Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 4

БИОХИМИЯ

Академик А. И. ОПАРИН, Н. С. ГЕЛЬМАН и И. Г. ЖУКОВА

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА УГЛЕВОДНЫЙ СОСТАВ ДРОЖЖЕЙ И ИХ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

В предыдущих работах ([1,2]) было установлено, что в клетках Saccharomyces globosus 349 содержится инвертаза, активность которой удалось обнаружить путем воздействия на клетки ультразвуковыми волнами. Увеличение активности фермента при воздействии указанным агентом наблюдалось также в клетках Endomyces magnusii.

В связи с этими данными возник вопрос, в каком соотношении находится образование активного фермента, вызываемое воздействием на клетки ультразвуковыми волнами, с образованием этого же фермента в процессе биологического приспособления дрожжей к определенным углеводным субстратам — источникам питания.

В качестве объекта исследования служили дрожжи Saccharomyces globosus 349 и S. paradoxus 37. Известно, что эти дрожжи при длительном выращивании их в присутствии ряда дисахаридов, которые они не могли сбраживать, способны образовывать соответствующие гидролитические ферменты — инвертазу, мальтазу ([3]).

Штаммы таких приспособленных дрожжей, наряду с исходными формами, любезно были предоставлены для настоящей работы К. В. Косиковым, за что мы приносим ему благодарность.

Все культуры с сусла-агара пересевались на 24 часа в пробирки со средой Ридер — дрожжевая вода — глюкоза, а затем содержимое пробирок переносилось в колбы Эрленмейера со 100 мл указанной среды, в которой культура выращивалась при 30° в течение 24 час. Затем клетки отделялись центрифугированием, дважды промывались водой и употреблялись в опыт в виде водных суспензий, приготовленных по весу осадка после центрифугирования. Все расчеты произведены на сухой вес дрожжей, который определялся в каждом опыте.

В первую очередь нужно было разрешить вопрос о том, равно ли количество инвертазы, обнаруживаемой под действием ультразвука в дрожжах S. globosus 349, ее содержанию в дрожжах, выращенных в присутствии сахарозы (S. globosus 74/349-1-105-18). Иными словами, нужно было выяснить, осуществляется ли под влиянием измененного углеводного питания только переход фермента из неактивного состояния в активное или же этот процесс сопровождается увеличением количества фермента.

Сравнению были подвергнуты 2% суспензии дрожжей S. globosus 349 и полученных из них при длительном выращивании на сахарозе S. globosus 74/349-1-105-18; последние, по данным К. В. Косикова хорошо сбраживают сахарозу. Озвучивание было произведено в лаборатории ультразвуковых волн Института биофизики Академии наук СССР * в условиях, ранее разработанных для S. globosus 349 ([2]). Озвучиванию

* Выражаем благодарность И. Е. Эльпинеру за проведение данного опыта.

Таблица 1

Содержание углеводов в исходных и приспособленных к сбраживанию определенных сахаров в дрожжах
(все культуры выращивались перед опытом в течение 48 час. на среде с глюкозой)

Дрожжи	Источник углеводного питания при приспособлении	Содержание углеводов в клетках											
		общее	растворимые в 10% CCl_3COOH		маннан		гликоген		глюкан		сумма фракций	
		1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Исходные S. globosus 349	—	283,7	20,8	7,3	2,0	0,69	209,6	73,8	40	14,99	272,4	96,6
Приспособленные:												
S. globosus 74/349-1-105-18	Сахароза	186,5	9,5	5,09	6,3	3,4	114,5	61,3	39	20,91	169,3	90,8
S. globosus 72/349-M-1-6-21	Мальтоза	150	4,4	2,66	2,5	1,66	93,2	62	30	20	129,7	86,5
Исходные S. paradoxus 37	—	177	5,5	3,1	18,6	10,56	81,3	45,9	48,7	27,5	154,2	87,1
Приспособленные S. paradoxus A37-9/2M-1-39	Мальтоза	180	2	1,01	6,0	3,3	102	56,6	46,4	25,8	156,4	86,88

Примечание: 1 — в μг глюкозы на 1 мг сух. веса дрожжей. 2 — в % от общего содержания углеводов.

подвергались 20 мл той и другой культуры, затем дрожжи отделялись от раствора центрифугированием, остатки высушивались ацетоном, эфиром и взвешивались. В полученных опалесцирующих растворах определялась активность инвертазы. Для этого в 5 мл раствора добавлялось 150 мг сахарозы и 0,5 мл ацетатного буфера pH 4,7 и смесь выдерживалась при комнатной температуре 60 мин. Затем инвертный сахар определялся по Бертрану. Оказалось, что под действием фермента, содержащегося в 5 мл раствора, полученного из S. globosus 349, за это время образовалось 6 мг инверта (в расчете на глюкозу), а в тех же условиях в растворе из S globosus 74/349-1-105-18 образовалось 140 мг. Если принять во внимание, что сухой вес сравниваемых между собой дрожжей, а также ацетоновых препаратов, полученных из них после озвучивания, соответственно равны (в том и другом случае в раствор переводилось 8—10% от веса дрожжей), то приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что активность инвертазы у S. globosus 349 в течение длительного периода выращивания на сахарозе возросла примерно в 20 раз. Повидимому, в этих условиях происходит накопление, синтез фермента, которое, вероятно, обусловливается изменениями в обмене веществ, наступающими при углеводном голодании, и происходящим при этом постепенным переключением на питание необычным для данной формы углеводом.

Исходя из этих соображений, было проведено изучение углеводного состава исходных и приспособившихся к сбраживанию сахарозы и мальтозы дрожжей. При этом предполагалось, что голодание должно сказаться как на количе-

ственном содержании углеводов, так и на их составе. Эти данные имели также значение в связи с тем, что препараты инвертазы содержат маннан, локализующийся в оболочке клетки, который можно было количественно определить при анализе углеводов исходных и приспособленных к расщеплению сахарозы клеток.

Определение углеводов проводилось по методу Тревельян и Харрисон ([3]) при помощи реакции с антроном, синтезированным нами ([4]). Опыты неоднократно повторялись с новыми культурами и давали сходные результаты (табл. 1).

Данные табл. 1 позволяют сделать вывод, что у S. globosus 349 приспособление к новому источнику углеводного питания сопровождается значительным понижением общего содержания углеводов при выращивании как на сахарозе, так и на мальтозе. Полученные при этом штаммы S. globosus 74/349-1-105-18 и S. globosus 72/349-М-6-21 содержат только 15—18% углеводов. У S. paradoxus 37 различия в общем содержании углеводов между исходными и приспособленными штаммами (А-37/9-2М-1-39) не наблюдается, что, возможно, объясняется невысоким содержанием углеводов в исходных формах. (Активность мальтазы в дрожжах S. paradoxus 72/349 проверялась хроматографически ([1]).)

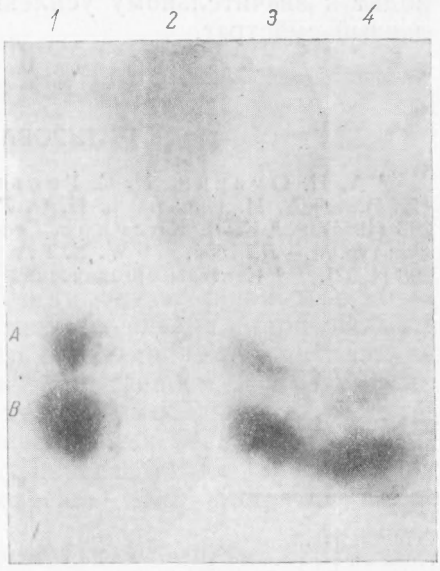


Рис. 1. Хроматограмма гидролизата фракции маннана дрожжей S. globosus 349 и S. globosus 74/349-1-105-18. *1* — свидетели, *A* — глюкоза, *B*—маннноза; *2* — гидролизат гликогена из мышцы; *3* — гидролизат фракции маннана S. glob. 74/349-1-105-18; *4* — то же S. glob. 349. Растворитель: бутанол — этанол — вода (40—11 — 19); проявитель: анилин—фталат

Влияние источника углеводного питания сказывается и на качественном составе углеводов в дрожжах. У всех изученных культур приспособление к новому субстрату питания сопровождается уменьшением количества сахаров, растворимых в 10% CCl_3COOH. Наряду с этим у S. globosus при выращивании на сахарозе увеличивается абсолютное и процентное содержание маннана (от 0,69 до 3,4), а также процентное содержание глюкана (от 14 до 20,9). Содержание гликогена у S. globosus 74/349 и 72/349 несколько снижается по сравнению с дрожжами S. globosus 349. У S. paradoxus, напротив, несколько возрастает содержание гликогена, количество глюкана остается неизменным, а содержание маннана резко понижается.

Эти данные позволяют высказать предположение, что скорость синтеза полисахаридов у дрожжей в известной степени обусловливается источником углеводного питания, о чем свидетельствует усиленное образование маннана в присутствии сахарозы. Количественное определение маннана сопровождалось идентификацией маннозы в гидролизате этого полисахарида при помощи хроматографии на бумаге. Для этого 25 мл 2% суспензии дрожжей S. globosus 349 и S. globosus 74/349 после центрифугирования гидролизовались 30 мин. при 100° с 3 мл 30% КОН. После этого производилось осаждение маннана 3 мл раствора Фелинга. Полученный осадок разлагался 6 *н* HCl, доводится до 5 мл водой и производилось осаждение 5 мл спирта 96°. Полученный осадок без дальнейшей очистки гидролизовался 2,5 часа 6 *н* HCl.

Параллельно ставился гидролиз гликогена. Полученная хромато-

грамма (см. рис. 1) показывает наличие маннана как в исходных, так и в приспособленных к сбраживанию сахарозы дрожжах.

Совокупность изложенных результатов указывает на то, что, несмотря на возможность выделения из исходных дрожжей S. globosus 349 после озвучивания некоторого количества инвертазы, изменение углеводного питания дрожжей, сопровождающееся перестройкой обмена веществ в связи с приспособлением клетки к сахарозе, приводит к значительному усилению синтеза фермента, расщепляющего данный субстрат.

Поступило
24 IX 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. И. Опарин, Н. С. Гельман, И. Е. Эльпинер, ДАН, **96**, № 3, 573 (1954). [2] А. И. Опарин, Н. С. Гельман, И. Е. Эльпинер, ДАН, **97**, № 2, 293 (1954). [3] К. В. Косиков, Генетика дрожжей и методы селекции дрожжевых культур, М.—Л., 1954. [4] W. E. Treveljan, J. S. Harrison, Biochem. J., **50** (3), 298 (1952). [5] Синтезы органических препаратов, **1**, 1949.