

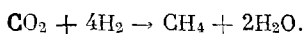
УДК 577.12

БИОХИМИЯ

Е. С. ПАНЦХАВА, член-корреспондент АН СССР В. Н. БУКИН

ВЛИЯНИЕ АТФ, АДФ И АМФ НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА ИЗ МЕТИЛКОБАЛАМИНА БЕСКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ METHANOBAСILLUS KUZNESEOVII

Биологическое образование метана из одноуглеродных соединений является восстановительным процессом, требующим затраты энергии в виде АТФ (1):



Ранее полагали, что синтез метана есть побочная реакция, необходимая для удаления избыточных количеств протона, образующегося при анаэробном окислении субстрата. Расчеты выделяющейся свободной энергии, проведенные для реакций метанобразования, показали, что количество энергии, образующейся за счет окислительного фосфорилирования на уровне субстрата (брожение метанола), недостаточно для покрытия всех потребностей клетки в энергии (2). На основании выше-сказанного делается предположение, что энергия в виде АТФ у метановых бактерий аккумулируется за счет реакций фосфорилирования при переносе электронов через соответствующую электронтранспортную цепь (2).

При исследовании метанобразующих бактерий штамма МОН было установлено, что образование АТФ сопряжено с синтезом метана (3).

Т а б л и ц а 1

Влияние АТФ и АМФ на образование CH_4 на фоне различных концентраций CH_3V_{12} бесклеточными экстрактами *Mbас. kuzneseovii*, полученными из клеток периода неактивного брожения

	CH_3V_{12} , р.М	Образовано CH_4 , м.р. мол.		
		экстракт	+ АТФ	+ АМФ
Экстракт прогретый	0,277	10,6	—	—
Экстракт нативный	—	14,4	—	—
	0,277	37,0	22,0	44
	0,554	44,4	25,0	70
	1,108	100,0	41,0	138

Примечание. Инкубационная смесь (1,7 мл): 0,05 моля калийфосфатного буфера рН 7; 5 ммол. $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,6 ммоль $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; белок 35 мг; 55°, атмосфера H_2 , 60 мин. АТФ, АМФ 5 ммол.

Исследования, результаты которых приводятся ниже, показали, что действие АТФ и ее предшественников на образование CH_4 — очень сложный процесс, изменяющийся в зависимости от физиологического состояния культуры метанобразующего организма.

Эксперименты проводились с термофильной культурой *Mbас. kuzneseovii*. Бактерии выращивались на среде Баркера, как описано ранее

(4). Бесклеточные экстракты получали на френч-прессе при $t = -70^\circ$. Грубый экстракт сепарировали при 20 000 *g* 30 мин. Супернатант, содержащий 30–40 мг белка на 1 мл, использовали для экспериментов. В качестве субстрата применяли CH_3V_{12} (5). В работе использовались препараты АТФ, АДФ и АМФ фирмы «Реанал», Венгрия. Метан определялся на газовом хроматографе ЛХМ-8М ДПИ на колонке селикагеля.

Таблица 2

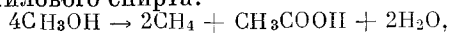
Влияние различных концентраций АТФ, АДФ и АМФ на образование CH_4 из CH_3V_{12} бесклеточными экстрактами *M. bas. kuznesoevii*, полученными из клеток периода неактивного брожения *

Концентрация нуклеотида, μ мол/л	Образовано CH_4 , μ мол/л		
	+ АТФ	+ АДФ	+ АМФ
5	31	41	56
10	4	38	22
15	3	7	9
20	2	14	17

* Выход CH_4 в контроле составлял 9 μ мол; при добавлении субстрата CH_3V_{12} без нуклеотидов 44 μ мол.; остальное — на фоне CH_3V_{12} .

Примечание. Инкубационная смесь (1,1 мл): 0,05 моля калийфосфатного буфера pH 7; 5 ммол. $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,6 ммоль $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,66 μ моля CH_3V_{12} ; белок 45 мг; 55°, 60 мин., атмосфера H_2 .

Культура *M. bas. kuznesoevii*, развивающаяся за счет сбраживания метилового спирта:



имеет две четко выраженные стадии развития: 1) активная стадия со скоростью газообразования 7–10 л метана в сутки и 2) стадия затухания брожения — 3–4 л метана в сутки.

Исследования, проведенные с бесклеточными экстрактами, полученными из клеток различных стадий брожения, обнаружили заметные изменения, происходящие в организме при различной физиологической активности последнего.

Ниже приведены данные по влиянию АТФ и ее аналогов на образование CH_4 из CH_3V_{12} бесклеточными экстрактами *M. bas. kuznesoevii*, полученными из клеток стадии активного брожения (инкубационная смесь (1,4 мл): 0,05 моля калийфосфатного буфера pH 7; 5 ммол. $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,6 ммоль $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,47 μ моля CH_3V_{12} ; 55°, 60 мин., атмосфера H_2 , белок 22 мг).

Концентрация нуклеотида составляла 5 μ мол/л

Под влиянием АТФ образуется CH_4 (μ мол.)	20,0.
Под влиянием АДФ	» » 5,6.
Под влиянием АМФ	» » 4,4.
Без нуклеотидов	» » 4,4.

При этих условиях АТФ оказывает значительное стимулирующее влияние на синтез CH_4 , что согласуется с известными данными зарубежных исследователей.

Но совершенно противоположные результаты наблюдаются при инкубировании бесклеточных экстрактов, полученных из клеток периода неактивного, затухающего брожения инкубационная смесь (1,1 мл): 0,05 моля калийфосфатного буфера pH 7; 5 ммол $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 6 ммоль $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,83 μ моля CH_3V_{12} ; 55°, 60 мин., атмосфера H_2 , белок 17,5 мг.

Концентрация нуклеотида составляла 10 μ мол/л

Под влиянием АТФ образуется CH_4 (μ мол.)	9,4.
Под влиянием АДФ	» » 7,0.
Под влиянием АМФ	» » 19.
Без нуклеотидов	» » 10,6.

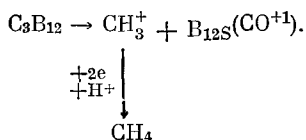
Видно, что в период затухающего брожения АМФ стимулирует образование метана, тогда как АТФ оказывает ингибирующий эффект. Последнее хорошо иллюстрируется данными, помещенными в табл. 1.

Таким образом, характер действия аденозин-моно-, ди- и трифосфорной кислот на образование CH_4 из CH_3V_{12} зависит от физиологического состояния клеток метанообразующих бактерий. Возможно, что перечисленные выше соединения являются не просто донорами энергии или их пред-

пешественниками, но могут выполнять роль регуляторов механизма биологического синтеза CH_4 . Вероятно, с такой позиции может быть объяснен эффект АМФ, так как непосредственное восстановление CH_3^+ до CH_4 требует затраты энергии, аккумулирующейся в виде АТФ. Последнее предполагает, что АМФ — не только регулятор, но превращается в АТФ, которая и становится источником энергии, необходимой для синтеза CH_4 . Этот вывод подтверждается результатами экспериментов, помещенными в табл. 2.

Данные табл. 2 показывают, что при концентрации 5 $\mu\text{мол/л}$ АМФ стимулирует образование CH_4 , тогда как АТФ в эквивалентных количествах ингибирует его. Однако с увеличением концентрации как в случае АМФ, так и в случае АТФ наблюдается торможение процесса. При этом в варианте с АТФ этот эффект значительнее. Возможно, что с увеличением концентрации АМФ на фоне постоянных количеств субстрата (CH_3B_{12}) увеличивается скорость превращения АМФ в АТФ, которая и тормозит синтез CH_4 .

Возможно, что синтез АТФ у *M. b. kuznecovii* протекает за счет «окислительного» фосфорилирования при переносе электронов от H_2 к CH_3^+ , так как полагают, что метил- B_{12} образует карбоний-ион (CH_3^+), для восстановления которого в CH_4 необходимо два электрона и протон:



Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. C. Stadtman, Ann. Rev. Microbiol., **21**, 121 (1967). ² H. G. Wood, Ann. Rev. Microbiol., **23** (1969). ³ A. M. Robertson, R. S. Wolfe, J. Bacteriol., **102**, 43 (1970). ⁴ Е. С. Панцхава, В. В. Пчелкина, Прикл. биохим. и микробиол., **5**, 416 (1969). ⁵ H. Weissbach, Al. Peterkofsky et al., J. Biol. Chem., **238**, 3318 (1963).