

УДК 576.3.11.1

БИОХИМИЯ

Л. А. ОКОРОКОВ, В. М. КАДОМЦЕВА, И. С. КУЛАЕВ

## ОБНАРУЖЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ ОРТОФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ, МАГНИЯ И МАРГАНЦА У *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 9 IX 1971)

Ранее мы показали <sup>(1)</sup>, что внутриклеточные фосфат и  $\text{Fe}^{3+}$  у *P. chrysogenum* находятся в свободной и связанной формах. Связывание этих ионов происходит при образовании ими высокомолекулярного комплекса — полимерного ортофосфата железа ( $\text{PO}_{\text{Fe}}$ ). Получены данные, свидетельствующие об участии  $\text{PO}_{\text{Fe}}$  в регуляции уровня свободных ионов  $\text{Fe}^{3+}$  и фосфата у *P. chrysogenum* <sup>(2, 3)</sup>.

Целью настоящей работы явилась проверка предположения о том, что клетки грибов могут образовывать полимерные ортофосфаты различных металлов <sup>(1)</sup>.

Мицелий *P. chrysogenum* выращивали 50 час. при 25° в колбах на синтетической среде <sup>(4)</sup>, в которой  $\text{FeSO}_4$  заменяли на эквимолекулярное количество сульфатов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . Мицелий промывали дистиллированной водой, фиксировали жидким азотом и хранили при -40°. Из мицелия при 4° получали два параллельных экстракта: 0,5 N  $\text{HClO}_4$  и 7,5 M мочевиной в 0,3 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  <sup>(4)</sup>. Фракционирование фосфорных соединений мочевино-аммиачного экстракта осуществляли либо его центрифугированием (50 000 g; 30 мин., 4°), либо диализом (pH 10–11, 24 часа), либо гель-фильтрацией <sup>(4)</sup>. Во всех экстрактах и фракциях определяли содержание фосфата <sup>(5)</sup> и катиона металла <sup>(6)</sup>. В мицелии определяли общий фосфор и общее количество металла <sup>(4)</sup>.

Исследования показали, что *P. chrysogenum* при одинаковых условиях выращивания и эквимолекулярных концентрациях солей в среде накапливает разные количества катионов. Так, содержание  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухого веса соответственно составляло 1,6; 1,4; 0,7; 0,4; 0,17; 0,03 и 0,04 ммол. Возможно, что накопление того или иного катиона зависит от природы микроорганизма: пекарские дрожжи аккумулируют катионы в ином порядке:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  >  $\text{Mn}^{2+}$  >  $\text{Ni}^{2+}$  >  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>(7)</sup>.

Интересно, что накопление катиона начинается после достижения определенной пороговой концентрации его соли в среде культивирования. Так, ионы  $\text{Cu}^{2+}$  не обнаруживаются в *P. chrysogenum* в заметных количествах, пока концентрация  $\text{CuSO}_4$  не превысит 100 мг/л. Накопление катионов пропорционально их концентрации в среде, и в наших опытах максимальное количество  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , аккумулированных грибом, соответственно достигало 110; 52; 75; 11; 2,8; 3,25 мг/г сухого веса.

Было установлено, что накопленные катионы практически полностью экстрагировались из мицелия *P. chrysogenum* 0,5 N  $\text{HClO}_4$ . При этом в экстракт переходил ортофосфат в количестве, пропорциональном содержанию катиона в клетках. По-видимому, *P. chrysogenum* аккумулирует фосфаты различных катионов. Характеристика некоторых из них была получена при изучении мочевино-аммиачных экстрактов.

Большая часть фосфатов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  переходила в мочевино-аммиачный экстракт. Экстрагируемость этих фосфатов и фосфата  $\text{Mg}^{2+}$  может достигать 50–80%, однако иногда она уменьшается под влиянием каких-то пока не контролируемых нами факторов. Как правило, растворы

фосфатов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  кинетически устойчивы, незначительная доля этих фосфатов осаждается при хранении экстрактов. Иначе ведет себя фосфат кобальта (II): в первый же час после экстракции он кристаллизуется и осаждается практически полностью.

Оказалось, что фосфаты  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  проявляют свойства высокомолекулярных соединений. Так, при центрифугировании мочевинно-аммиачных экстрактов можно осадить комплекс фосфата с катионом  $\text{Me}^{n+}$  и таким образом отделить его от свободных ионов  $\text{Me}^{n+}$  и фосфата. Большая часть (50–70%) фосфата и катионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  этих экстрактов не диализуется. При гель-фильтрации мочевинно-аммиачного экстракта на профиле элюции наблюдаются два пика: один, соответствующий

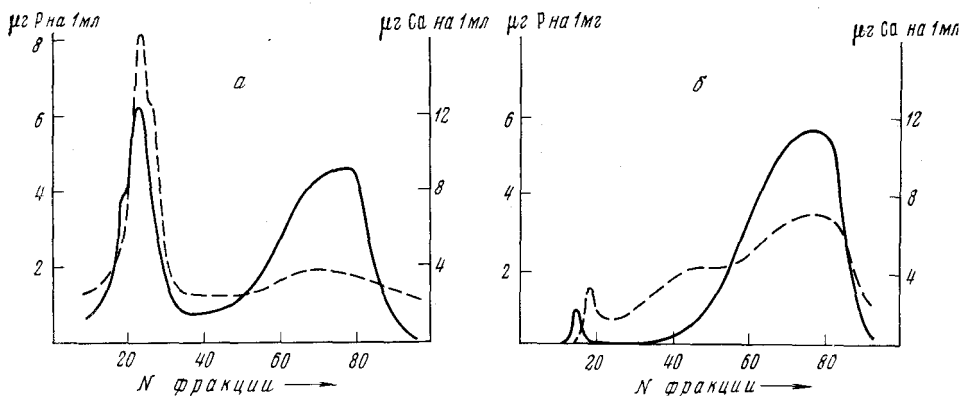


Рис. 1. Гель-фильтрация соединений мочевинно-аммиачного экстракта из *R. chrysogenum*. Экстракт диализовали 30 мин. при pH 10 против аммиачной воды и 20 мл его наносили на колонку (450 × 54 мм) с биогелем P-300 (50–100 меш), скорость элюции 0,05 N трис-буфером при 4° и pH 8. 9–7 мл/час; объем каждой пробы 7 мл. а — до обработки HCl, б — после 1 часа обработки 1 N HCl при 4°. Сплошная линия — фосфат, пунктирная  $\text{Ca}^{2+}$

соединениям с м.в.  $\geq 400\,000$ , и второй, относящийся к низкомолекулярным соединениям (свободные ортофосфат и ионы  $\text{Me}^{n+}$ ). На рис. 1а это иллюстрируется на примере фосфата кальция.

Комплексы фосфата с  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  теряют указанные свойства при обработке мочевинно-аммиачных экстрактов 1 N HCl (1 час, 4°) или ЭДТА. При этом большая часть ионов фосфата и  $\text{Me}^{n+}$  обнаруживается либо в надосадочной жидкости (центрифугирование), либо в диализуемой фракции (диализ), либо в области низкомолекулярных соединений (гель-фильтрация, см. рис. 1б). Разрушающее действие HCl может достигать 60–80%, а деструкция ЭДТА 100%.

Отношение фосфора к металлу в высокомолекулярных комплексах непостоянно и может варьировать в широких пределах:  $\text{P}/\text{Ca} = 0,6 - 1,4$ ;  $\text{P}/\text{Mg} = 0,65 - 2,0$ ;  $\text{P}/\text{Co} = 0,6 - 1,7$ .

По перечисленным свойствам фосфаты  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  полностью идентичны полимерному ортофосфату Fe ( $\text{PO}_{\text{Fe}}$ ), обнаруженному у грибов (<sup>1, 8</sup>).

Все вышесказанное позволяет сделать важный вывод о том, что *R. chrysogenum* способен накапливать не только  $\text{PO}_{\text{Fe}}$ , но и  $\text{PO}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{PO}_{\text{Mg}}$ ,  $\text{PO}_{\text{Mn}}$  и, возможно,  $\text{PO}_{\text{Co}}$ . Следовательно, ионы фосфата и указанных катионов в клетках этого гриба находятся как в свободном, так и в связанном состоянии.

Можно допустить, что накопление катионов (в том числе и токсичных) в клетках *R. chrysogenum* достигается благодаря тому, что их «избыток» обезвреживается путем выведения в связанную форму, т. е. в полимерные ортофосфаты катионов.

Мы предполагаем, что полимерные ортофосфаты  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и других катионов широко распространены и будут обнаружены в большинстве организмов. Функции этих комплексов, очевидно, разнообразны, и в настоящее время, предположительно, можно назвать следующие: 1) резервирование фосфата и катионов металлов в нетоксичной форме; 2) регулирование уровня свободных ионов в клетке; 3) контролирование посредством этого активности разнообразных ферментов, чувствительных к ионам  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и т. д. В частности, мы допускаем, что  $\text{ПО}_{\text{Ca}}$  принимает участие в процессах костеобразования и отложения камней в почках. Весьма вероятно, что  $\text{ПО}_{\text{Mg}}$  используется для выведения из реакционной системы ортофосфата, образующегося из пиррофосфата, который высвобождается при биосинтезе нуклеиновых кислот, белка, полисахаридов и т. д.

Некоторые функции  $\text{ПО}_{\text{Fe}}$  уже изучены (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>). Следует думать, что уже в ближайшем будущем вопрос о физиологической роли обнаруженных нами полимерных фосфатов металлов в жизнедеятельности различных организмов найдет свое решение.

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

Поступило  
6 IX 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Л. А. Окороков, И. С. Кулаев, Биохимия, **33**, 667 (1968). <sup>2</sup> Л. А. Окороков, И. С. Кулаев и др., Микробиология и научно-технический прогресс, Тез. докл. IV съезда Всесоюз. микробиол. общ., Минск, 1971, стр. 32. <sup>3</sup> Л. А. Окороков, Л. П. Личко, И. С. Кулаев, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6 (1972). <sup>4</sup> R. Stone, L. Forall, Science, **104**, 445 (1946). <sup>5</sup> H. Weil-Malherbe, R. H. Green, Biochem. J., **49**, 286 (1951). <sup>6</sup> Е. Сендел, Калориметрические методы определения следов металлов, М., 1964. <sup>7</sup> G. F. Fuhrmann, A. Rothstein, Biochim. et biophys. acta, **163**, 325 (1968). <sup>8</sup> Л. А. Окороков, В. П. Холоденко, И. С. Кулаев, ДАН, **199**, 1204 (1971).