвеси данной навески, растертой в фосфатном буфере (т. е. в 10 мг грибницы). Активность каталазы выражена в виде константы мономолекулярной реакции, умноженной на 10^3 . Столь малые навески (30 мг) позволили провести анализ срезов верхней стороны мицелия (преобладание гиф воздушного мицелия) и нижней стороны (гифы субстратного мицелия), а также склероциев. При этом обнаружены закономерные различия в активности каталазы различных частей грибницы, что может иметь методическое значение при анализе плесневых грибов на активность содержащихся в них ферментов, в частности при выборе проб для анализа.

В опыте, приведенном в табл. 1, для половины колб питательный раствор готовился без сернокислого железа. Конечно, это не значит, что железо как элемент было полностью исключено из питания гриба, ибо прочие соли употреблялись без особой очистки (марка «х. ч.»), а

Таблица 1

Влияние исключения железа из состава солей питательного раствора на рост, образование кислот и активность каталазы у *Aspergillus niger*

	Сроки после засева в сутках					
	3		5		8	
	5 мг% FeSO ₄	без железа	5 мг% FeSO ₄	без железа	5 мг% FeSO ₄	без железа
Сырой вес мицелия со склероциями в г	6,02	3,87	5,82	4,95	5,65	5,96
Кислотность в мг-экв/мл	0,041	0,129	0,047	0,361	0,020	0,525
Лимонная кислота в г	0,069	0,270	0,074	0,751	0,020	1,012
Щавелевая кислота в г	0	0	0	0	0	0
Глюконовая кислота в г	0,023	0,031	0,028	0,030	0,012	0,020
Каталаза ($\kappa \cdot 10^3$) в 30 мг сырого веса:						
Склероции	196,1	Склероц. нет	158,3	Склероц. нет	117,0	67,7
Верхняя часть мицелия	72,0	18,4	36,2	15,8	45,4	17,7
Нижняя часть мицелия	41,0	26,2	35,4	23,9	40,8	47,0

сахароза — в виде продажного сахарного песка. Однако только благодаря неполному исключению железа мы и получили близкие по весу грибницы, необходимые для сравнения их биохимической активности.

Поскольку мы имеем дело не с отсутствием железа в питательном растворе, а лишь с недостатком его, то, как это видно из табл. 1, в нарастании сырого веса гриба имеется лишь сравнительно небольшое отставание, а к 8-м суткам положение полностью выравнивается.

Весьма интересно резкое увеличение образования лимонной кислоты при исключении железа из состава солей питательного раствора. Угнетающее влияние железа на образование лимонной кислоты отмечалось нами и ранее (5).

Вероятно, железо при этом антагонистически парализует стимулирующее действие имеющегося в питательном растворе цинка. Другие наши опыты показали, что при действии массивных (0,5—1%) дозировок сернокислого цинка на готовую грибную пленку (выращенную при добавке железа) процесс образования лимонной кислоты резко активизируется.

Данные табл. 1 по каталазе прежде всего показывают, что склероции, особенно в молодом состоянии, содержат в несколько раз более активную каталазу, чем мицелий.

Общий сырой вес склероциев в этом опыте в варианте с железом к 5-м суткам составлял 1,85 г, т. е. более 1/4 веса всего мицелия. Характерно, что без добавки железа склероции появляются лишь в конце опыта, и качественно они иные — активность каталазы в них меньше.

Если при даче железа содержание каталазы выше в верхней части пленки (т. е. в воздушных гифах), то без добавки железа вырастают пленки с обратным соотношением активности каталазы. Возможно, что в последнем случае небольшое количество железа, имеющееся в виде загрязнений нежелезных солей в питательном растворе, просто перехватывается нижней частью пленки (субстратными гифами гриба).

Из этого опыта следует, что без добавки железа в питательный раствор вырастают пленки с содержанием каталазы в 1,5—2 раза меньшим (даже без учета склероциев).

Таблица 2

Динамика активности каталазы после добавки сернокислого железа под двухсуточную пленку *Aspergillus niger* (активность каталазы выражена через $k \cdot 10^8$ на 30 мг сырого веса)

Время после внесения $FeSO_4$ в часах	Концентрация $FeSO_4$ в мг%				
	контроль	0,1	0,5	2	5
0	7,7	8,5	9,3	9,8	7,6
1	10,0	10,4	13,6	20,7	19,5
2	9,3	10,9	20,7	28,9	28,9
3	11,5	9,3	—	28,9	28,2
5	11,5	13,2	18,3	33,0	30,1
24*	Верхняя часть пленки				
	$\frac{10,3}{7,2}$	$\frac{10,5}{10,6}$	$\frac{34,8}{36,9}$	$\frac{51,8}{40,0}$	$\frac{39,1}{68,8}$
	Нижняя часть пленки				
	$\frac{15,2}{14,2}$	$\frac{17,4}{17,4}$	$\frac{34,8}{35,5}$	$\frac{33,1}{37,6}$	$\frac{31,6}{46,5}$

* Числитель — I ряд, знаменатель — II ряд.

Как показывает опыт, приведенный в табл. 2, пониженный уровень каталазы может возрасти в 1,5—2 раза уже через час после добавки железа. Через 2—3 часа наступает, очевидно, насыщение железом, и достигнутое содержание каталазы сохраняется уже до конца опыта. Динамика каталазы прослеживалась в данном опыте путем отрывания в стерильных условиях пинцетом кусочков грибной пленки (около 70 мг). После промывания водой кусочки обсушивались фильтровальной бумагой и из навески в 30 мг определялась активность каталазы (см. табл. 2, ряд I). Пленки ряда II оставались в покое до конца опыта. Из данных табл. 2 следует, что отрывание кусочков пленки не изменяет общей картины опыта и может быть использовано для прослеживания динамики содержания каталазы. Некоторые неровности динамики каталазы объяснимы, в первую очередь, неодинаковым содержанием ее в верхней и нижней частях пленки.

Таким образом, 0,5—5 мг% сернокислого железа увеличивают образование каталазы в 2—3 раза. Очень характерно закономерное изменение соотношения между активностью каталазы в верхней и нижней частях пленки под влиянием добавки железа. При 0,5 мг% $FeSO_4$ наблюдается равенство в активности каталазы обеих сторон. Концентрация сернокислого железа в 0,1 мг% явно недостаточна для повышения содержания каталазы. С другой стороны, дозы в 10, 50 и 100 мг%, как показал другой наш опыт, вполне аналогичны по действию дозам 0,5—5 мг% сернокислого железа. Резкого оптимума в данном случае не имеется, что и понятно, ибо железо играет роль питательного вещества в образовании каталазы.

Вместо закисного сернокислого железа нами применялось с тем же успехом окисное сернокислое, а также щавелевокислое железо. Напротив, красная и желтая кровяная соль в тех же дозировках (5—10 мг%) не оказала действия на каталазу гриба.

Таблица 3

Действие сулемы и серноокислого железа на образование каталазы в *Aspergillus niger* (после 2 суток роста питательный раствор заменен на 30 мл 20% раствора сахарозы с FeSO_4 и HgCl_2) (активность каталазы выражена через $k \cdot 10^3$ на 10 мг сырого веса)

	Концентрация FeSO_4 в мг%									
	0					10				
Концентрация HgCl_2 в мм . .	0	0,1	0,5	1,0	10	0	0,1	0,5	1,0	10
Сразу после замены питательн. раствора . . .	6,2	7,3	7,0	6,5	4,8	6,4	6,0	7,1	7,9	5,1
Через 3 часа . .	7,1	65,8	27,2	9,2	1,4	12,7	172,0	73,1	10,3	1,4
" 24 " . . .	11,3	204,0	101,5	21,8	1,9	13,4	223,1	147,8	60,7	1,9
" 48 " . . .	8,2	127,1	51,2	1,5	1,2	9,2	127,1	214,3	9,8	1,0
" 96 " . . .	2,5	111,9	67,2	8,2	3,5	7,7	49,5	141,3	10,4	3,0

Железо, таким образом, может явиться фактором, ограничивающим образование грибом каталазы. Однако, как и всякий ограничивающий фактор, концентрация железа имеет лишь относительное значение, ибо, как показывает опыт, приведенный в табл. 3, сулема вызывает бурный рост каталазы и без добавки серноокислого железа. Очевидно, сулема стимулирует использование тех небольших количеств железа, которые без сулемы неспособны быть вовлечены в синтез каталазы. Добавка железа и здесь значительно ускоряет процесс. Это указывает на то, что при действии ртути мы наблюдаем действительно процесс новообразования каталазы.

Кишиневский государственный университет

Поступило
25 VI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1 Г. С. Китавин, Биохимия, 16, 125 (1951). 2 Г. С. Китавин, Уч. зап. Кишиневск. ун-та, 4, в. биол. н. (1951). 3 Г. С. Китавин, Биохимия, 4, 283 (1939). 4 С. С. Елизарова и М. Н. Мейсель, ДАН, 66, 697 (1949). 5 Г. С. Китавин, Уч. зап. Кишиневск. ун-та, 3, вып. биол. н., 31 (1951).