

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

С. Д. ЛЬВОВ и Е. Л. ЛИМБЕРГ

ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЛИМОННОЙ, ГЛЮКОНОВОЙ И ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТ У *ASPERGILLUS NIGER*

(Представлено академиком А. А. Рихтером 13 IX 1938)

Глюконовая кислота образуется из глюкозы путем прямого окисления альдегидной группы в карбоксильную, причем эта реакция осуществляется при помощи особого фермента, выделенного из плесневых грибов Д. Мюллером⁽¹⁰⁾ и названного им глюкооксидазой. Из фруктозы непосредственно глюконовая кислота не образуется, также и из других сахаров. Лимонная кислота лучше всего образуется за счет всех тех сахаров, которые являются субстратом спиртового брожения (глюкоза, фруктоза, манноза, сахароза), или же за счет более простых веществ С₃-ряда (глицерин, глицероза), которые можно рассматривать как продукты брожения.

По вопросу о химизме образования лимонной кислоты в течение уже многих лет идет оживленная дискуссия между двумя основными теориями—бродильной и теорией прямого окисления. Согласно первой, молекулы сахара сначала под воздействием бродильных ферментов распадаются на более простые соединения, а затем уже эти последние путем синтетических реакций, сопровождающихся окислением, дают начало органическим кислотам, как С₄-ряда (янтарной, fumarовой, яблочной и др.), так и С₆-ряда (лимонной, глютаровой, аконитовой и др.). Эта теория таким образом связывает общим происхождением весь комплекс органических кислот, встречающихся в растениях, и является в этом отношении унитарной теорией. В высших растениях (плодах, листьях) очень часто также кислоты С₄- и С₆-ряда, как яблочная и лимонная, встречаются вместе и, повидимому, имеют общее происхождение.

Серьезным аргументом в пользу унитарного происхождения кислот С₄- и С₆-ряда являются новейшие исследования Szent-Györgyi⁽¹¹⁾ и Кребса⁽⁷⁾, которые показали, что органические кислоты связаны с процессом бродильного и окислительного распада углеводов в животных тканях. По данным Кребса кислоты С₄- и С₆-ряда принимают ближайшее участие в процессе окисления промежуточных продуктов, получаемых при бродильном распаде углеводов, причем кислоты С₆-ряда, начиная с лимонной, постепенно упрощаются до кислот С₄-ряда, а последние, реагируя с бродильными продуктами и обогащаясь за их счет углеродными атомами, снова преобразуются в лимонную кислоту как начальный этап этих циклических превращений. Breusch⁽²⁾, правда, возражает против этой теории циклов, но и он не отрицает основного факта—стимулирующего

воздействия органических кислот на распад углеводов в животных тканях.

Теория прямого окисления, энергично отстаиваемая в течение многих лет В. С. Буткевичем, разрывает связь между лимонной кислотой и кислотами C_4 -ряда и до некоторой степени сближает лимонную кислоту по характеру ее образования с глюконовой. Процессы бродильного распада, имеющие место у плесневых грибков, по мнению Буткевича не имеют никакого отношения к возникновению лимонной кислоты, которая образуется путем прямого окисления целостной молекулы гексозы в сочетании с некоторыми внутримолекулярными ее преобразованиями. Теория прямого окисления в своей борьбе с бродильной теорией прежде всего использует те противоречия, которые возникли внутри самой бродильной теории [несоответствие между выходом лимонной кислоты и количеством затраченного сахара; несоответствие между выходом лимонной кислоты и количеством выделившейся CO_2 (3, 6, 12)]. Краткий обзор и анализ этих критических соображений, направленных против бродильной теории, имеется в двух статьях одного из нас (8, 9). Здесь достаточно лишь отметить, что значение этих аргументов в значительной мере поколеблено новейшими работами самого Буткевича (4), который показал, что образование лимонной и других кислот у плесневых грибков идет не прямо за счет субстрата, а за счет веществ, предварительно ассимилированных из внешней среды мицелием грибка. Иначе говоря, учитывая баланс образования лимонной кислоты, мы вместе с тем учитываем и баланс всех тех неизвестных нам реакций, из которых состоит процесс ассимилирования. При таких сложных условиях вряд ли можно рассчитывать на получение строго выдержанных стехиометрических соотношений между продуктами одной интересующей нас реакции.

Дискуссия между двумя теориями в своей основе сводится к вопросу, принимает ли участие в образовании лимонной кислоты у плесневых грибков бродильный аппарат или нет. Для образования глюконовой кислоты он безусловно не требуется. Сходно ли в этом отношении ведет себя лимонная кислота?

Для выяснения этого вопроса мы задались целью проследить влияние различных бродильных факторов на накопление кислот, продуцируемых плесневыми грибами, в первую очередь лимонной и глюконовой.

В этой работе мы остановились на фосфатах, которые, как давно известно, стимулируют процесс брожения. В качестве объекта мы использовали расу *Aspergillus niger*, которая служит основой производства на заводе лимонной кислоты в Ленинграде. Под готовые пленки гриба, предварительно выращенного на обычном питательном растворе, вводился затем в количестве 100 см³ или раствор одной 20% сахарозы (контроль) или той же сахарозы с добавкой неорганического фосфата (KH_2PO_4) концентрации 0.5, 0.75 или 1% в разных опытах. Колбы выдерживались в термостате при 30—32°. Через разные сроки в разных опытах производились определения сухого веса пленки, остаточного сахара по Бертрану, общей кислотности титрованием, кислот лимонной, глюконовой и щавелевой методом Буткевича. В виду однородности полученных результатов мы не описываем отдельно каждого опыта, но приводим сводные таблицы, где все опыты одинаковой длительности и с одинаковой концентрацией фосфатов суммированы вместе. Так, с фосфатами 0.5% концентрации суточных опытов (24 часа) было проведено четыре. Соответствующие цифры в таблицах выражают сумму четырех средних величин, полученных по каждому из этих 4 опытов.

Как видно из цифровых данных таблицы, в присутствии фосфатов сахаров расходуется значительно больше, особенно в первые часы опыта

Сводная таблица по двадцати восьми опытам

Время опыта в час.	Копч. фосфат. в %	Число опытов	Потреблено сахара в г		Разница в %	Общая кислотность в см ³ л/10 щелочи		Разница в %	Найдено щавелевой кислоты в г		Разница в %	Найдено лимонной кислоты в г		Разница в %	Число опытов	Найдено глюконовой кислоты в г		Разница в %
			без фосф.	с фосф.		без фосф.	с фосф.		без фосф.	с фосф.		без фосф.	с фосф.			без фосф.	с фосф.	
42	0.5	4	45.58	20.25	+30	1 559.3	2 049.1	+31	0.55	0.54	-2	5.23	9.63	+84	4	7.67	7.04	-8.3
24	0.5	4	19.34	22.87	+18	1 826.5	2 204.6	+21	0.36	0.45	+24	6.30	10.18	+60	4	6.48	6.52	+0.6
24	0.75	4	20.72	24.06	+16	2 102.0	2 599.5	+24	0.77	0.60	-23	8.28	12.66	+53	3	6.21	5.88	-5.3
24	1	2	6.32	8.00	+27	872.9	913	+5	0.50	0.18	-63	3.35	5.64	+68	—	—	—	—
36	0.5	4	39.49	43.13	+9	3 239	3 804.3	+17	0.43	0.96	+122	12.95	16.57	+28	4	7.23	7.48	+3.5
48	0.5	1	8.65	10.75	+24	667.5	886.2	+33	0.36	0.54	+50	2.55	3.23	+27	1	3.52	3.10	-11.9
48	0.75	3	27.90	32.05	+15	2 285.8	3 247.7	+42	0.43	0.93	+117	10.31	13.85	+34	2	5.84	5.43	-7
48	1	1	7.80	7.30	-6	705	755	+7	0.09	0.31	+250	2.85	3.17	+11	1	3.16	2.55	-19.3
72	0.5	1	9.60	11.20	+17	690	907.5	+31	0.39	0.63	+61	2.36	3.27	+38	1	3.57	2.27	-36.4
72	0.75	2	27.90	31.72	+14	1 842.4	2 493.8	+35	0.33	0.92	+179	7.36	9.69	+32	1	8.10	5.95	-26.5
72	1	1	12.50	12.25	-2	1 112.5	1 173.7	+6	0.20	0.39	+97	4.90	5.25	+7	1	3.92	3.42	-12.8
84	0.5	1	15.95	15.60	-2	1 485.8	1 331.3	-8	0.17	0.30	+71	6.28	5.59	-11	1	1.55	1.50	-3.2
В сумме по всем опытам		28	211.75	239.19	+13	18 388.7	22 365.7	+21.6	4.58	6.75	+47.4	72.72	98.73	+35.8	23	57.25	51.14	-10.7

Примечание. Всего было проведено 28 опытов, но анализы глюконовой кислоты удалось осуществить лишь в 23 опытах.

(12—24 часа), когда разница достигает максимальных процентных величин (27 и 30%).

В дальнейшем абсолютная разница возрастает незначительно, а в процентном отношении понижается. Это весьма напоминает действие фосфатов на потребление сахара при брожении дрожжей. Высшая концентрация фосфатов (1%) оказалась сверхоптимальной: за первые сутки она, правда, вызвала сильную стимуляцию (27%), но дальше эффект быстро ослабел и сменился на отрицательный. В совокупности по всем 28 опытам потребление сахара в присутствии фосфатов возросло на 27.44 г, или на 13% от контроля. Аналогичная стимуляция обнаружилась и по отношению к общему кислотонакоплению.

Добавка фосфатов во всех опытах (за исключением наиболее длительного последнего) вызвала значительное усиление накопления кислот. Совокупный эффект стимуляции по всем 28 опытам выразился цифрой $3\ 977\text{ см}^3\ n/10$ кислоты, или 21.6% от контроля. Однако, как сейчас увидим, в создании этого эффекта различные кислоты играют неодинаковую роль.

Продукция лимонной кислоты по 28 опытам в сумме возросла на 26.01 г, или на 35.8% от контроля, т. е. значительно выше, чем общая кислотность (21.6%). Эффект стимуляции от действия фосфатов в первую очередь относится к лимонной кислоте. Этот эффект особенно резко проявляется в первые часы опыта (12—36 час.), дальше он сильно снижается, аналогично той «вспышке», которая наблюдается при действии фосфатов на спиртовое брожение. Совершенно иначе ведет себя глюконовая кислота.

Фосфаты не оказывают никакого стимулирующего действия на образование глюконовой кислоты. Наоборот, ее продукция в присутствии фосфатов несколько сокращается. Между глюконовой и лимонной кислотой в этом отношении обнаруживается принципиальное различие, указывающее на совершенно различный характер реакций, путем которых идет образование этих кислот. Реакции прямого окисления не нуждаются в содействии бродильного аппарата, и мы видим, что глюконовая кислота не отзывается на присутствие фосфатов. Противоположное поведение лимонной кислоты говорит за то, что фосфаты здесь играют роль бродильного фактора, и ее образование идет не путем прямого окисления молекулы глюкозы, а через реакции бродильного распада, стимулируемые фосфатами.

Несколько своеобразно отношение к фосфатам щавелевой кислоты.

Щавелевой кислоты образуется немного, цифры невелики и обнаруживают заметные вариации от опыта к опыту. Все же из таблицы видно, что фосфаты оказывают положительное действие на образование щавелевой кислоты; только по сравнению с лимонной кислотой это действие несколько запаздывает во времени. Максимальный эффект для лимонной кислоты был приурочен главным образом к первым суткам опыта, а для щавелевой в первые сутки преобладает, хотя и слабый, отрицательный эффект; положительное же действие фосфатов развертывается главным образом на вторые и третьи сутки, когда по отношению к лимонной кислоте их действие уже сильно ослаблено. Возможно, что здесь наблюдается конкуренция из-за фосфатов между лимонной и щавелевой кислотами. Но во всяком случае несомненно, что фосфаты дают эффект стимуляции и по отношению к щавелевой кислоте.

Мы должны поэтому из трех основных кислот, продуцируемых *Aspergillus niger*, резко противопоставить глюконовой кислоте как лимонную, так и щавелевую. Такое противопоставление вполне согласуется с требованиями бродильной теории, связывающей с бродильными реакциями именно две последние кислоты, но не глюконовую.

Мы не приводим развернутых данных по измерению сухого веса грибных пленок. Он во всех опытах на растворах обнаружил значительный при-

рост по сравнению с исходным весом, более значительный в присутствии фосфатов (в среднем на 23%). Мы провели далее большую серию опытов с арсенатами, рассчитывая, что они дадут в присутствии фосфатов дополнительный эффект. Были испробованы различные концентрации, но положительного ясного эффекта обнаружить не удалось. Как известно, живые дрожжи также не отзываются на добавку арсенатов. По соображениям Гардена⁽⁵⁾ это объясняется тем, что в живых дрожжах имеется в достаточном количестве свой стимулятор, выполняющий ту же функцию, как и арсенаты, но разрушающийся при изготовлении препаратов из дрожжей, почему арсенаты действуют только на препараты, но не на живые дрожжи. Возможно, что живой мицелий аспергилла и в этом отношении сходен с дрожжами, почему и не дает эффекта с арсенатами.

Специально поставленный опыт с солями $\text{KН}_2\text{PО}_4$, $\text{NaН}_2\text{PО}_4$ и KCl показал, что обнаруженный эффект обусловлен действием именно фосфатного аниона, но не катиона калия.

В ы в о д ы: 1. Неорганические фосфаты, внесенные с раствором сахара под пленку *Aspergillus niger*, вызывают более энергичное потребление сахара (в среднем на 13%, в отдельных опытах до 30%) и увеличение общей кислотности (в среднем на 21.6%, в отдельных опытах до 42%).

2. Это возрастание кислотности в первую очередь обусловлено стимулирующим действием фосфатов на образование лимонной кислоты (в среднем на 35.8%, в отдельных опытах на 84%).

3. Усиленное накопление лимонной кислоты наблюдается преимущественно в начале опыта (первые сутки), напоминая, хотя и в менее ясной форме, вспышку брожения под влиянием фосфатов у дрожжей.

4. Дополнительного эффекта от внесения арсенатов обнаружить однако не удалось.

5. Наряду с лимонной стимулирующее действие фосфатов сказывается также и на щавелевой кислоте, только эффект здесь несколько запаздывает во времени.

6. В резкое отличие от этих двух кислот фосфаты не оказывают никакой стимуляции на образование глюконовой кислоты; наоборот, ее выход в присутствии фосфатов несколько снижается.

7. Поскольку фосфаты являются одним из важнейших бродильных факторов, такое различное к ним со стороны кислот отношение заставляет предполагать, что лимонная и щавелевая кислота для своего образования нуждаются в содействии бродильного аппарата, а путем прямого окисления образуется лишь глюконовая кислота.

Лаборатория физиологии растений.
Ленинградский государственный университет.

Поступило
14 IX 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Баринава и Буткевич, Микробиология, 5, 708 (1936). ² Breusch, ZS. f. physiol. Chem., 250, 262 (1937). ³ Буткевич и Гаевская, ДАН, III, 405 (1935). ⁴ Буткевич и сотр., Микробиология, 3, 319, 556, 567 (1934); Bioch. Z. S., 272, 290, 364, 371 (1934); ДАН, IV, 329 (1935); ДАН, I, 361 (1936). ⁵ Garden, Alcoholic Fermentation. ⁶ Гудлет, Тр. Научно-иссл. ин-та пищ. пром., 1, 45 (1935). ⁷ Krebs a. Johnson, Enzymologia, 4, 148 (1937). ⁸ Львов, Доп. статья в 3-м изд. I тома «Физиологии растений» Костычева, 398—412. ⁹ Львов, Доп. статья к рус. перев. монографии Bennet-Clark «The Role of the Organic Acids in Plant Metabolism», 111—129 (1938). ¹⁰ D. Müller, Ergebn. d. Enzymforsch., 5, 259 (1935). ¹¹ Szent-Györgyi, ZS. f. physiol. Chem., 224, 1 (1934); 236, 1 (1935); 244, 105 (1936); 247, 1 (1937). ¹² Wells, Moyer a. May, J. of Amer. Chem. Soc., 58, 555 (1936).