

УДК 631.461:546.73

КИНЕТИКА ТРАНСПОРТА  $\text{Co}^{2+}$  В КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

С. Г. КАСПАРОВА, Е. Г. ДАВИДОВА

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Изучалась кинетика активного транспорта  $\text{Co}^{2+}$  в клетки дрожжей *S. utilis* и *T. famata*. На основании уравнения Михаэлиса — Ментена получены кинетические константы транспорта  $\text{Co}^{2+}$ , которые показали что у *T. famata* транспорт  $\text{Co}^{2+}$  менее эффективен, чем у *S. utilis*.

При исследовании накопления  $\text{Co}^{2+}$  в клетках дрожжей *S. utilis* и *T. famata* нами было установлено [2], что культура *T. famata* значительно более устойчива к высоким концентрациям кобальта в среде, чем *S. utilis*. Причем в клетках *T. famata* его накапливалось в 3—5 раза меньше, чем в клетках *S. utilis*. Как известно, процесс поглощения тяжелых металлов может быть метаболическим (зависеть от энергии метаболизма) и неметаболическим за счет сорбции на клеточной поверхности [7]. Одним из определяющих моментов является транспорт ионов через цитоплазматическую мембрану, поэтому для выяснения причины резистентности культуры *T. famata* к высоким концентрациям  $\text{Co}^{2+}$  в среде нами были проведены сравнительные исследования транспорта  $\text{Co}^{2+}$  в клетках *S. utilis* и *T. famata*.

## Методика

В работе были использованы дрожжи *Candida utilis* и *Torulopsis famata*, полученные из коллекции культур ВНИИсинтезбелок. Культивирование проводили в стационарных условиях на термостатированной качалке в течение 18 ч при температуре 30 °С на жидкой

питательной среде следующего состава (на 1 л водопроводной воды):  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  — 2 г,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 17,6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,8,  $\text{MgSO}_4$  — 0,7 г, дрожжевой экстракт — 0,1 %, pH — 6,5. В качестве источника углерода использовали глюкозу или этиловый спирт (концентрация в среде 1 %).

Дрожжи выращивали на суслотагаре в течение 24 ч, далее их переносили в колбу объемом 500 мл, содержащую 100 мл среды указанного выше состава и 1 % вес. глюкозы или 1 % об. этанола. Культивирование проводили 12 ч. Для получения инокулята, используемого в опытах, колбы с питательной средой и источником углерода засеивали суспензией клеток, исходная концентрация биомассы — 0,1 мг/мл, дрожжи культивировали 18 ч. Полученную таким образом суспензию биомассы центрифугировали, промывали дважды водой для удаления остатков питательной среды и суспендировали в 50 мМ МЭС буфере, pH — 5,5. Кобальт вносили в среду в концентрации  $2 \div 100$  мкг/мл в форме  $\text{CoSO}_4$  с изотопом-индикатором  $^{57}\text{Co}$ . Концентрация клеток в опыте составляла 2 мг/мл. Инкубировали клетки при  $t=30$  °С в течение 30 мин. Через определенные временные интервалы отбирали аликвоты дрожжевой суспензии, центрифугирова-

ли, осадок дважды промывали дистиллированной водой. Радиоактивность его измеряли на радиометре Компью-Гамма (ЛКБ, Швеция). Количество кобальта рассчитывали, используя предварительно определенную массовую удельную активность исходного раствора этого металла.

В опытах, в которых изучали влияние других ионов на транспорт  $\text{Co}^{2+}$ , металлы вносили в эквимоллярных концентрациях (суммарная концентрация ионов металлов была равна соответствующей концентрации  $\text{Co}^{2+}$  в контроле, т. е. молярное соотношение металлов составляло 1:1). Исследуемые металлы ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) использовали в виде сульфатов.

В опытах по выявлению специфичности системы транспорта  $\text{Co}^{2+}$  цинк был мечен радиоактивным изотопом  $^{65}\text{Zn}$ . Методика определения радиоактивности цинка и расчет его количества были аналогичны такому для кобальта.

## Результаты

Из литературных данных известно [3, 6, 10], что двухвалентные металлы, такие как  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , поглощаются в результате двухстадийного процесса. Причем 1-я стадия поглощения не зависит от метаболической энергии и состоит из физической сорбции катионов поверхностью дрожжевой клетки, 2-я — транспорт через плазмолему внутрь клетки — осуществляется с затратой метаболической энергии, подавляется ингибиторами АТФ-азы и зависит от трансмембранного протонного градиента.

Установлено, что транспорт  $\text{Co}^{2+}$  в клетки дрожжей *S. utilis* и *T. fatata* также является энергозависимым процессом.

Для дрожжей *S. utilis* (рис. 1)

поступление кобальта из раствора существенно подавлялось как в отсутствие источника углерода — глюкозы, так и при наличии в среде ингибиторов дыхания ( $\text{NaN}_3$ ) или АТФ-азы (ДЭС), и при понижении температуры. Аналогичные результаты получены и для культуры *T. fatata*.

Исследование кинетики транспорта  $\text{Co}^{2+}$  для двух культур показало, что этот процесс описывается уравнением Михаэлиса—Ментена. Кинетические константы транспорта, получаемые при помощи данного уравнения, являются удобными параметрами для сравнения различных культур.

Максимальные скорости транспорта у дрожжей *T. fatata* и *S. utilis* близки (рис. 2) и равны соответственно 2,0 и 1,7 мМол/г·мин. Однако константы Михаэлиса значительно различаются: для культуры *T. fatata*  $K_m = 0,69$  мМоля, а для *S. utilis*  $K_m = 0,15$  мМоля. Это свидетельствует о том, что половина максимальной скорости поступления  $\text{Co}^{2+}$  в клетки дрожжей *T. fatata* достигается при концентрации кобальта в среде, которая в 4,6 раза выше, чем для дрожжей *S. utilis*. Таким образом, транспорт кобальта у культуры *T. fatata* менее эффективен, чем у *S. utilis*.

Обнаруженное нами явление затрудненного транспорта  $\text{Co}^{2+}$  у дрожжей *T. fatata*, по-видимому, в известной степени объясняет резистентность *T. fatata* к высоким концентрациям металла в среде [2].

Большой интерес представляет выяснение специфичности транспортной системы для переноса ионов кобальта внутрь клетки и возможности конкурентного ингибирования другими металлами. Как отмечается в литературе [8], в дрожжевых клетках у каждого

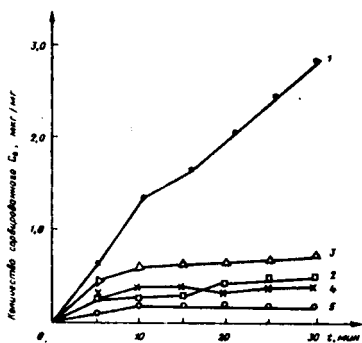


Рис. 1. Поглощение  $\text{Co}^{2+}$  клетками дрожжей *S. utilis*.

1 — контроль; 2 — при отсутствии глюкозы; 3 — в присутствии  $\text{NaN}_3$ ; 4 — в присутствии  $\text{D}_2\text{S}$ ; 5 — при  $t = 4^\circ\text{C}$ .

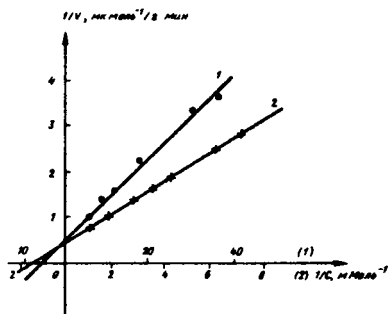


Рис. 2. Кинетика поглощения  $\text{Co}^{2+}$  дрожжами.

1 — *S. utilis* ( $K_m = 0,15$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 1,7 \times 10^{-3}$  мМоль/г·мин); 2 — *T. farfata* ( $K_m = 0,69$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 2,0 \cdot 10^{-3}$  мМоль/г·мин).

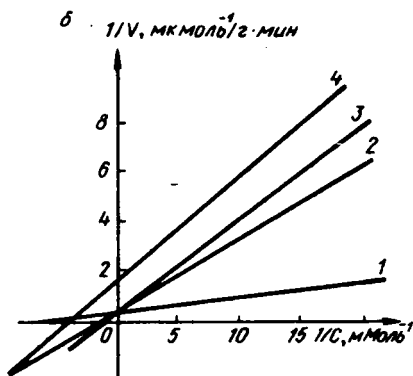
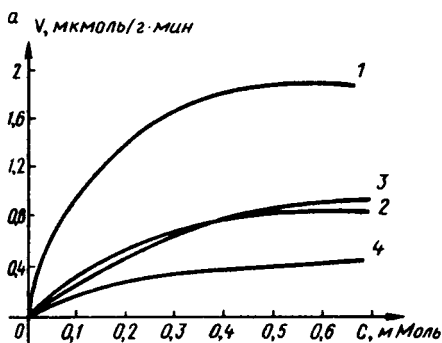


Рис. 3. Кинетика поглощения  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  дрожжами *S. utilis*.

а — в форме  $V=f(c)$ ; б — в форме  $1/v=f(1/c)$ ; 1 —  $\text{Zn}^{2+}$  ( $K_m = 0,172$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 2,5 \times 10^{-3}$  мМоль/г·мин); 2 —  $\text{Co}^{2+}$  ( $K_m = 0,625$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 2,5 \cdot 10^{-3}$  мМоль/г·мин); 3 —  $\text{Zn}^{2+}$  в смеси  $\text{Co}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  ( $K_m = 1,25$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 2,3 \cdot 10^{-3}$  мМоль/г·мин); 4 —  $\text{Co}^{2+}$  в смеси  $\text{Co}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  ( $K_m = 0,263$  мМоль,  $V_{\text{max}} = 0,63 \cdot 10^{-3}$  мМоль/г·мин).

катиона может быть своя система транспорта. Однако в зависимости от изучаемого вида дрожжей или использованного диапазона концентраций металла один и тот же ион может в одном случае иметь свою высокоспецифичную систему транспорта, а в другом — использовать

транспортную систему другого катиона.

Проведенные нами исследования транспорта  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  на культуре *S. utilis* показали (рис. 3, а), что скорость включения ионов  $\text{Zn}^{2+}$  почти в 2 раза выше, чем ионов  $\text{Co}^{2+}$ . Это свидетельствует о боль-

шем средстве системы транспорта к  $Zn^{2+}$ , чем к  $Co^{2+}$ . Большое сорбционное средство клеточной стенки дрожжей *S. utilis* к  $Zn^{2+}$ , чем к  $Co^{2+}$ , отмечалось нами ранее при исследовании сорбции металлов дрожжами *S. utilis* [9]. Возможно, первая стадия поступления металла (сорбция на клеточной поверхности) в значительной степени предопределяет и транспорт через цитоплазматическую мембрану.

Поведение каждого иона при инкубации дрожжевых клеток в среде, содержащей смесь ионов  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , изучалось в двух аналогичных вариантах: в одном случае меченым радиоактивным изотопом был кобальт, а в другом — цинк. Установлен различный тип ингибирования для этих металлов. В случае сравнения прямых, соответствующих включению  $Zn^*$  и  $Zn^* + Co^{2+}$  (рис. 3, б), имело место конкурентное ингибирование [1]. Константа Михаэлиса при добавлении  $Co^{2+}$  увеличивалась почти в 7 раз. При сравнении прямых, соответствующих включению  $Co^*$  и  $Co^* + Zn^{2+}$ , видно, что ингибирование носит смешанный характер — неконкурентное — бесконкурентное. Максимальная скорость при добавлении  $Zn^{2+}$  уменьшалась в 4 раза. Очевидно, можно предположить, что перенос  $Co^{2+}$  может осуществляться транспортной системой  $Zn^{2+}$ , который не использует систему переноса  $Co^{2+}$  и оказывает ингибирующий эффект на скорость включения  $Co^{2+}$ . Таким образом, можно говорить о высокоспецифичном транспорте ионов цинка, что согласуется с данными, полученными авторами [5] также на культуре *S. utilis*.

Однако результаты изучения транспорта  $Zn^{2+}$  на культуре *S. cerevisiae* [4] доказывают обратное.

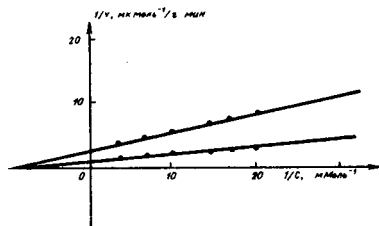


Рис. 4. Действие ионов  $Mn^{2+}$  на поглощение  $Co^{2+}$  дрожжами *S. utilis*.

1 —  $Co^*$  ( $K_m = 0,14$  ммоль,  $V_{max} = 1,0 \times 10^{-3}$  ммоль/г·мин); 2 —  $Co^* + Mn$  ( $K_m = 0,13$  ммоль,  $V_{max} = 0,48 \cdot 10^{-3}$  ммоль/г·мин).

Возможно, это различие объясняется использованием разных видов дрожжей.

При исследовании влияния  $Mn^{2+}$  на транспорт  $Co^{2+}$  у дрожжей *S. utilis* (рис. 4) было установлено, что  $Mn^{2+}$  ингибирует поступление  $Co^{2+}$  в клетку, но это ингибирование неконкурентное. Вероятно,  $Mn^{2+}$  не использует для переноса транспортную систему  $Co^{2+}$ , однако для полного понимания этого механизма необходимы опыты по изучению транспорта  $Mn^{2+}$ , аналогичные тем, которые были проведены с  $Zn^{2+}$ . По имеющимся литературным сведениям [6], транспорт  $Mn^{2+}$  у дрожжей *S. utilis* имел низкую специфичность и ингибировался ионами  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ .

Таким образом, рассмотрев транспорт  $Co^{2+}$  на культурах *S. utilis* и *T. fatata*, а также изучив влияние на транспорт  $Co^{2+}$  других ионов, можно сделать вывод, что  $Zn^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  оказывают ингибирующий эффект на поглощение кобальта, но при этом меняется тип ингибирования в зависимости от конкурирующего иона. По-видимому, транспортная система  $Co^{2+}$  не обладает высокой специфичностью и может использоваться другими катио-

нами для переноса, в то время как сам ион  $\text{Co}^{2+}$  также может транспортироваться за счет системы переноса других металлов (например, использовать транспортную систему  $\text{Zn}^{2+}$ ).

Вопрос специфичности, однако, очень сложный, и для получения однозначного ответа на него необходимо исследовать влияние других, не рассмотренных нами, катионов на транспорт  $\text{Co}^{2+}$  в клетки, и выявить взаимосвязанность сорбции и транспортной системы, т. е. влияние клеточной стенки на транспорт металла через цитоплазматическую мембрану.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Доус Э. Количественные проблемы биохимии.— М.: Мир, 1983.— 2. Каспа-

рова С. Г., Давидова Е. Г. Накопление и внутриклеточное распределение кобальта в клетках дрожжей.— Изв. ТСХА, 1990, вып. 1, с. 119—122.— 3. Barton L. L., Saiz B. L.— Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1986, p. 310.— 4. Borst-Pauwels G. W. F. H.— Biochem. Biophys. Acta, 1981, vol. 650, p. 88—127.— 5. Failla M. L., Weinberg E. D.— J. Gen. Microbiol., 1977, vol. 99, p. 85—97.— 6. Parkin M. J., Ross I. S.— J. Microbios Letters, 1985, vol. 29, p. 115—188.— 7. Ross I. S.— International Ind. Biotechnology, 1986, p. 184—188.— 8. Silver S.— Bacterial Transport, 1978, p. 222—324.— 9. Toneva-Davidova E. G., Belov A. P., Casparova S. G.— Abstracts 4th Leipzig Symposium on Biotechnology.— Cell Envelope-Mediator and Sign of Cellular Productivities, 1988, p. 12.— 10. White C., Gadd G. M.— J. Microbiol., 1987, vol. 133, p. 727—737.

Статья поступила 29 мая 1990 г.

#### SUMMARY

Kinetics of active transportation of  $\text{Co}^{2+}$  into cells of *C. utilis* and *T. f. m. a t a* yeast was studied. Using Mikhaelis—Menten equation, kinetic constants of  $\text{Co}^{2+}$  transportation have been obtained; these constants have shown that in *T. f. m. a t a* transportation of  $\text{Co}^{2+}$  is less efficient than that in *C. utilis*.