

А. Б. ЦИОМЕНКО, В. М. ВАГАБОВ, И. АВГУСТИН, И. С. КУЛАЕВ

О ВЗАИМОСВЯЗИ ОБМЕНА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ И МАННАНА У ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком А. А. Баевым 30 XI 1973)

Высокая коррелятивная зависимость между накоплением определенных фракций неорганических полифосфатов и полисахаридов, обнаруженная ранее у дрожжей (¹), явилась поводом для дальнейшего исследования причин, обуславливающих взаимосвязь между обменом этих соединений.

В данной работе предпринято изучение одной из высокополимерных фракций полифосфатов (ПФ4) и полисахарида клеточной стенки — маннана при различных условиях культивирования дрожжей. В этих же условиях изучались некоторые ферменты, участвующие в обмене названных соединений. Объектом исследования служили дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Выращивание культуры и получение биомассы осуществляли описанным ранее способом (¹). Неорганические полифосфаты экстрагировали по методу Лангена и Лисса (²) в модификации Кулаева с сотрудниками (³). Выделение маннана и его количественное определение проводили по методу Тревельяна и Гаррисона (⁴). Активность полифосфатазы определяли в клеточном гомогенате, используя в качестве субстрата синтетический полифосфат с длиной цепи $\bar{n}=180$ (⁵). Одновременно в параллельных пробах определяли активность экзо- α -маннозидазы, используя в качестве субстрата *n*-нитрофенил- α -маннопиранозид* (*n*-НФМ). Инкубационная смесь для определения маннозидазной активности содержала 50 мкг *n*-НФМ, 50 мкг сывороточного альбумина, 1 М NaCl, 10^{-4} М CaCl₂, клеточный гомогенат (5–6 мг белка), цитрат-фосфатный буфер рН 4,3 в общем объеме 2 мл. Пробы инкубировали 30 мин. при 37°. Изменение содержания полифосфатной фракции ПФ4 и маннана в процессе оптогенетического развития дрожжевых клеток показано на рис. 1а. Результаты свидетельствуют о том, что на протяжении всего времени исследования ход кривых накопления обоих веществ был практически параллелен. При изучении коррелятивных взаимоотношений между полифосфатами и полисахаридами определено, что воздействие таких факторов как лимитирование роста дрожжевых клеток отсутствием азота в среде, или пересев клеток, находящихся в стационарной фазе роста, на свежую питательную среду, вызывало резкие колебания в содержании этих соединений (¹). На рис. 1б приведены результаты одного из опытов, в котором клетки, достигшие стационарной фазы роста (50 час.), пересевали на свежую среду и в них, через определенные интервалы времени анализировали содержание фракции ПФ4 и маннана. Как видно, в этих условиях в течение первых 2 час. после посева происходит резкое падение, а затем почти столь же интенсивное накопление обоих веществ, приводящее к достижению обычного уровня полифосфатов и маннана, характерного для стационарной стадии роста культуры. Следует заметить, что и в этом случае также сохранялась четкая согласованность в характере поведения изученных фракций. Для того чтобы попытаться ответить на вопрос о причинах, вызывающих наблюдаемые изменения, нами было предпринято ис-

* Выражаем благодарность д-ру Д. Шиклу (Братислава, ЧССР) за любезно предоставленный *n*-НФМ.

следование активности ферментов гидролиза полифосфатов и маннана. Активность определяли в течение первых 5 час. после пересева клеток на свежую питательную среду, так как этот промежуток времени характеризуется наиболее резким падением содержания фракции ПФ4 и маннана (рис. 1б). Полученные результаты приведены на рис. 2.

Сравнение характера изменения полифосфатазной активности и содержания фракции ПФ4 (рис. 2а) свидетельствует о несомненной причастности полифосфатазы к количественным изменениям в этой фракции. Так, максимумы активности фермента совпадают с минимумами содержания полифосфатов во всех экспериментальных точках. Аналогичная картина наблюдалась также при сравнении поведения α -маннозидазной активности

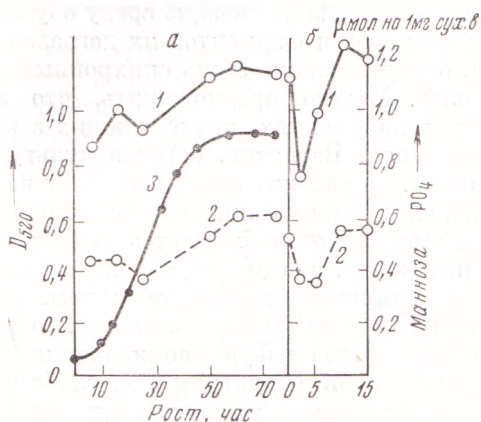


Рис. 1

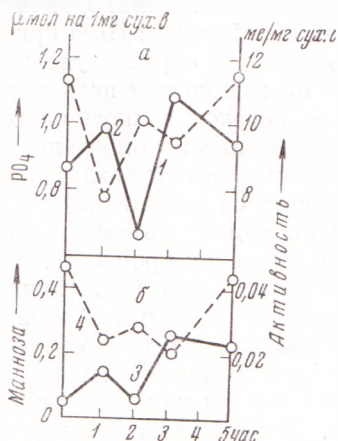


Рис. 2

Рис. 1. Изменение содержания высокополимерных неорганических полифосфатов (1) и маннана (2) в процессе роста *S. carlsbergensis*, 3 — накопление биомассы. а — до пересева, б — после пересева клеток на свежую среду

Рис. 2. Изменение активности ферментов гидролиза полифосфатов (а) и маннана (б) в дрожжевых клетках после пересева на свежую среду. 1 — полифосфатаза, 2 — содержание полифосфатов, 3 — маннозидаза, 4 — содержание маннана

п содержания маннана в тех же точках (рис. 2б). Это позволяет думать, что по крайней мере частичное уменьшение содержания маннана вызвано действием α -маннозидазы. Не исключено, что помимо α -маннозидазы в наблюдаемой деградации маннана участвуют другие ферменты (с), действующие на иные типы связей и в других участках цепи молекулы полисахарида (эндо-маннан-гидролазы).

В связи с изложенным нам казалось важным выяснить локализацию изученных ферментов в дрожжевой клетке. Естественно думать, что исследованные гидролазы могут быть локализованы в месте нахождения их субстратов. В этом смысле, если принадлежность маннана к клеточной стенке (или клеточной оболочке) не вызывает сомнения, то в отношении локализации фракции полифосфатов ПФ4 у исследованного объекта мы не располагали столь очевидными фактами. Поэтому было проведено сравнение содержания этой фракции в целых клетках и протопластах. Результаты оказались следующими (в $\mu\text{гР}$ на 1 г сырой биомассы):

Объект	ПФ1	ПФ2	ПФ3	ПФ4
Клетки	706	516	208	356
Протопласты	828	299	23	0

Отсутствие фракции ПФ4 в протопластах служит четким свидетельством ее периферического расположения в клетках *S. carlsbergensis*, снаружи от цитоплазматической мембраны. Эти данные согласуются с локали-

зацией различных полифосфатных фракций у других микроорганизмов (7, 8). Известно, что полифосфатаза находится у периферии клетки и, очевидно, является периплазматическим ферментом (5).

Прямых данных относительно локализации маннозидаз в литературе нет, однако факт обнаружения экзо- α -маннозидазы в культуральной среде низших грибов (9) может говорить о возможности нахождения этого фермента в клеточной оболочке. Выдвинутое ранее предположение (1) о существовании сопряженного с синтезом маннана синтеза полифосфатов и гипотетическая схема этого сопряжения объясняет главным образом наблюдаемое накопление маннана и фракции ПФ4. Результаты настоящей работы существенно дополняют общую картину взаимосвязи между обменом этих соединений. Выяснилось, что резкое уменьшение содержания маннана и фракции ПФ4 при пересеве культуры на свежую среду обусловлено главным образом увеличением активности ферментов их деградации. Пока еще не совсем ясен механизм, определяющий столь синхронный характер поведения изученных гидролаз. Можно предположить, что эти ферменты играют определенную роль в изменениях, происходящих в клеточной стенке при различных воздействиях. Вероятно, пересев культуры, находящейся в стационарной фазе роста, на свежую среду вызывает начало процессов подготовки клеток к делению, сопровождаемое перестройкой метаболических процессов. Именно в этот период наблюдается утолщение клеточной стенки (10). Можно предположить, что это обусловлено резкими количественными колебаниями ее компонентов. Вместе с тем, если роль маннана в формировании клеточной стенки хорошо известна, то участие высокополимерных фракций полифосфатов в функционировании клеточной стенки как интегрированной клеточной структуры еще слабо изучено. Возможно полифосфаты, локализованные у периферии клетки, участвуют в каких-то специфических процессах, связанных с обменом энергии и (или), что не менее важно, выполняют наряду с другими функциями структурное назначение в поддержании сложной архитектоники клеточной оболочки.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пуццино-на-Оке

Поступило
30 XI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. С. Кулаев, В. М. Вагабов, А. Б. Циоменко, ДАН, т. 204, № 3, 734 (1972).
² P. Langen, E. Liss, Biochem. Zs., В. 330, 455 (1958). ³ И. С. Кулаев, А. Н. Белозерский, Д. И. Островский, Биохимия, т. 26, в. 1, 188 (1961). ⁴ W. E. Trevelyan, I. S. Harrison, Biochem. J., v. 50, 298 (1952). ⁵ И. С. Кулаев, Г. И. Коношенко, А. М. Умнов, Биохимия, т. 37, 227 (1972). ⁶ I. S. Maddox, J. S. Hough, J. Inst. Brew., v. 77, 1, 44 (1971). ⁷ И. С. Кулаев, Т. П. Афанасьева, М. П. Беликова, Биохимия, т. 32, в. 3, 539 (1967). ⁸ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, Н. К. Кокурина, Биохимия, т. 31, в. 4, 850 (1966). ⁹ J. F. Preston, E. Lapis, J. E. Gander, Arch. Mikrobiol., v. 88, 1, 71 (1973).
¹⁰ H. Moor, Arch. Mikrobiol., v. 57, 135 (1967).