

В. В. ЮРКЕВИЧ, Г. Т. КОЗЫРЕВА

**О РОЛИ КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ В РЕГУЛЯЦИИ
БИОСИНТЕЗА α -АМИЛАЗЫ У *ASPERGILLUS ORYZAE***

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 16 VII 1971)

Нами было установлено, что уровень концентрации активной α -амилазы в культуральной среде у *Aspergillus oryzae* является фактором, регулирующим образование этого фермента в клетках мицелия (¹, ²). Концентрация активного фермента выше определенного уровня в среде с дефицитом фосфата полностью ингибирует образование фермента клетками. Описанное явление представляет собой реализацию весьма распространенного в метаболизме принципа отрицательной обратной связи применительно к образованию ферментного белка. Однако, данный случай имеет ту особенность, что белок, находящийся в среде, оказывает влияние на процесс его образования в клетках. Ферментный белок среды при этом не потребляется клетками (²) и, следовательно, влияние его на клетки может осуществляться через контакт с клеточной поверхностью. В настоящей работе показана роль клеточной оболочки в регуляции биосинтеза α -амилазы уровнем активного фермента в среде.

Если описанный механизм регуляции биосинтеза фермента включает контакт молекул α -амилазы среды с поверхностью клеток, то клеточная оболочка очевидно, должна играть роль в осуществлении этого эффекта. Для выявления ее роли мы провели опыты с протопластами *A. oryzae*, штамм 3—9—15.

Протопласты получали с использованием ферментного комплекса из улитки *Helix*. При их выделении мы использовали условия, описанные в работах (³⁻⁵), модифицированные нами применительно к объекту. Гриб выращивали на среде Ролен с крахмалом на качалках в течение 2 суток при 30°. Мицелий стерильно отфильтровывали и промывали 0,1 *N* ацетатным буфером с pH 6,2 и средой выделения протопластов. Далее мицелий инкубировали 3 часа при 30° на среде выделения, которая имела следующий состав: 0,05 *M* малеатный буфер с pH 6,2, в котором растворяли маннит до концентрации 0,6 *M*; 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,4% NH_4NO_3 и лиофилизированный ферментный препарат из *Helix* (100 мг на 1 г сырого веса мицелия). Среда выделения протопластов стерилизовалась в автоклаве. Раствор препарата из *Helix* стерилизовался через стеклянный фильтр № 5. Кроме того, для обеспечения большей стерильности, добавлялись: лизоцим 1 мг/мл, стрептомицин 0,2 мг/мл и хлорамфеникол 10 мг/мл (стерильные растворы). Протопласты отделяли от неразрушенных клеток и обрывков фильтрованием через стеклянную вату. Фильтрат центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. и промывали средой выделения без препарата из *Helix* до исчезновения активности амилазы (5 раз). Далее протопласты очищали фракционированием (стерильно) в двухслойном ступенчатом градиенте мальтозы (2 *M* и 1 *M*). Центрифугирование 20 мин. при 1000 об/мин. Из образовавшегося в середине пробирки видимого слоя отсасывали пипеткой Пастера практически чистую фракцию протопластов.

Мы провели испытание способности протопластов синтезировать α -амилазу. Для этого их инкубировали в течение 17 час. при 30° в пробирках, содержащих 1 мл среды выделения протопластов, где малеатный буфер имел pH 5,0 (в течение инкубации pH сохранялся) и не добавлялся препа-

рат из *Helix*; 1 мл H_2O и 0,5 мл суспензии протопластов в растворе мальтозы. Наличие в инкубационной среде мальтозы было благоприятным, так как этот дисахарид является индуктором биосинтеза α -амилазы (⁶). Одновременно ставились два контроля: та же среда с протопластами, куда сразу добавлялся толуол, и среда с протопластами без толуола, где 1 мл H_2O заменялся раствором циклогексимида, конечная концентрация которого в опытной пробирке составляла 80 μ г/мл. Если наши протопласты живые, то толуол, убивая их, должен предотвратить биосинтез фермента. Постановкой специальных опытов мы выяснили, что толуол не действует на α -амилазу *A. oryzae* и, следовательно, не может снизить активность имеющегося у протопластов фермента. Мы нашли также, что толуол не оказывает влияния на активность протеолитического комплекса гриба, которое могло бы задержать автолиз протопластов и, возможно, снизить образование активного фермента по сравнению с вариантом, где ожидался синтез, но синтеза не было, а было образование активной α -амилазы, связанное с автолизом.

Циклогексимид известен как антибиотик, ингибирующий белковый синтез и действующий на 80 S-рибосомы. Концентрация циклогексимида, подобранная нами по ингибированию прорастания спор *A. oryzae*, действует обратимо. Споры, выдержанные в растворе антибиотика в течение 17 час. и затем отмытые, прорастали на питательных средах. Следовательно циклогексимид в наших опытах должен был ингибировать синтез фермента, не убивая протопласты.

Активность α -амилазы определялась как в культуральной жидкости, так и в протопластах, отделенных центрифугированием. Протопласты переносили в агатовую ступку и растирали со стеклянным порошком в течение 5 мин. Затем заливали 2,5 мл 0,1 N ацетатного буфера с pH 5,0 и оставляли на 1 час при комнатной температуре. Опыты, проведенные с клетками мицелия, показали, что эти условия обеспечивают полный выход в раствор α -амилазы. Далее производилось центрифугирование и определение активности α -амилазы в супернатанте. Оказалось, что в самих протопластах после инкубации активность фермента практически отсутствует.

Активность α -амилазы в данной работе измерялась колориметрически по методу Смита и Роя в модификации Меннинга и Кемпбелла (⁷), видоизмененному нами применительно к α -амилазе *A. oryzae* с подбором условий работы на «начальной» скорости реакции при оптимальной концентрации субстрата. Результаты опытов представлены в табл. 1.

Приведенные данные показывают, что протопласты *A. oryzae* способны синтезировать α -амилазу. Совпадение активности в контрольных вариантах говорит о том, что в наших опытах различие активности α -амилазы в инкубационной среде и двух контрольных вариантах обусловлены наличием и ингибированием синтеза фермента, а не другими причинами. Данные настоящей работы показывают, что протопласты после их получения имеют некоторое количество α -амилазы. Однако это количество фермента, как и вновь синтезированная его часть, секретируются в процессе инкубации. Этот факт согласуется с аналогичными данными по инвертазе дрожжей, являющейся, так же как и α -амилаза, гликопротеидом, имеющим поверхностную локализацию в клетке (⁸).

Убедившись, что протопласты *A. oryzae* могут синтезировать α -амилазу, мы провели опыты по выявлению у клеток, лишенных оболочки, способ-

Таблица 1
Синтез α -амилазы протопластами *A. oryzae*

№ опыта	Активность α -амилазы (в единицах экстинкции)		
	инкубационная среда	инкубационная среда с циклогексими́дом	инкубационная среда с толуолом
1	0,45	0,25	0,25
2	0,70	0,30	0,30
3	0,80	0,30	0,30

ности к регуляции биосинтеза этого фермента уровнем концентрации α -амилазы в среде. Эти опыты ставились, для сохранения нативности протопластов, на среде их выделения, как и опыты, где была показана их способность к синтезу фермента. Вся работа велась в стерильных условиях.

В каждом опыте было три варианта: 1) 1 мл среды выделения, 1 мл H_2O и 0,5 мл суспензии протопластов в 1 М мальтозе; 2) вместо воды добавлялся раствор α -амилазы; 3) среда выделения, α -амилаза и раствор мальтозы без протопластов. Во всех опытных пробирках был pH 5,0, не из-

Таблица 2

Биосинтез α -амилазы протопластами *A. oryzae* на среде с препаратом этого фермента и без него
(активность α -амилазы в единицах экстинкции)

№ опыта	Культуральная среда без препарата фермента	Культуральная среда с препаратом фермента		Среда с препаратом фермента без протопластов
		общая активность	активность, секретированная протопластами	
1	0,30	1,60	0,40	1,20
2	0,60	1,20	0,60	0,60
3	0,25	0,75	0,30	0,45

Таблица 3

Биосинтез α -амилазы клетками *A. oryzae* на среде с препаратом этого фермента и без него
(активность фермента в единицах экстинкции)

№ опыта	Культуральная среда без препарата фермента	Культуральная среда с препаратом фермента		Среда с препаратом фермента без гриба
		общая активность	активность, секретированная грибом	
1	0,50	0,60	0,00	0,60
2	0,40	0,55	0,05	0,50
3	0,30	0,85	0,05	0,80

менявшийся в течение опыта. Время инкубации 17 час., $t = 30^\circ$. Гомогенный препарат α -амилазы, как и в предыдущих работах (¹, ²), был получен из *A. oryzae*. Сравнивалась активность фермента, образованная протопластами при добавлении препарата активной α -амилазы в среду и без добавления препарата. Результаты опытов представлены в табл. 2. В этой серии опытов мы так же, как и ранее, не обнаружили активности α -амилазы в самих протопластах, вся активность была в культуральной среде. Активность фермента, синтезированного протопластами, определена по разности активности культуральной среды с протопластами, куда добавлялся препарат, и среды с препаратом без протопластов.

Данные табл. 2 показывают, что протопласты *A. oryzae* синтезируют α -амилазу в одинаковой мере, независимо от того присутствует или нет этот активный фермент в культуральной среде. Таким образом, у клеток, лишенных оболочки, в отличие от клеток мицелия, теряется эффект регуляции биосинтеза α -амилазы по принципу отрицательной обратной связи активным ферментом среды.

Описанные опыты ставились на среде выделения протопластов, а опыты с клетками гриба на среде Ролена (¹, ²) и различный результат этих опытов мог быть связан с различием условий среды. Поэтому мы поставили серию опытов с нативными клетками гриба, который выращивался из спор на среде выделения протопластов. Условия этих опытов не отличались от опытов с протопластами. pH среды за 17 час. выращива-

ния гриба также не изменялся и был равен 5. Развитие гриба на этой среде было вполне удовлетворительным. В этих опытах активность фермента в мицелии, которая определялась, так же как в протопластах (полное разрушение клеток), тоже не обнаружена, что согласуется с ранее полученными данными, где было показано, что на среде Ролена с дефицитом фосфата гриб полностью секретирует α -амилазу (⁹). Результаты приведены в табл. 3.

Данные табл. 3 показывают, что целые клетки гриба проявляют эффект регуляции на среде, в которой протопласты не обнаружили эффекта регуляции биосинтеза α -амилазы ферментным белком вне клеток.

Все приведенные в работе данные свидетельствуют о том, что клеточная оболочка у *A. oгузае* играет определенную роль в механизме регуляции биосинтеза α -амилазы уровнем активного фермента среды. Этот вывод согласуется с данными о наличии в оболочке клеток *A. oгузае* специфического центра связывания α -амилазы (¹⁰). Высокая специфичность регулирующего влияния фермента среды (¹, ²) позволяет думать, что роль оболочки заключается в ее участии в создании определенной конформации и специфической ориентации его молекул, что необходимо для действия на белок-синтезирующий аппарат. Изучение этого — задача дальнейшего исследования.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, 177, № 1, 240 (1967). ² В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, Физиология и биохимия здорового и больного растения, Сборн., М., 1970, стр. 69. ³ В. J. Bachmann, D. M. Bonner, J. Bacteriol., 78, 550 (1959). ⁴ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, Н. К. Кокурина, Биохимия, 31, 80 (1966). ⁵ Т. П. Афанасьева, Р. А. Звягильская, Цитология, 3, 409 (1966). ⁶ А. С. Тихомирова, Микробиология, 28, 45 (1959). ⁷ G. B. Manning, L. L. Campbell, J. Biol. Chem., 236, № 11, 2952 (1961). ⁸ J. O. Lampen, Antonie van Leeuwenhoek, 34, 1 (1968). ⁹ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, М. И. Дергачева, Прикл. биохим. и микробиол., 3, 157 (1967). ¹⁰ M. Yabuki, S. Fukui, J. Bacteriol., 104, 138 (1970).