

В. В. ЮРКЕВИЧ, Е. С. ЗУЕВА

О ПИТАНИИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК БЕЛКАМИ СРЕДЫ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 XI 1970)

В ряде работ была показана способность клеток дрожжей сорбировать из среды ферментные белки (¹⁻³). Было высказано предположение, что сорбированный клетками белок используется как питательный материал (³). В настоящее время распространено представление о том, что клетки дрожжей могут использовать в качестве органического источника азота лишь аминокислоты или низкомолекулярные пептиды и не могут использовать белки (^{4, 5}). Данная работа посвящена доказательству возможности

питания дрожжевых клеток белками среды.

Таблица 1*

Сорбция β -амилазы голодавшими и голодавшими клетками *Saccharomyces cerevisiae* (активность фермента в миллиграммах мальтозы на 50 мг дрожжей)

№ опыта	Активность исходного раствора	Активность раствора после сорбции	Уменьшение активности раствора	Активность автолизата клеток	% активности, найденной в автолизате
1	144	125,0	19,0	9,0	47
		105,0	39,0	7,8	20
2	144	127,0	17,0	11,8	69
		113,0	31,0	9,9	32
3	144	110,0	34,0	17,5	51
		96,0	48,0	15,7	32

* Над чертой голодавшие клетки, под чертой — голодавшие клетки.

Опыты проводились с *Saccharomyces cerevisiae* раса XII и *Sacch. vini* 437 (Magarach). Дрожжи выращивали на среде Ридер с глюкозой и дрожжевым экстрактом при 30°, после чего они отделялись центрифугированием и трижды промывались водой. Для проведения сорбции белка такие дрожжи в количестве около 500 мг помещались при 30° в 20 мл раствора, содержащего 400 мг глюкозы, 4 мг препарата β -амилазы, выделенного

из бобов сои (⁶), или другой белок. Время нахождения дрожжей в растворах с белком было в разных опытах от 5 мин. до 24 час. Активность фермента определяли по приросту редуцирующей способности при pH 4,7, при 40° за 15 мин., в течение которых сохранялась «начальная» скорость реакции. Редуцирующая способность учитывалась колориметрическим методом с применением 3,5-динитросалициловой кислоты (⁷). Действие фермента останавливалось приливом реактива. Активность β -амилазы в клетках определяли после их автолиза при комнатной температуре в течение 3 суток в 0,25 M ацетатном буфере с pH 4,7 в присутствии толуола. При этих условиях β -амилаза не инактивировалась в процессе автолиза. Используемые нами организмы не образуют β -амилазу.

О том, что β -амилаза сорбируется дрожжевыми клетками, можно было судить как по убыли активности фермента в растворе после пребывания там дрожжей, так и по наличию активности этого фермента в суспензии или автолизате клеток, отделенных от раствора фермента (табл. 1). Наряду с этим факт сорбции клетками белков согласовывался с наблюдаемой в первые минуты убылью белка в растворе, учитываемого методом Лоури, а также устанавливался электрономикроскопическим наблюдением

нием сорбции дрожжевыми клетками железосодержащих белков — гемоглобина и ферритина.

Для электронной микроскопии* клетки фиксировались только глутаровым альдегидом без дополнительной фиксации OsO_4 , ультратонкие срезы также ничем не окрашивались, для того чтобы не маскировать сорбированные ферритин или гемоглобин (рис. 1 см. вклейку к стр. 217).

В случае сорбции дрожжевыми клетками β -амилазы мы всегда обнаруживали меньше активности фермента в клетках, чем та активность, которая исчезла из раствора в результате нахождения там дрожжей (табл. 1).

Бесма существенно было выяснить, происходит ли потеря активности в результате воздействия на фермент живых клеток. Связь сорбции β -амилазы и других ферментов клетками дрожжей с процессом брожения^(2,3) указывает на то, что сорбируют ферменты живые клетки. Это хорошо подтверждается данными электронной микроскопии (рис. 1). Кроме того нами ставились опыты, где клетки дрожжей, отравленные толуолом или убитые нагреванием в кипящей бане, помещались в раствор фермента с глюкозой. При этом никакой сорбции фермента не наблюдалось.

Можно было предположить, что β -амилаза инактивируется вследствие влияния тех изменений среды, которые создаются броющими клетками и имеющимися всегда в культуре мертвыми клетками. Опыты показали, что раствор (содержащий или не содержащий наряду с глюкозой β -амилазу), в котором находились дрожжи, отделенный от клеток не инактивирует добавленную β -амилазу в течение времени сорбции в условиях, при которых идет инактивация фермента в опытах по сорбции.

Таким образом, можно считать, что инактивация β -амилазы осуществляется в результате действия живых клеток на адсорбированный ими фермент.

Если сорбируемый клетками белок используется на питание, то можно было предположить, что голодавшие клетки будут в большей степени его инактивировать. Для проверки этого брались две одинаковые порции биомассы 1-суточной культуры *S. cerevisiae*, одна из которых помещалась сразу в раствор фермента с глюкозой на 1,5 часа, другая — стерильно выдерживалась в воде при 30° 24 часа, после чего помещалась в раствор для сорбции β -амилазы. Результаты представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что голодавшие клетки сорбируют большее количество фермента (уменьшение активности раствора), а активность их автолизатов всегда ниже, т. е. голодавшие клетки в большей степени инактивируют сорбированный фермент. При этом в опытах с голодавшими клетками также было показано, что среда, в которой выдержаны дрожжи, не инактивирует β -амилазу.

Опыты показали, что процесс сорбции и инактивации клетками β -амилазы растянут во времени. Значительная часть β -амилазы сорбируется в первые 5 мин. Большая часть инактивации также происходит в первые минуты. Однако оба эти процесса медленно продолжаются. При этом, чем дольше клетки находятся в растворе фермента с глюкозой (от 5 мин. до 4,5 час.), тем больший процент сорбированной β -амилазы оказывается инактивированным и не открывается в автолизате. Эта продолжающаяся инактивация осуществляется живыми клетками, а не средой, что здесь устанавливалось постановкой упомянутых выше контролей, где фермент выдерживался в среде после отделения клеток.

Растянность инактивации β -амилазы во времени наблюдалась и тогда, когда клетки *S. cerevisiae*, сорбирующие фермент, отделялись от раствора и помещались в новый раствор с исходными условиями. Такое перенесение клеток повторялось последовательно 5—6 раз. В разных сериях

* Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории Ю. С. Ченцова, Н. А. Петрову и Е. Ю. Гнучевой за проведение электронномикроскопических исследований.

опытов при этом использовалась разная концентрация ферментного препарата и разное время выдерживания дрожжей в растворе. Эти опыты показали, что нельзя получить предела насыщения клеток β -амилазой.

Если клетки дрожжей, сорбировавшие β -амилазу, перенести в 2% раствор глюкозы, то инактивация фермента также продолжается, что мож-

Таблица 2

Прирост числа клеток к общему числу клеток
Saccharomyces cerevisiae раса XII

Использованный белок	На глюкозе без белка	На глюкозе и белке
Бычий сывороточный альбумин (крист.)	30,4	98,3
Солодовая β -амилаза	79,0	90,5
Соевая β -амилаза	125,7	146,3

но видеть по уменьшению активности суспензии клеток в этом растворе и по уменьшению активности автолизата.

Нельзя было объяснить продолжающуюся после сорбции фермента его инактивацию тем, что происходит появление

новых клеток в результате размножения, так как в этих сериях опытов оно не могло происходить из-за взятой большой исходной концентрации клеток (8—9%)^(*). Эта закономерность подтверждалась их подсчетом.

Представленные результаты говорят о том, что взаимодействие дрожжевых клеток и ферментного белка, находящегося в среде, включает две фазы: 1) сорбция белка поверхностью клеток, следствием чего является

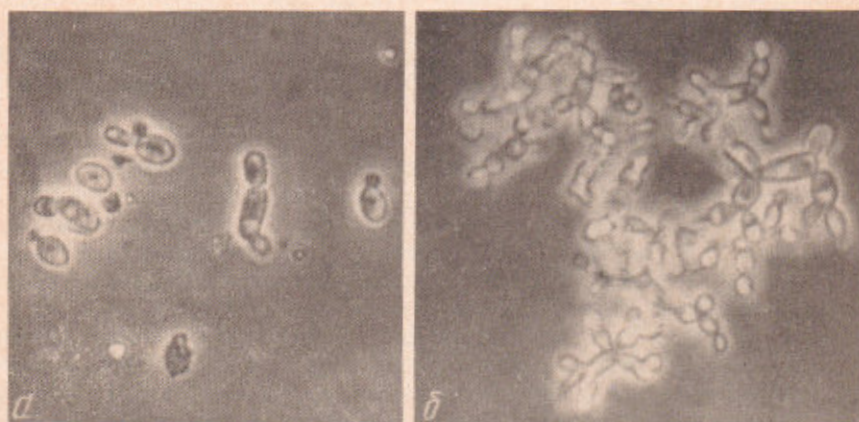


Рис. 2. Размножение изолированных клеток *Saccharomyces vini* в «висячих» каплях растворов глюкозы (а) и глюкозы и белка (б)

быстрая потеря ферментом части активности, очевидно, за счет определенной ориентации частиц фермента на поверхности адсорбента и изменения конформации молекул; закономерности подобных явлений описаны для сорбции ферментов на небиологических поверхностях^(*, 10); 2) воздействие живых клеток на адсорбированный ферментный белок, следствием чего является непрерывная его инактивация и возможность сорбции все новых порций белка из раствора.

Все изложенное говорит в пользу признания возможности использования дрожжевыми клетками сорбированного белка β -амилазы как источника питания. Для дальнейшего доказательства этого необходимо было установить влияние белка на рост и размножение клеток.

По 500 мг биомассы *S. cerevisiae* или *S. vini* помещались в колбочки с 40 мл растворов: 5% глюкозы и 5% глюкозы с 0,25% белка. В разных опытах были использованы соевая β -амилаза, β -амилаза ячменного солода^(*), гемоглобин, яичный альбумин (крист.), бычий сывороточный аль-

бумин (крист.), сывороточный альбумин человека (гомогенный препарат). Препараты белков перед опытом подвергались диализу в течение 1—2 суток против дистиллированной воды на холоду для удаления возможных следов низкомолекулярных веществ. В опытных растворах дрожжи находились 24 часа при комнатной температуре. О размножении клеток судили по подсчету их числа в камере Горяева, производимого сразу и через 24 часа. Результаты опытов показывают, что прирост клеток в варианте с белком был всегда большим (табл. 2).

Более наглядно влияние белка на размножение дрожжевых клеток было показано в серии следующих опытов. Микроманипулятором выделялись с твердой среды отдельные клетки *S. vini* 437 (Магарах) и стерильно переносились в «висячие» капли 5% раствора глюкозы или в капли, содержащие 5% глюкозы и 0,5% сывороточного альбумина человека. Часть опытов проводилась с добавлением в опытные растворы хлорамфеникола в концентрации 10 мкг/мл для предотвращения бактериальной инфекции. Растворы стерилизовались через керамическую свечу. Альбумин выделен из смешанной плазмы крови доноров по 6 методу Кона*⁽¹¹⁾. Белок не обнаруживал низкомолекулярных примесей в ультрацентрифуге (при 63 000 об/мин; центрифуга «Спинко», модель Е) и был вполне гомогенным при свободном электрофорезе на аппарате VEB-Zeiss, модель 35. Молекулярный вес белка, по данным лаборатории В. Я. Черняка, 70 000. Дополнительными испытаниями было показано отсутствие в препарате аминокислот и низкомолекулярных пептидов, а также протеолитической активности.

Капли с клетками помещались в термостат при 30° на 24 часа. Микроскопирование капель показало, что при наличии в среде белка клетки размножились значительно больше, чем в растворе глюкозы (рис. 2).

Таким образом, клетки дрожжей могут использовать белки среды как источник питания. Особенностью этого является то, что, в отличие от известного пути потребления микроорганизмами белков среды при деполимеризации их вне клеток, в данном случае происходит использование белка, сорбированного клеточной поверхностью.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
11 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Л. Курсанов, Е. Исаева, Биохимия, 9, 5, 273 (1944). ² А. И. Опарин, В. В. Юркевич, ДАН, 66, № 2, 247 (1949). ³ В. В. Юркевич, ДАН, 127, № 1, 206 (1959). ⁴ С. А. Коновалов, Биохимия дрожжей, 1962. ⁵ Ph. Matile, Yeasts. The Proc. of the 2 Symposium on Yeasts, Bratislava, 1969. ⁶ А. Н. Белозерский, Н. И. Проскуряков, Практическое руководство по биохимии растений, М., 1951. ⁷ W. W. Luchsinger, R. A. Cornesky, Anal. Biochem., 4, 346 (1962). ⁸ В. В. Юркевич, ДАН, 54, № 2, 329 (1954). ⁹ О. М. Полтораки, Е. С. Воробьева, Вестник Моск. ун-та, сер. Химия, № 5, 41 (1967). ¹⁰ L. K. James, L. G. Augenstein, Adv. Enzymol., 28 (1966). ¹¹ Белки, под ред. Г. Нейрата, К. Бейли, 3, ч. 1, М., 1958, стр. 382.

* Выражаем благодарность В. Я. Черняку за предоставление нам препарата.