

Л. А. ОКОРОКОВ, В. П. ХОЛОДЕНКО, И. С. КУЛАЕВ

НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ — ПОЛИМЕРНЫЙ ОРТОФОСФАТ ЖЕЛЕЗА У РАЗЛИЧНЫХ ГРИБОВ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 29 IX 1970)

Ранее мы доказали, что внутриклеточный ортофосфат *Penicillium chrysogenum* может находиться в свободной и связанной формах. Связывание ортофосфата осуществляется через ион Fe^{+3} с образованием высокомолекулярного комплексного соединения, рассматриваемого на данной стадии исследования как полимерный ортофосфат железа (PO_{Fe}) (¹⁻³).

Нами было предположено (³), что PO_{Fe} — депо фосфора и железа, а также регулятор концентрации внутриклеточного ортофосфата. Допускалось, что PO_{Fe} с одной стороны — средство выведения из обмена лишних фосфата и железа, т. е. средство их обезвреживания, с другой — запасной источник этих элементов в клетке.

Таблица 1

Содержание фосфора и железа в целых клетках, в PO_{Fe} и в некоторых фракциях, полученных при разделении фосфорных соединений различных грибов

Организмы	Ортофосфат, мг Р на 1 г сухого веса					Fe ³⁺ , мг на 1 г сухого веса					Р/Fe
	общий фосфор мицелия	мочевинно-аммиачный экстракт	свободный внутриклеточный ортофосфат	PO_{Fe} в осадке	PO_{Fe} после диализа	общее железо мицелия	мочевинно-аммиачный экстракт	«Сво. более желевоз»	PO_{Fe} в осадке	PO_{Fe} после диализа	
<i>Mucor humalis</i>	60100	5500	2900	2350	3600	21600	13500	4250	11500	9850	0,34
<i>Cunninghamella elegans</i>	34100	8800	2100	6150	8000	35000	20700	5050	14600	18400	0,76
<i>Aspergillus nidulans</i>	29000	10000	2050	9200	7450	36700	20200	1620	18500	19300	0,91
<i>Aspergillus niger</i>	20000	5250	2250	3000	2400	12100	9850	2800	7700	9250	0,91
<i>Aspergillus oryzae</i>	38800	4450	1640	2800	2300	30200	6850	1700	5850	7250	0,88
<i>Sclerotium bataticola</i>	50200	15200	5900	11500	8800	68500	24800	6150	15400	20200	1,35
<i>Trichoderma lignorum</i>	44600	28000	8150	23500	25400	67500	52400	770	51500	51000	0,83
<i>Penicillium notatum</i>	39000	6820	900	4900	4250	10200	16000	2100	12100	14500	0,87
<i>Chaetomium setosum</i>	20800	12500	5800	5000	5500	21800	11300	3000	7700	11500	1,17
<i>Rhizopus arrhizus</i>	36200	6850	700	5600	4600	42800	14100	650	11400	12500	0,88
<i>Merulius lacrymans</i>	17100	12000	850	9500	9800	25800	—	1700	24600	24200	0,67
<i>Fusarium oxysporum</i>	37100	8750	2350	5050	5300	—	—	1870	28400	24400	0,82
<i>Fusarium semitectum</i>	49400	14200	1300	13800	12500	71200	33800	1250	36000	28800	0,70
<i>Verticillium albo-atrum</i>	42000	27000	4150	21500	21200	54800	48100	4200	40500	43500	0,96
<i>Chaetomium indicum</i>	51000	10400	5050	4850	5300	81600	13000	4200	9100	12000	0,97
<i>Cunninghamella elegans</i>	28400	3460	1300	1680	2160	8500	6100	855	3240	5550	0,93
<i>Penicillium notatum</i>	19250	7850	1275	7150	7050	16550	16020	1520	14000	17500	0,92

В связи с этим представлялось важным решить вопрос: присуща ли способность образовывать PO_{Fe} только *P. chrysogenum* или она свойственна и другим грибам.

С этой целью было выбрано 15 видов различных грибов. Выращивание всех грибов осуществляли в 750 мл колбах на среде Стоуна и Фарелла при 30° (⁴). Посевным материалом служила водная суспензия спор. Мицелий через 48 час. роста отфильтровывали, промывали холодной водой и фиксировали жидким азотом. PO_{Fe} экстрагировали из клеток раствором 7,5 М мочевины в 0,3 М NH_4OH (⁴). Экстракт фильтровали на стеклянном фильтре № 2 и затем часть его центрифугировали 30 мин. при 40 000 g. О количестве PO_{Fe} в клетках грибов судили по содержанию ортофосфата и Fe^{+3}

в получаемом осадке. Другим тестом на ПО_{Fe} являлась недиализуемость ПО_{Fe} при 4° против аммиачной воды (рН 10—11) за 24 часа. В ряде случаев пользовались дополнительными тестами на ПО_{Fe} — гельфильтрацией на биогеле Р-300 и способностью ЭДТА и HCl разрушать ПО_{Fe} при 4° (³).

О количестве свободного внутриклеточного ортофосфата и «свободного железа» (III) судили по содержанию ионов Fe^{+3} и ортофосфата в надосадочной жидкости, получаемой при выделении ПО_{Fe} центрифугированием. Основные данные анализов представлены в табл. 1.

Самым важным результатом является то, что ПО_{Fe} найден во всех испытанных грибах. Действительно, подобно *P. chrysogenum*, эти грибы накапливают значительное количество ортофосфата железа, который по своим свойствам не отличается от ПО_{Fe} . Он экстрагируется аммиачной мочевиной, может быть выделен из экстракта в виде осадка при высокоскоростном центрифугировании, не диализуется при рН 10—11. Дополнительные тесты, использованные выборочно для нескольких грибов, отождествляют его с ПО_{Fe} . Так для *A. niger*, *A. oryzae*, *Mucor humalis* и *Mucor plumbeus* показано, что накопленный ими фосфат железа, подобно ПО_{Fe} , теряет свойства высокомолекулярного соединения после 12 час. обработки ЭДТА при рН 10—11 и 4° или после 1 часа обработки HCl при рН 2 и 4° . Деструкция ПО_{Fe} , вызванная этими реагентами, фиксируется как по увеличению диализуемости ортофосфата, так и по уменьшению количества Р и Fe в осадке, получаемом при центрифугировании (табл. 2). Кроме того, для *Rhizopus arrhizus* было показано, что образованный им фосфат железа при гельфильтрации на биогеле Р-300 выявляется в первом же пике. Это свидетельствует о высоком молекулярном весе изучаемого фосфата железа.

На основании всех полученных данных можно утверждать, что способностью образовывать и накапливать ПО_{Fe} обладают различные грибы.

По-видимому, среда выращивания не оказывает принципиального влияния на эту способность, так как грибы, росшие на среде Чапека, содержащей 200 мг FeSO_4 на 1 л, также накапливали ПО_{Fe} (табл. 1, две нижние строки).

Таким образом, можно считать установленным, что внутриклеточный ортофосфат целого ряда грибов при выращивании на среде с железом находится как в свободной форме, так и в форме высокомолекулярного комплекса ортофосфата железа (ПО_{Fe}).

Широкое распространение ПО_{Fe} у грибов вновь приводит нас к предположению, что он, а может быть и ПО других металлов (³), является универсальным средством выведения избыточного количества ионов фосфата и Me^{+n} из растворенного состояния в безвредную для клеток форму, которая одновременно представляет собой резерв фосфата и ионов Me^{+n} .

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

Поступило
29 IX 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ а) I. S. Kulaev, L. A. Okorokov, Abstr. Communication III Meeting FEBS, Warsaw, 1966; б) Л. А. Окорок, IX Международн. конгресс по микробиологии, Тез. докл., 1966, стр. 150. ² I. S. Kulaev, L. A. Okorokov, Abstr. VII Intern. Congr. Biochem. Tokyo, V Section, J-294, 1967, p. 1020. ³ Л. А. Окорок, И. С. Кулаев, Биохимия, 33, 667 (1968). ⁴ И. С. Кулаев, Л. А. Окорок, Биохимия, 32, 695 (1967).

Таблица 2

Содержание фосфора и железа в ПО_{Fe} после обработки его HCl и ЭДТА*, %

Микроорганизмы	Обработка HCl		Обработка ЭДТА	
	P	Fe^{+3}	P	Fe^{+3}
<i>Aspergillus niger</i>	43	60	5	5
<i>Aspergillus oryzae</i>	62	83	0	0
<i>Mucor plumbeus</i>	46	90	12	6
<i>Mucor humalis</i>	64	78	10	11

* Содержание Р и Fe^{+3} выражено в % от их количества в ПО_{Fe} , не подвергавшемся обработке HCl и ЭДТА.