

БИОХИМИЯ

В. С. БУТКЕВИЧ, член-корреспондент Академии Наук СССР, Е. В. МЕНЖИНСКАЯ и Е. И. ТРОФИМОВА

ГЛЮКУРОНОВАЯ КИСЛОТА КАК ПРОМЕЖУТОЧНАЯ СТУПЕНЬ ПРИ БИОХИМИЧЕСКОМ ОБРАЗОВАНИИ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ САХАРА

После того как нашими исследованиями^(1, 2, 3, 4) было показано, что схемы, принимающие при биохимическом образовании лимонной кислоты из сахара его предварительное расщепление по типу спиртового брожения, не соответствуют действительности и что в образовании кислоты участвует вся углеродная цепь сахара, область возможных предположений при истолковании перехода от сахара к лимонной кислоте ограничена схемами, удовлетворяющими только что указанному условию. К таким схемам, конструирующим процесс образования лимонной кислоты с участием в нем всей частицы сахара, относятся схема Рейстрика-Виртанена^(5, 6), схема Францена и Шмитта⁽⁷⁾ и схема Буткевича⁽⁸⁾.

Схема Рейстрика-Виртанена, принимающая предварительное расщепление гексозы на щавелевоуксусную и уксусную кислоты с последующей конденсацией их в молекулу лимонной кислоты, получила известное подтверждение в работе Кноопа и Мартиуса⁽⁹⁾, осуществивших соответствующий синтез химическим путем. Однако в последнее время, вопреки данным Кребса⁽¹⁰⁾ о наличии аналогичного процесса в животных тканях, Брейшем⁽¹¹⁾ показано, что этот синтез, протекающий в известных условиях как химический процесс, не осуществляется в физиологических условиях.

Схема Францена и Шмитта, проводящая процесс превращения сахара в лимонную кислоту через сахарную и кетициновую кислоты, не получила подтверждения в исследованиях Бернгауера⁽¹²⁾. Для нее не нашел также экспериментального обоснования и принимавший ее одно время Уокер⁽¹³⁾.

По схеме Буткевича допускается альдольная конденсация в углеродной цепи гексозы через имеющуюся в ней или образующуюся путем соответствующего окисления альдегидную или кетонную группу и последующее расщепление возникающего таким образом пятичленного кольца с образованием свойственной лимонной кислоте разветвленной цепи.

При обсуждении этой схемы ее автором между прочим было указано на глюкуроновую кислоту как на одну из возможных промежуточных ступеней, предусматриваемых схемой превращения. Это предположение и послужило основанием для описываемых ниже опытов с воздействием грибной пленки на подведенный под нее раствор глюкуроновой кислоты.

В литературе имеется сообщение Гофмана⁽¹⁴⁾ об опытах с культурой *Asperg. niger* на глюкуроновой кислоте. В культуре обнаружена лишь щавелевая кислота и не обнаружено лимонной. В данном случае однако отрицательный результат по отношению к последней нельзя считать решающим, так как опыт был слишком продолжительным (35 дней при 25°). В этих условиях лимонная кислота в случае ее образования могла окислиться в щавелевую.

В наших опытах наряду с глюкуроновой испытана и глюконовая кислота. Первая получена по способу, описанному в работе Куика⁽¹⁵⁾, из мочи собаки, к корму которой добавлялся борнеол; последняя—из проведенной в соответствующих условиях культуры *Asperg. niger*⁽¹⁶⁾. И та и другая кислота вводились в опытный раствор в виде натриевых солей. Наряду с солями этих кислот в опытный раствор вводился также ацетат натрия (в концентрации, соответствующей 2.5% уксусной кислоты) для защиты образующейся лимонной кислоты от потребления [см. наши предыдущие работы⁽¹⁾].

Таблица 1

Опыт с глюконовой кислотой

| Опытный раствор первоначальный 100 см ³ | | Опытный раствор по истечении 24 час. (30°) | | | | | |
|---|--|--|------------|---------------------|----------------------|------------------|---------------|
| | | Уксусная кислота, % | Глюкоза, % | Лимонная кислота, % | Щавелевая кислота, % | Реакция раствора | Вес пленки, г |
| Ацетат Na (уксусной кислоты 2.5%) | — | 1.73 | — | 0 | 0.20 | Щелочная | 0.90 |
| | Глюкоза 2.5% | 1.96 | 1.45 | 0.08 | 0.06 | Кислая | 0.92 |
| | Глюконовая кислота 2.5% (в виде соли Na) | 1.50 | — | 0.03 | 0.30 | Щелочная | 1.02 |
| | Глюкоза 5% | — | 3.22 | 0.14 | 0 | Кислая | 1.36 |

Таблица 2

Опыт с глюконовой и глюкуроновой кислотами

| Опытный раствор первоначальный 100 см ³ | | Опытный раствор по истечении 24 час. (33°) | | | | | | |
|---|--|--|------------|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------|---------------|
| | | Уксусная кислота, % | Глюкоза, % | Глюкуроновая кислота, % | Лимонная кислота, % | Щавелевая кислота, % | Реакция раствора | Вес пленки, г |
| Ацетат Na (уксусной кислоты 2.5%) | — | 1.15 | — | — | 0 | 0.48 | Щелочная | 0.84 |
| | Глюкоза 1% | 1.38 | 0.15 | — | 0.12 | 0.34 | » | 1.02 |
| | Глюконовая кислота 1% (в виде соли Na) | 1.47 | — | — | 0.02 | 0.37 | » | 0.81 |
| | Глюкуроновая кислота 1% (в виде соли Na) | 1.27 | — | 0.83 | 0.02 | 0.31 | » | 0.90 |

Сухой вес первоначальных (контрольных) пленок 0.96 г.

Глюкуроновая кислота определялась количественно методом Бертрана по таблице Кэртежа⁽¹⁷⁾.

В выдержанных под пленками опытных растворах с 2% глюкозы и с 2% свободных глюконовой и глюкуроновой кислот без ацетата лимонной кислоты не обнаружено.

Опыты проводились в обычно употребляемых нами эллипсоидальных колбах с тубусом внизу для смены растворов. В них предварительно в течение трех дней в первом опыте и двух дней во втором выращивались пленки *Asperg. niger* (штамм IV) на обычном питательном растворе с 5% сахара и с 0.3% NH_4NO_3 . Под выращенными пленками питательный раствор (75 см³), после удаления его и обмывания пленок, заменялся опытным раствором (100 см³), состав которого указан в приведенных выше таблицах. Температура, при которой пленки выращивались и выдерживались на опытных растворах, в первом опыте была около 30°, во втором—около 33°. В том и другом опыте пленки выдерживались на опытных растворах 24 часа, после чего растворы сливались и подвергались анализу. Результаты, представляющие средние из двух параллельных опытов, сведены в табл. 1 и 2.

Как видно из приведенных результатов некоторое накопление лимонной кислоты имелось в опытных растворах как с глюконовой, так и с глюкуроновой кислотой, но оно было выражено значительно слабее, чем в растворах с глюкозой той же концентрации.

Результаты опытов не дают таким образом основания для решения поставленного вопроса об участии глюкуроновой кислоты в образовании лимонной кислоты из глюкозы в положительном смысле, но в то же время они не являются достаточным основанием и для отрицательного решения вопроса. При данной постановке опыта накопление лимонной кислоты в растворе определялось не только протекавшим в клетках превращением испытуемого вещества в кислоту, но и диффузией этого вещества из раствора в клетки. Более слабое накопление лимонной кислоты на растворе глюкуроновой кислоты по сравнению с раствором глюкозы могло обуславливаться в первую очередь более медленным прониканием первой в клетки мицелия. За это в известной степени говорит весьма слабое, по сравнению с глюкозой, потребление глюкуроновой кислоты грибной пленкой вообще. Их потребление во втором опыте из растворов одинаковой концентрации выражается соответственно величинами 0.85 и 0.17 г.

Насколько значительной может быть разница в скорости проникания в живые клетки различных веществ, даже близких по своему характеру и отличающихся лишь незначительными особенностями структуры, видно из данных Гамбургера⁽¹⁸⁾ для изомерных форм глюкозы и из недавно опубликованной работы Сobotка, Хольцмана и Рейнера⁽¹⁹⁾. В опытах последних с дрожжевыми клетками и различными сахарами показано, что скорость диффузии в эти клетки для глюкозы и ксилозы в несколько раз выше, чем для рамнозы и арабинозы.

Наряду с приведенными выше соображениями нужно иметь в виду и то, что в превращениях, предусматриваемых интересующей нас схемой, может быть допущено участие помимо испытанной нами *d*-глюкуроновой кислоты и других соединений. На это автором схемы указывалось уже и раньше⁽⁹⁾, и в исследованиях последнего времени можно найти некоторые новые указания относительно возможного характера этих соединений. Относящиеся сюда данные будут рассмотрены одним из нас в особом сообщении.

Поступило
9 II 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Butkewitsch, Menzhinskaja u. Trofimowa, *Bioch. ZS.*, **272**, 290, 364 (1934); **276**, 446 (1935). ² Буткевич и Гаевская, *ДАН*, III, № 9, 405 (1935). ³ Буткевич, *ДАН*, III, № 9, 405 (1936). ⁴ Барина и Буткевич, *Микробиология*, **5**, 768 (1936). ⁵ Raistrick a. Clark, *Bioch. Journ.*, **13**, 329

(1919). ⁶ Virtanen a. Pulkki, Ann. Acad. Sci. Fennicae, A. **33**, № 3 (1930).
⁷ Franzen u. Schmitt, Ber. d. D. chem. Ges., **58**, 222 (1925). ⁸ Butkewitsch,
Bioch. ZS., **145**, 442; **154**, 177 (1924); Jahrb. wiss. Bot., **64**, 637 (1925.) ⁹ Knoop
u. Martius, ZS. physiol. Chem., **242**, 204 (1936). ¹⁰ Krebs, Enzymologia, **4**,
148 (1937). ¹¹ Breusch, ZS. physiol. Chem., **250**, 262 (1937). ¹² Bernhauer,
Siebenäuger u. Tschinkel, Bioch. ZS., **230**, 466 (1931). ¹³ Walker,
Subramaniam a. Chalenger, Journ. Chem. Soc., **200**, 3044 (1927). ¹⁴ Hof-
mann, Bioch. ZS., **243**, 423 (1931). ¹⁵ Quick, Journ. Biol. Chem., **74**, 331 (1927).
¹⁶ Kardo-Sysoeva, Bioch. ZS., **266**, 337 (1933). ¹⁷ Kertesz, Journ.
Biol. Chem., **108**, 127 (1935). ¹⁸ Hamburger, Erg. d. Physiol., **23**, 77, 120 (1924).
¹⁹ Sobotka, Holzman a. Reiner, Bioch. Journ., **30**, 933 (1936).