

В. В. ЮРКЕВИЧ и Р. В. ШВЕЙКИНА

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНОЙ ИНВЕРТАЗЫ
У *SACCHAROMYCES GLOBOSUS*

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 V 1954)

В настоящее время известен целый ряд работ, посвященных экспериментальному изменению природы микроорганизмов под влиянием нативных продуктов жизнедеятельности микробов других видов или под влиянием препаратов, полученных из культур других микробных видов (^{1, 2}). В работе К. Косикова (²) установлено, что выдерживание не сбраживающих сахарозу дрожжей *Saccharomyces globosus* в растворе препарата дрожжевой инвертазы стимулирует приспособление этих дрожжей к сбраживанию сахарозы. Возникающая способность сбраживать сахарозу исследуется (^{2, 4}). На основании своих исследований К. Косиков (^{2, 5}) высказывает суждение, что при стимулирующем действии дрожжевой инвертазы, а также специфического субстрата (сахарозы) появляющаяся у *S. globosus* способность сбраживать сахарозу связана с появлением в клетках этих дрожжей способности к репродукции нового для них фермента инвертазы. Однако появление у *S. globosus* нового свойства, способности сбраживать сахарозу, является лишь косвенным указанием на возможное новообразование инвертазы, тем более, что в литературе (⁶) имеются указания на возможность прямого (без гидролиза) сбраживания дисахаридов дрожжами.

В настоящей работе мы поставили задачу выяснить прямыми экспериментами, действительно ли под влиянием препарата дрожжевой инвертазы и специфического субстрата у *S. globosus* появляется способность к образованию инвертазы. Кроме того, мы, выясняя характер действия субстрата на образование фермента, пытались показать, имеют ли значение для образования инвертазы целые молекулы сахарозы, являющиеся субстратом действия этого фермента, или имеет значение лишь фруктозный компонент, к которому дрожжевая инвертаза обладает специфическим сродством (^{7, 10}).

500 мг дрожжей суточной культуры *S. globosus*, выращенной на среде Ридер с 5% десятипроцентного дрожжевого экстракта, двукратно промытых в центрифуге, помещались в 20 мл раствора, содержащего 0,02% препарата дрожжевой инвертазы и 2% глюкозы. Как было установлено А. Опариным и В. Юркевичем (^{3, 8}), в этих условиях дрожжевые клетки адсорбируют большое количество (активность) фермента из раствора. Величина поглощения клетками фермента определялась по убыли активности раствора после пребывания в нем дрожжей (^{3, 8}). Опытные дрожжи, выдержанные в указанных условиях 1,5 часа при 27°, отделялись центрифугированием и двукратно промывались дистиллированной водой по 20 мл каждый раз. Промывные воды собирались и в них определялась активность инвертазы. После промывания навеска опытных дрожжей помещалась в 10 мл 5% раствора сахарозы.

В этих условиях дрожжи бродили 2 часа. Затем добавлялся толуол, ацетатный буфер, и дрожжи подвергались 3-суточному автолизу при 27° и pH 5,9. В автолизированной суспензии дрожжей, разбавленной до 20 мл, определялась активность инвертазы⁽⁸⁾. Определения активности инвертазы во всех случаях проводились в одинаковых условиях, при pH 4,7. Препарат инвертазы был получен нами из пивных дрожжей расы «Пильзенские».

Мы выдерживали опытные дрожжи в растворе сахарозы после их пребывания в растворе с препаратом фермента по следующим соображениям. Одним из нас⁽⁸⁾ было установлено, что брожение не только способствует поглощению, но и является фактором, удерживающим фермент в клетках; в специально проводившихся опытах мы нашли, что поглощенная из раствора инвертаза более прочно «закрепляется» в клетках (сохраняя активность) и значительно меньше отмывается водой, если после поглощения фермента клетки бродили в водном растворе сахара. Следовательно, если инвертаза действительно является компонентом препарата, стимулирующим образование этого же фермента у *S. globosus*, то выдерживание дрожжей в условиях брожения после адсорбции ими фермента должно способствовать влиянию приобретенного фермента на клетки. Кроме того, хорошо известно, что процесс усвоения клетками различных необходимых им веществ связан с основным энергетическим процессом (например, усвоение дрожжами витаминов⁽⁹⁾). Наконец, хорошо известно, что сбраживание сахарозы и моноз, из нее образующихся, стимулирует повышение содержания инвертазы в дрожжах⁽⁶⁾, а К. Косиков⁽⁵⁾ установил влияние сахарозы на появление у *S. globosus* способности сбраживать этот дисахарид.

Проведенные нами опыты каждый раз показывали, что в клетках *S. globosus* после автолиза содержится большая инвертазная активность, чем оставшаяся в клетках активность в результате поглощения ими фермента и отмывания.

Мы поставили ряд вариантов вышеописанного опыта. 1) Раствор с препаратом фермента инактивировался в кипящей водяной бане. После охлаждения до 27° в этом растворе выдерживались дрожжи, которые после промывания помещались либо в 5% раствор сахарозы либо в 5% раствор инверта. 2) После выдерживания в растворе с активным препаратом и промываний дрожжи отравлялись толуолом, а затем к ним добавлялся 5% раствор смеси равных количеств сахарозы и инверта, т. е. исключалось брожение после приобретения клетками компонентов препарата. 3) Исключалось поглощение клетками препарата фермента. Дрожжи выдерживались сначала лишь в 2% растворе глюкозы, а затем (после промывания) выдерживались либо в растворе сахарозы либо бродили на инверте.

Ни в одном из многих ставившихся по каждому варианту опытов образования инвертазы в клетках *S. globosus* не обнаружилось. Посторонней инфекции в наших опытах не наблюдалось (микроскопирование). Цифровые данные представлены в табл. 1.

Данные наших опытов показывают, что поглощение клетками *S. globosus* компонентов препарата дрожжевой инвертазы, а также брожение на сахарозе являются факторами, стимулирующими образование инвертазы у этих дрожжей. Исключение одного из этих факторов в условиях наших опытов не сохраняло эффекта образования. Значение ферментативного препарата как стимулирующего фактора подчеркивается еще тем, что, так же как и в опытах К. Косикова, инактивированный нагреванием препарат не эффективен, следовательно, препарат содержит термолabile фактор, участвующий в данном случае в образовании инвертазы в клетках дрожжей. Вопрос о том, какой из компонентов препарата является этим фактором, мы надеемся подвергнуть специальному исследованию.

Таблица 1

Образование инвертазы в клетках *S. globosus* под влиянием препарата дрожжевой инвертазы и брожения на сахарозе (в мг инверта на 100 мг сырого веса дрожжей)

Порядок выполнения опыта	№№ опытов	Осталось фермента в дрожжах после поглощения и отмывания (по разности)	Найдено в дрожжах инвертазы после автолиза	Образовалось инвертазы в дрожжах
Выдерживание в растворе препарата фермента с глюкозой, промывание, брожение на сахарозе, автолиз	1	68,0	80,1	12,1
	2	60,1	81,0	20,9
Выдерживание в растворе инактивир. препарата, промывание, выдерживание в сахарозе или брожение на инверте, автолиз	1	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0
Выдерживание в растворе препарата фермента с глюкозой, промывание, отравление толуолом, автолиз с сахарозой и инвертом	1	65,0	65,0	0,0
	2	58,6	58,6	0,0
Брожение на глюкозе (без препарата фермента), промывание, выдерживание в сахарозе или брожение на инверте, автолиз	1	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0

Образование в наших опытах инвертазы нельзя отнести за счет, может быть, не обнаруженных анализами, но все же предсуществовавших в культуре *S. globosus* клеток, обладающих активной инвертазой, так как эффект появления фермента наблюдался бы и на инактивированном препарате. Невероятно также предположение о возможном значении здесь неклеточных форм дрожжей, содержащихся в препарате фермента и затем развивающихся, так как получение препарата шло через автолиз клеток в присутствии толуола; если же фильтрующиеся формы выдерживают толуол, то их влияние должно было бы сказаться и в варианте, где исключалось выдерживание опытных дрожжей в сахарозе.

Наши опыты также показывают, что образование нового фермента у *S. globosus* связано с жизнедеятельностью клеток; если исключалось после поглощения фермента брожение этих клеток на сахарозе, то эффект образования не наблюдался, хотя автолиз клеток шел в присутствии сахарозы и инверта. В отличие от опытов К. Косикова, где у дрожжей способность сбраживать сахарозу при стимулирующем действии препарата инвертазы и среды с сахарозой возникала в 27—33% случаев в течение 100 дней, в наших опытах возникновение в клетках инвертазы наблюдалось всякий раз, причем за срок в 3,5 часа. Такое различие, повидимому, объясняется различиями условий, в которых находились опытные дрожжи.

В связи с тем, что *S. globosus* не сбраживает сахарозу, а хорошо сбраживает образующиеся при ее гидролизе монозы, естественно было предположить, что сахаром, специфически стимулирующим образование инвертазы, является не сама сахароза. Можно было думать, что этим сахаром является фруктоза, так как имеющиеся данные (⁷, ¹⁰) говорят о родстве инвертазы к фруктозе и фруктозному радикалу β-фруктозидов. Выяснение данного вопроса представляет принципиальный интерес, ибо известный факт влияния специфического субстрата на адаптивное образование в клетках ферментов в некоторых случаях, повидимому, связан не с поглощением клетками целых молекул обычно неусвояемого субстрата, а с созданием в среде за время приспособления условий медленно идущего разложения субстрата с образованием усвояемого и влияющего на образование фермента компонента.

Для проверки специфичности сахара в нашем случае мы поставили опыты с условиями, повторяющими те, где наблюдалось описанное выше образование инвертазы, причем параллельно равные наzesки *S. globosus* после поглощения препарата инвертазы помещались в 5% растворы: сахарозы, фруктозы, глюкозы и маннозы. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние различных сахаров на образование инвертазы в клетках *Saccharomycetes globosus* (в мг инверта на 100 мг дрожжей)

Сахар, в котором выдерживались дрожжи после поглощения препарата фермента	Осталось фермента в дрожжах после поглощения и отмывания (по разности)		Найдено в дрожжах инвертазы после автолиза		Образовалось инвертазы в дрожжах	
	№ № опытов					
	1	2	1	2	1	2
Фруктоза	66,0	41,5	100,0	66,0	34,0	24,5
Сахароза	56,0	41,0	81,0	53,0	25,0	12,0
Глюкоза	63,0	41,0	83,5	50,0	20,5	9,0
Манноза	66,0	37,5	83,5	46,0	17,5	8,5

Приведенные данные показывают, что наибольшее образование инвертазы наблюдалось при действии фруктозы. Это подтверждает предположение о специфическом влиянии именно фруктозы, но не сахарозы на образование инвертазы и является новым доказательством сродства дрожжевой инвертазы к фруктозе. В том же случае, если адаптация *S. globosus* к сахарозе идет без предварительного поглощения клетками фермента⁽⁵⁾, а дисахарид без предварительного гидролиза все же может усваиваться адаптирующимися клетками, влияние может принадлежать и фруктозному радикалу, но опять-таки не сахарозе. Это вытекает также из природы самого фермента, являющегося не сахаразой, а β -фруктозидазой. Если бы влияние на образование инвертазы принадлежало целым молекулам сахарозы, то влияние дисахарида было бы или единственным или наибольшим; кроме того, трудно было бы объяснить влияние моноз, так как известно, что сахароза в клетках дрожжей из них не образуется. Положительное же влияние глюкозы и маннозы на образование инвертазы можно объяснить известным фактом превращения в клетках дрожжей этих моноз в фосфорные эфиры фруктозы. Это предположение вполне согласуется с тем, что влияние этих моноз меньше, чем фруктозы, и более близко между собой. Сахароза же занимает по величине влияния среднее между глюкозой и фруктозой положение, что вполне соответствует тому, что она действует в нашем опыте лишь после гидролиза на глюкозу и фруктозу.

Уральский государственный университет
им. А. М. Горького
Свердловск

Поступило
13 V 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Тр. конф. по направленной изменчивости и селекции микроорганизмов, Изд. АН СССР, 1952. ² К. Косиков, Тр. Инст. ген. АН СССР, 18 (1950); ДАН, 83, 2 (1950). ³ А. Опарин, В. Юркевич, ДАН, 66, № 2 (1949). ⁴ К. Косиков, ДАН, 87, 2 (1952). ⁵ К. Косиков, ДАН, 80, № 1 (1951). ⁶ R. Willstätter, Untersuch. über Enzyme, I, Berlin, 1928. ⁷ А. Опарин, Сборн. Ферменты, Изд. АН СССР, 1940. ⁸ В. Юркевич, Диссертация, Инст. биохимии АН СССР, 1950. ⁹ М. Мейсель, Функциональная морфология дрожжевых организмов, 1950. стр. 246. ¹⁰ А. Опарин, М. Бардинская, ДАН, 94, № 2 (1954).