

Академик А. И. ОПАРИН, Н. С. ГЕЛЬМАН и И. Е. ЭЛЬПИНЕР

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ *ENDOMYCES MAGNUSII* ПРИ ПОМОЩИ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

Гибель животных и растительных клеток в поле ультразвуковых волн сопровождается в одних случаях поражением внутриклеточных структур при относительной сохранности внешней оболочки, в других — разрывом оболочки и выходом содержимого клетки в окружающую среду (¹). В отношении различных белков выявлена избирательность действия ультразвука, что определяется, повидимому, особенностями строения этих белков. Эти обстоятельства делают заманчивым использование ультразвука для изучения роли клеточных структур и отдельных ферментных систем в биохимии клетки.

В настоящей работе при помощи ультразвуковых волн изучалась локализация в клетке некоторых ферментов, от которой, как известно, в значительной степени зависит их активность и направленность действия (²).

Работа проводилась с 24-часовыми культурами *Endomyces magnusii*, которые выращивались на среде Ридер-дрожжевая вода в эрленмейеровских колбах (объем культуральной жидкости 100 мл). Источником ультразвуковых волн служила плоскопараллельная пьезокварцевая пластинка (диаметр 50 мм). Подводимое к кварцу переменное напряжение составляло 2000—2200 вольт. Частота ультразвуковых колебаний — 740000 гц. Бюкс с 10 мл 1% дрожжевой суспензии, приготовленной на дистиллированной воде, погружался в трансформаторное масло и устанавливался параллельно погруженной в той же жидкости кварцевой пластинке. Расстояние между кварцевой пластинкой и бюксом составляло кратное число полуволн. При таких условиях озвучивания на поверхности водной суспензии в бюксе всегда можно было наблюдать возмущение (рябь). Озвучивание суспензии в течение нескольких минут вызывало помутнение раствора, что свидетельствовало о выходе клеточного содержимого в окружающую водную среду. Более точно о состоянии озвучиваемых клеток мы судили на основании данных об их способности к дыханию и брожению. Дыхание определялось по Варбургу в присутствии глюкозы; брожение учитывалось по количеству сброженной дрожжами в анаэробных условиях 2% глюкозы. Оказалось, что ультразвуковые волны использованной нами интенсивности вызывают угнетение названных процессов, степень которого возрастает по мере увеличения продолжительности воздействия (см. рис. 1). При этом наблюдалось соответствие между количеством погибших клеток и степенью подавления дыхания и брожения озвучиваемой дрожжевой суспензии (на что имеются и литературные указания (³)).

Во всех дальнейших опытах действию ультразвука подвергались 1% суспензии дрожжей, порциями по 10 мл в течение 15 минут. Как правило, дыхание такой озвученной культуры угнеталось на 85—90%, что являлось своеобразным критерием строгой воспроизводимости физи-

ческих условий озвучивания. При этом 50—60% веса исходных дрожжей переходило в окружающий раствор.

Прежде чем приступить к изучению ферментов в клетках нам казалось важным проверить действие ультразвука на ферменты, содержащиеся в дрожжевом соке, полученном по Лебеву (см. табл. 1). Актив-

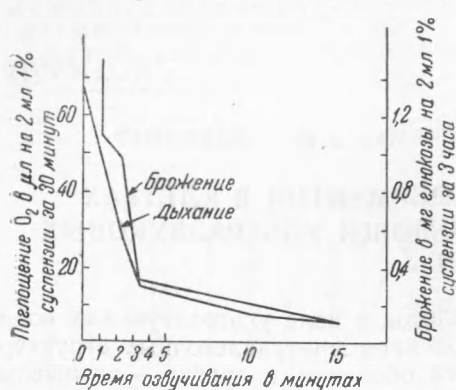


Рис. 1

Оказалось, что при использованной нами интенсивности ультразвука инвертаза не разрушается в то время как активность дегидраз подавляется на 50% при содержании 0,2 мг азота в 1 мл разведенного сока. Существенно, что такое содержание азота имеется и в 1% суспензии дрожжевых клеток, дыхание которой значительно подавляется под действием ультразвука.

Таблица 1

Действие ультразвука на активность ферментов в мацерационном дрожжевом соке различных разведений

Содержание N в мг на 1 мл дрожжевого сока	Инвертаза в мл 0,05 н КМnO ₄ на 1 мл сока за 20 мин.		Дегидразы по скорости восстанов. метиленовой сини на 1 мл сока (в мин.)		Брожение в мл CO ₂ на 1 мл сока за 5 мин.	
	до озвучивания	после озвучивания	до озвучивания	после озвучивания	до озвучивания	после озвучивания
2	10,2	10,8	4,0	4,0	86	86
0,4	5,8	6,1	25	20	—	—
0,2	3,4	3,2	50	75	—	—
0,1	2,1	2,0	120	220	—	—
0,05	1,2	1,3	—	—	—	—

Следует прибавить, что озвученный водный раствор очищенной инвертазы (адсорбция на трехкальциевом фосфате) не теряет своей ферментативной активности при условии сохранения указанной интенсивности ультразвука. Активность фермента не снижалась даже при больших его разведениях, — при концентрации азота 0,005—0,0005 мг в 1 мл раствора инвертазы. Такая устойчивость фермента в поле ультразвуковых волн возможно находит свое объяснение в том, что небелковая часть фермента, представляющая полисахарид, играет роль так называемого защитного агента ⁽⁵⁾.

Опыты по исследованию активности ферментов озвученных дрожжевых суспензий проводились по следующей методике. После озвучивания 1% суспензии дрожжей их дыхание сравнивалось с дыханием нормальных клеток. Затем контрольная и озвученная суспензия фильтровалась через бумажный фильтр при разрежении. Осадок высушивался ацетоном и эфиром (ацетоновые препараты). Фильтрат упаривался в 10 раз

при 28° и остаточном давлении 5 мм (сгущенный фильтрат). В ацетоновых препаратах, которые употреблялись в опыт в виде водных суспензий, а также в сгущенном фильтрате определялась активность дегидраз, инвертазы, глицерофосфатазы и цитохромоксидазы (глицерофосфатаза определялась при pH 5,0 и 30°). Кроме того, в указанных фракциях определялись общий азот, фосфор и сухой вес (табл. 2). Брожения в сгущенном фильтрате обнаружить не удалось, что, повидимому, связано с самым процессом сгущения раствора. Аналогичное явление имеет место и при сгущении разбавленного дрожжевого сока, полученного по Лебедеву.

Таблица 2

Активность ферментов в дрожжевых преператах до и после озвучивания

Исследуемый материал	Активность на 5 мг сухого веса				N	P
	инвертаза в мл 0,05 н KMnO ₄	дегидразы по скорости восстан. ме- тилен. сини	фосфатаза в мг Р	Сух. вес в мг на 100 мл 1% суспензии		
Ацетоновые препараты						
Неозвученных дрожжевых суспензий	1,9	180 мин.	0,03	130	7,4	2,12
Озвученных дрожжевых суспензий	3,4	> 24 час.	0,05	59	4,4	0,88
Сгущенный фильтрат						
Озвученных дрожжевых суспензий	4,9	20 мин.	—	70	—	—

При использованной нами дозе ультразвука, как показали микроскопические наблюдения, в поле зрения имеются частично или полностью опустошенные клетки. Данные химического анализа показывают, что содержание азота и фосфора в ацетоновых препаратах озвученных клеток резко снижается. Это снижение происходит, вероятнее всего, за счет уменьшения в этих препаратах цитоплазматических элементов, переходящих под действием ультразвука в окружающую среду. Что касается химического состава оболочек, то, как известно, в их состав преимущественно входят полисахариды. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что повышенная активность инвертазы в ацетоновых препаратах озвученных дрожжей связана с повышенным содержанием этих ферментов в оболочечных структурах клетки. Последнее соответствует существующим в литературе взглядам (6, 7), основанным на косвенных доказательствах.

Ферменты группы дегидраз, обладающие значительной активностью, обнаруживались только в сгущенном фильтрате озвученных дрожжевых клеток. Иными словами, дегидразы, являясь цитоплазматическими ферментами, легко экстрагируются из дрожжевых клеток ультразвуковыми волнами. Очень чувствительной к ультразвуку оказалась цитохром-оксидаза, не обнаруженная ни в одной из фракций озвученных клеток. Кстати, укажем, что активность дегидраз в фильтрате не является показателем активности этих ферментов в соответствующих интактных клетках. Как показали наши опыты (табл. 1), дегидразы дрожжевого сока более чувствительны к действию ультразвука, чем инвертаза и, возможно, что при экстракции из клеток под действием ультразвука они частично инактивируются.

Чрезвычайно любопытно, что инвертаза, обнаруженная нами в ацетоновых препаратах и сгущенных фильтратах озвученных суспензий *Endomycetes magnusii* в относительно больших количествах, вместе с тем,

по данным А. И. Опарина и В. В. Юркевича⁽⁸⁾ (и по нашим наблюдениям), слабо выявляется при исследовании суспензии интактных клеток и ацетоновых препаратов последних. Даже после продолжительного автолиза В. В. Юркевич⁽⁴⁾ не наблюдал увеличения активности фермента. Это дало автору основание считать, что количество инвертазы в клетках *E. magnusii* незначительно. Однако наши опыты показали, что активность инвертазы увеличивается в 3—4 раза, если предварительно подвергнуть дрожжевую культуру действию ультразвука в течение 15 минут. При этом инвертаза обнаруживается не только в ацетоновых препаратах, но и в фильтрах.

Последнее позволяет высказать предположение, что инвертаза в интактных клетках *Endomycetes magnusii* в действительности содержится в больших количествах, но, вероятно, в ином состоянии, чем это предполагалось раньше.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
и Институт биофизики
Академии наук СССР

Поступило
1 IV 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Е. Эльпинер, Журн. общ. биол., 15, 18 (1954). ² А. И. Опарин, Сопровождение по белку, Изд. АН СССР, 1948. ³ J. Anderson, Bioch. Biophys. Acta, 11, 122 (1953). ⁴ В. В. Юркевич, Диссертация, Институт биохимии АН СССР, 1950. ⁵ И. Е. Эльпинер, Ц. Б. Кац, ДАН, 82, 611 (1952). ⁶ R. Willstätter, Untersuchungen über Enzyme, 1, 1928. ⁷ A. Rothstein, R. Meier, J. Cell. Comp. Physiol., 34, 1 (1949). ⁸ А. И. Опарин, В. В. Юркевич, ДАН, 66, 2, 247 (1949).