

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. С. ЛОЙЦЯНСКАЯ

О ПЕРВЫХ СТАДИЯХ РАЗЛОЖЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ *SPIROCHAETA*  
*CYTOPHAGA*

(Представлено академиком Г. А. Надсоном 2 I 1937)

Среди многочисленных микроорганизмов, способных разлагать клетчатку, центральное место по активности и распространенности в почвах занимает аэробный микроорганизм *Spirochaeta cytophaga*, впервые подробно изученный Hutchinson'ом и Clayton'ом (1). По данным этих авторов, целлюлоза под воздействием *Spirochaeta cytophaga* превращается в желтую слизистую массу, не восстанавливающую раствор Фелинга и содержащую летучие кислоты, преимущественно масляную.

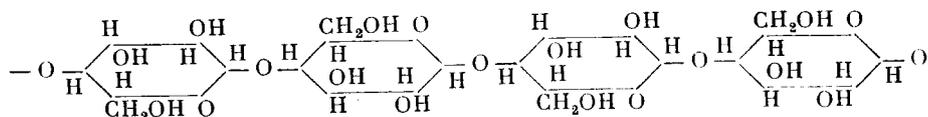
Виноградский (2), изучая продукты разложения целлюлозы при действии того же микроорганизма, пришел к выводу, что целлюлоза превращается в коллоидный продукт, обладающий некоторыми свойствами оксидцеллюлозы, являющийся лишь промежуточным веществом, которое затем превращается в конечный стойкий продукт.

Предметом нашего исследования явилось изучение биохимического распада целлюлозы под воздействием чрезвычайно активного штамма *Sp. cytophaga*, выделенного из прудового ила и содержащего в незначительном количестве в качестве спутника мелкую палочку, не способную самостоятельно воздействовать на целлюлозу.

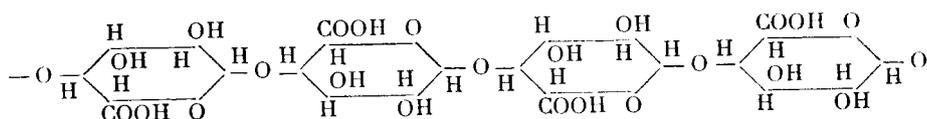
Полученный нами слизистый продукт желтого цвета был не растворим в воде, эфире и спирте. Он растворялся в горячем однопроцентном растворе NaOH. После нейтрализации раствор мутнел, и при подкислении выпадал хлопьевидный осадок. Полученный продукт не содержал по нашим определениям летучих и нелетучих кислот и не восстанавливал раствор Фелинга. Глюкоза, внесенная в обычную питательную среду в ничтожных дозах—до 0,05%, действовала на *Spirochaeta cytophaga* токсически. Эти два обстоятельства исключили предположение о гидролизе целлюлозы и последующем использовании образующейся глюкозы.

Виноградский предполагал (3), что *Spirochaeta cytophaga* не гидролизует молекулы целлюлозы, а только окисляет ее. Этот процесс через промежуточный продукт типа оксидцеллюлозы может вести к образованию окончательного продукта гуминовой природы. Согласно мицеллярной теории, обоснованной в новейшее время рентгеноскопически и химически Мейером и Марком (4), строение целлюлозы можно изобразить следующей формулой:

$[(C_6H_{10}O_5)_x]_y$ , где  $x$ —коэффициент полимеризации—от 60 до 100, а  $y$ —коэффициент ассоциации—от 40 до 60, или:

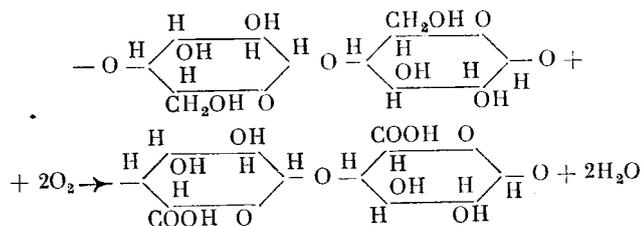


Ряд родственных целлюлозе веществ, находящихся в растительных тканях, по мнению Мейера и Марка имеет сходное с ней строение. Такими веществами являются пентозаны и полиглюкуроновая кислота, отличающаяся от целлюлозы только тем, что находящиеся снаружи группы  $\text{CH}_2\text{OH}$  окислены в карбоксильные:



Полиглюкуроновая кислота была получена Kalb'ом и Falkenhausen'ом<sup>(3)</sup> путем окисления целлюлозы, растворенной в швейцеровом реактиве, перманганатом. Образование полиглюкуроновой кислоты было возможно лишь в случае медленного, равномерного окисления всей мицеллы. В случае же более энергичного окисления образовывалась так наз. оксигеллюлоза.

Совершенно неоспоримо то, что в случае воздействия *Sp. cytophaga* на целлюлозу происходит окисление. Если принять, что *Sp. cytophaga*, воздействуя на целую молекулу целлюлозы, не гидролизует ее; то можно предположить, что, как и в случае химического окисления, прежде всего происходит окисление свободных спиртовых групп, которое приводит к образованию полиглюкуроновой кислоты. Тогда первую стадию разложения целлюлозы можно представить в виде следующей реакции:



Полиглюкуроновая кислота не обладает восстановительной способностью. Гидролиз ее приводит к образованию глюкуроновой кислоты, к освобождению альдегидных групп и следовательно к появлению восстановительной способности.

Как уже указывалось выше, желтый слизистый продукт превращения целлюлозы никогда не восстанавливает фелингова раствора. Но после его гидролиза нами всегда наблюдалось значительное восстановление раствора Фелинга.

Опыт I был поставлен следующим образом. Кремневые пластинки, пропитанные минеральным раствором, были покрыты кружками фильтровальной бумаги. Вес бумаги составлял 4.39 г. В пробирку со стерильной водой было внесено небольшое количество посевного материала; после взбалтывания взвесь из пипетки разбрызгивалась по кружку бумаги и равномерно распределялась на нем стеклянным шпателем с тем расчетом, чтобы произошло сплошное заражение. Культивирование велось в термо-

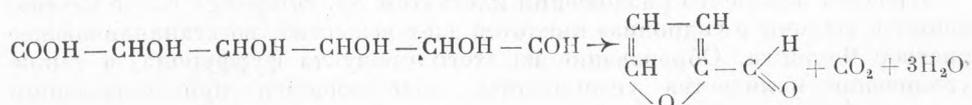
стате при 30°. Уже через 48 час. в отдельных местах было заметно пожелтение, а через 72—80 час. вся бумага совершенно пожелтела. Через 10 дней образовавшаяся желтая слизь растворялась в 150 см<sup>3</sup> горячего 1% раствора NaOH. Несколько мутный раствор два раза фильтровался и затем нейтрализовался серной кислотой. Следующие операции сводились к определению редуцирующей способности по Бертрану. Для этого раствор был разделен на 4 порции по 50 см<sup>3</sup>. В первой проведено определение редуцирующей способности до гидролиза. Ко второй было добавлено 5 см<sup>3</sup> 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, к третьей—10 см<sup>3</sup> 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, к четвертой—10 см<sup>3</sup> концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и эти три порции были подвергнуты нагреванию на кипящей водяной бане в течение одного часа. Затем и в них было проведено определение редуцирующей способности. Результаты опыта приведены в табл. 1.

Таблица 1

№ порции	Прибавлено H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> в см <sup>3</sup>	Восстановлено меди в мг	Глюкуроновая кислота по расчету в мг
1	0	0	0
2	10(5%)	47.90	25.86
3	10(10%)	63.92	35.00
4	10 (концентр.)	200.07	114.20

Как видно из табл. 1, увеличивающийся гидролиз приводит к росту восстанавливающей способности, что указывает на то, что после гидролиза щелочной вытяжки продуктов аэробного превращения целлюлозы образуются восстанавливающие раствор Фелинга вещества.

Мы предположили, что этим веществом является глюкуроновая кислота, образующаяся при гидролизе из полиглюкуроновой. Характерным свойством всех уроновых кислот является их способность при нагревании с соляной кислотой распадаться на фурфурол, углекислоту и воду:



Для того чтобы убедиться, что здесь образуется полиглюкуроновая кислота, необходимо было доказать, что при нагревании продукта превращения с соляной кислотой имеет место образование фурфурола. Определение проводилось по методу Kröberg-Tollens'a. В контрольном определении было установлено, что использованная в опыте фильтровальная бумага содержит незначительное количество веществ, которые при нагревании с HCl образуют 0.34% фурфурола.

Постановка опытов была та же, что в описанном выше опыте.

В полученной слизи желтого цвета проводилось определение содержания фурфурола по методу Kröberg-Tollens'a. По весу фурфуролфлорглюцида определялось соответствующее количество фурфурола (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что в процессе воздействия *Sp. cytophaga* на целлюлозу увеличивается (по отношению к неизменной целлюлозе) количество образующегося фурфурола, которое при пересчете на глюкуроновую кислоту достигает в одном из опытов 2.44% от взятой целлюлозы.

Таблица 2

Вес бумаги до разлож. в г	Фурфурол-флорглюцид в мг	Фурфурол		Глюкуроновая кислота по расчету	
		в мг	в %	в мг	в %
3.61	48.4	28.0	0.77	56.6	1.66
4.1	51.5	29.4	0.72	69.8	1.70
4.13	71.6	39.7	0.96	80.2	1.94
4.02	88.5	48.7	1.21	98.4	2.44

Ввиду того что при разрушении глюкуроновой кислоты кроме фурфурола образуется и углекислота, было проведено также определение количества углекислоты, которое при этом выделяется. Определение проводилось по методу Lefevre-Tollens'a. Предварительно в контрольном опыте было определено количество CO<sub>2</sub>, образующееся из неизменной бумаги. Оказалось, что оно составляет 0.55% от взятой навески бумаги.

Для определения количества CO<sub>2</sub>, выделяющегося из продукта превращения целлюлозы, был поставлен ряд опытов в аналогичных описанным выше опытам. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Вес бумаги до разлож. в г	Выделилось CO <sub>2</sub>	
	в мг	в %
4.08	44.68	1.09
4.16	39.93	0.96
4.82	59.51	1.23

Из приведенных опытов следует заключить, что в процессе разложения целлюлозы увеличивается количество веществ, которые разлагаются при нагревании с соляной кислотой и выделяют при этом углекислоту.

Продукт аэробного разложения клетчатки *Sp. cytophaga* после растворения в щелочи и гидролиза кислотой дает вещество, восстанавливающее раствор Фелинга. Образование из этого продукта фурфурола, а также увеличение количества углекислоты, выделяющейся при нагревании с соляной кислотой, дают основание предполагать, что первой стадией процесса разложения целлюлозы *Sp. cytophaga* является окисление ее до полиглюкуроновой кислоты. В следующих стадиях разложения полиглюкуроновая кислота подвергается изменениям, которые должны быть изучены в дальнейшем.

Изложенная работа проведена под руководством проф. Н. Н. Иванова, которому автор приносит свою глубокую благодарность.

Микробиологическая лаборатория  
Ленинградского государственного университета

Поступило  
2 I 1937.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Hutchinson a. Clayton, Agr. Science, 9 (1919). <sup>2</sup> S. Winogradsky, Extrait des Annales de l'Inst. Pasteur, XLIII (1929). <sup>3</sup> S. Winogradsky, Extrait des Annales de l'Inst. Pasteur, XXX (1932). <sup>4</sup> Мейер и Марк. Строение высокополимерных органич. соедин. (1932). <sup>5</sup> Kalb u. Falkenhausen, Ber. der Deut. Chem. Gesellschaft, 60, № 11 (1927).