

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

С. Д. ЛЬВОВ и Г. М. ТУПИЦИНА

**ВЛИЯНИЕ ФТОРИСТОГО НАТРА НА ОБРАЗОВАНИЕ ЛИМОННОЙ И ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТ У ГРИБКА *ASPERGILLUS NIGER***

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

Плесневые грибки, образующие в аэробных условиях органические кислоты, в анаэробных условиях обнаруживают обычно способность к спиртовому брожению. Сторонники бродильной теории образования органических кислот (Bernhauer, Chrzaszcz и др.) считают, что эти два процесса (кислотообразование и брожение) стоят между собой в тесной генетической связи и начинаются с одних и тех же реакций, за которыми уже далее следует расхождение в ту или другую сторону в зависимости от присутствия или отсутствия кислорода; таким образом кислотообразование рассматривается ими как процесс, замещающий собой спиртовое брожение. Буткевич и другие сторонники теории прямого окисления отвергают эту связь между двумя процессами (по крайней мере по отношению к лимонной кислоте) и считают, что кислотообразование и брожение—это два совершенно независимых друг от друга процесса, идущих каждый по своему особому руслу. Пользуясь сульфитным методом, Бернгауер<sup>(2)</sup> обнаружил образование одного из важнейших промежуточных продуктов брожения—уксусного альдегида в аэробных условиях, когда нормально идет кислотообразование. Возражая Бернгауеру, Буткевич<sup>(3)</sup> указывает, что фиксация уксусного альдегида в ощутимых количествах наблюдается преимущественно в тех расах *Aspergillus niger*, которые являются плохими кислотообразователями. По его утверждению способность той или иной расы к активному брожению обычно сочетается с пониженной энергией кислотообразования и обратно, т. е. между двумя процессами нет параллелизма. В связи с этим не мешает отметить, что такое же отсутствие параллелизма (но только в отношении брожения и дыхания) наблюдается у различных рас дрожжей (дикие и культурные формы), что однако ни в коей мере не может рассматриваться как аргумент против идеи о генетической связи между дыханием и брожением. Энергично бродящие культурные формы обычно обладают слабо активным окислительным аппаратом, чем и объясняется это явление.

Хотя Буткевич при развитии своей концепции о химизме образования лимонной кислоты не выходил за пределы этой сравнительно узкой проблемы, тем не менее совершенно ясно, что его точка зрения в своей принципиальной основе чрезвычайно близко примыкает ко взглядам, развиваемым с 1930 г. Lundsgaard'ом. Как известно, этому автору удалось показать<sup>(6)</sup>, что при помощи моноiodуксусной кислоты можно полностью приостановить в мышечной ткани и в дрожжах брожение, не прекращая

дыхания. На этом основании был сделан вывод, что реакции, лежащие в основе окислительных процессов (дыхания), не имеют никакой связи с бродильными реакциями и оба процесса протекают совершенно независимо друг от друга, каждый по своему обособленному руслу.

Вводя моноiodуксусную кислоту под пленку *Aspergillus niger*, Барина и Буткевич (1) получили и здесь, при надлежащей концентрации, прекращение брожения (в анаэробных условиях) при продолжающемся образовании лимонной кислоты (в аэробных условиях). Такие же результаты были получены Johnson, Knight и Walker (2). Последний из этих трех авторов всего в 1932 г. (3) на основании данных того времени высказывался в пользу бродильной теории. Теперь под впечатлением результатов опытов с моноiodуксусной кислотой он заявляет об отказе от своих прежних воззрений и объявляет себя сторонником теории прямого окисления.

Нужно однако определенно подчеркнуть, что теория Lundsgaard'a, на которую опираются в своих выводах эти авторы, отнюдь не является строго обоснованной и вызывает против себя серьезную критику. Слабым пунктом этой теории при ее экспериментальном обосновании является совершенно незакономерное допущение, что бродильный аппарат в аэробных и анаэробных условиях должен испытывать одинаковое угнетение от моноiodуксусной кислоты. Между тем имеется ряд наблюдений, которые говорят за то, что в присутствии кислорода брожение менее чувствительно к моноiodуксусной кислоте, т. е. для его подавления требуются более высокие концентрации этой кислоты, чем в анаэробных условиях. Turner (10) описывает опыты, в которых две порции дрожжей выдерживались с моноiodуксусной кислотой—одна в азоте, другая в воздухе—столько времени, чтобы брожение в первой было уже подавлено. Вторая, перенесенная теперь в атмосферу азота, продолжала бродить в течение времени немногим меньше того, которое требовалось для прекращения брожения в первом случае. Иначе говоря, кислород защищал бродильный аппарат от инактивации. Брожение в дисках моркови в атмосфере с 2.5% кислорода идет почти так же, как и в чистом азоте. В двух опытах с моноiodуксусной кислотой ( $1.34 \cdot 10^{-4} M$ ) брожение в чистом азоте было полностью подавлено через 5—6 час., а в присутствии кислорода лишь через 8 час. на 95%.

Ehrenfest (4) утверждает, не приводя, правда, протокольных данных, что у дрожжей, отравленных моноiodуксусной кислотой, в присутствии кислорода в период окисления спирта происходит регенерация способности к брожению.

Все эти наблюдения говорят о том, что в аэробных условиях бродильный аппарат сохраняет, хотя бы частично, свою работоспособность при той минимальной концентрации моноiodуксусной кислоты, которая в анаэробных условиях является достаточной для его полной инактивации.

К этому нужно добавить, что интервал концентраций, вызывающих одна—прекращение брожения, а другая, более высокая—подавление окислительных реакций, обычно незначителен. Так, в опытах Johnson, Knight и Walker'a брожение у плесневого грибка было остановлено при концентрации  $\frac{M}{500}$ , а образование лимонной кислоты обнаружило сильнейшее угнетение уже при  $\frac{M}{475}$  и особенно при  $\frac{M}{400}$ .

Для той расы грибка, с которой работали Барина и Буткевич, указанный интервал лежит между  $4 \cdot 10^{-4}$  и  $10 \cdot 10^{-4}$  моля, причем промежуточные концентрации ими не исследовались, т. е. не исключена возможность, что интервал фактически лежит в еще более узких границах. Для дыхания

и брожения дрожжей по данным Nilson, Zeile и Euler'a (8) этот интервал при pH=6.4 заключен между  $10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-4}$  моля (опять-таки без уточнения промежуточных концентраций). Как видим, различие между крайними концентрациями везде незначительно и легко может быть сведено к указанной выше причине.

В описываемых ниже опытах с плесневым грибом *Aspergillus niger* мы использовали NaF, который в общем является аналогом моноiodуксусной кислоты. Мы не задавались целью определить те пограничные концентрации фтористого натра, которые останавливают брожение и окисление, поскольку по высказанным выше соображениям не придаем этому вопросу существенного значения. Все наши опыты велись в аэробных условиях, и своей задачей мы ставили выяснение вопроса, в одинаковой ли мере будет влиять присутствие NaF на продукцию лимонной и глюконо-вой кислот, из которых последняя образуется несомненно путем прямого окисления, а относительно первой этот вопрос остается все еще спорным. Методика постановки опытов и методы определения те же, что и в предыдущей работе Львова и Лимберга (?).

Грибные пленки выращивались в течение двух суток, а затем под них (после тщательного промывания пленок) подводились растворы 20% сахарозы без NaF (контроль) и с различными концентрациями NaF (концентрации везде выражены в молях на литр). В особых колбах определялся сухой вес пленки перед началом опыта («исходный» вес пленки, он при расчетах принимался за 100). Все числа—среднее из двух параллельных опытов. Результаты шести опытов приводятся в следующих таблицах. Продолжительность 2-го опыта—45 час., 3-го опыта—41 час, всех остальных—42 часа.

#### Опыт 1-й

Исходный сухой вес пленки = 2.0487 г

Конц. NaF в молях на литр	Сахара потреблено в г	Кислотность в см <sup>3</sup> n/10 щелочи	Лимонная кислота в г	Глюконо-вая кислота в г	Сухой вес пленки в г
	Абсол. В %	Абсол. В %	Абсол. В %	Абсол. В %	Абсол. В % от исход.
0	11.78—100	869.0—100	3.82—100	2.89—100	2.7465—134
$10^{-5} \times 1.5$	11.88—100.8	779.5—89.7	3.10—81.2	2.46—85.2	2.6327—128.5
$10^{-5} \times 2.5$	11.50—97.6	706.5—81.3	2.84—74.3	2.46—85.2	2.6487—129.2
$10^{-5} \times 3.5$	10.4—88.3	652.5—74.9	2.64—69.1	2.58—89.3	2.6014—127
$10^{-5} \times 5$	10.1—85.8	344.8—39.7	1.17—30.6	2.51—86.8	2.3776—116

#### Опыт 2-й

Исходный сухой вес пленки = 3.3312 г

0	12.45—100	1161.2—100	3.86—100	1.99—100	3.7463—112.5
$10^{-5} \times 5$	10.22—82	617.5—53.2	1.50—38.8	2.14—107.5	3.3215—99.7
$10^{-5} \times 7.5$	9.04—72.6	256.7—22.1	0.74—19.2	2.10—105.5	2.8614—85.9

#### Опыт 3-й

Исходный сухой вес пленки = 1.6912 г

0	9.05—100	880.5—100	2.79—100	1.60—100	2.5207—149
$10^{-5} \times 7.5$	7.75—85.6	244.4—27.7	0.76—28.3	2.66—166	2.0427—120.8
$10^{-5} \times 10$	8.10—89.5	137.5—15.6	0.39—14.5	1.95—123	1.9925—117.8
$10^{-5} \times 12.5$	8.30—91.7	135.7—15.4	0.34—12.6	2.38—146	2.1750—128.6

О п ы т 4-й

Исходный сухой вес пленки = 1.8582 г

0	11.28—100	739.3—100	2.51 —100	1.62—100	2.6766—144.4
$10^{-5} \times 5$	11.23—99.6	734.8—98	2.65 —105.6	1.55—96.1	2.4490—131.8
$10^{-5} \times 10$	9.80—86.9	433.3—18	0.62 —24.7	1.75—108	2.1470—115.5
$10^{-5} \times 15$	9.53—84.5	79.5—10.7	0.285—11.4	1.40—86.4	1.7359—93.4

О п ы т 5-й

Исходный сухой вес пленки = 2.1260 г

0	13.7 —100	1035.5—100	4.45—100	1.91—100	2.7100—127.5
$10^{-5} \times 7.5$	9.5 —70	215.2—20.8	0.66—14.9	3.16—165.4	2.1816—102.6
$10^{-5} \times 10$	9.7 —70.7	146.2—14.1	0.45—10.2	2.26—113	2.0596—96.9
$10^{-5} \times 12.5$	9.05—66	74.7—7.2	0.26—5.8	1.98—104	1.8835—88.6
$10^{-5} \times 15$	8.45—61.7	67.9—6.5	0.26—5.8	1.72—94.8	1.7398—81.8

О п ы т 6-й

Исходный сухой вес пленки = 2.5205 г

0	10.45—100	694.7—100	2.73 —100	2.58 —100	3.1240—124
$10^{-5} \times 25$	9.45—90.4	51.1—8	0.235—10	1.23 —47.7	2.3217—92.1
$10^{-5} \times 50$	7.85—75.1	21.8—3	0.293—10.7	0.995—39	2.0335—80.7
$10^{-5} \times 100$	6.83—65.3	28.6—4	0.395—14	0.487—18.8	1.7076—67.7

Из рассмотрения таблиц мы прежде всего видим, что все концентрации NaF, начиная с самых минимальных, вызывают некоторое ослабление жизненной активности пленки, что прежде всего сказывается в понижении общей кислотности и в уменьшении потребления сахара из раствора (лишь при самой низшей концентрации  $10^{-5} \cdot 1.5$  моля в первом опыте потребление сахара одинаковое с контролем).

Продукция лимонной кислоты также начинает уменьшаться с самых минимальных концентраций NaF и с их возрастанием это уменьшение все более прогрессирует. Вместе с тем довольно отчетливо обозначается та критическая концентрация, при которой происходит резкое угнетение в продукции лимонной кислоты. Эта критическая концентрация лежит между  $10^{-5} \cdot 5$  и  $10^{-5} \cdot 7.5$  (небольшие вариации обусловлены различным физиологическим состоянием грибка в различных опытах, проводившихся в различное время).

Глюконовая кислота ведет себя совершенно по-другому. При низких концентрациях NaF она не только не испытывает угнетения (в первом опыте контрольная цифра для глюконовой кислоты—2.89 г несомненно является преувеличенной), но, наоборот, сильно возрастает по сравнению с контролем, причем это возрастание наблюдается при тех концентрациях NaF, при которых как-раз начинается резкое угнетение лимонной кислоты ( $10^{-5} \cdot 5$  и  $10^{-5} \cdot 7.5$  моля в опытах 2, 3 и 5). Лимонная и глюконовая кислоты являются до некоторой степени антагонистами в отношении к NaF и ведут себя во всяком случае совершенно несходным образом. Высокие концентрации NaF вызывают в конце концов угнетение и глюконовой кислоты, причем критической концентрацией (снижение наполовину) является, судя по 6-му опыту,  $10^{-5} \cdot 25$  моля. Таким образом между критическими концентрациями для лимонной и глюконовой кислоты имеется интервал примерно того же порядка, как и между критическими концентрациями для брожения и дыхания (см. выше).

Пленка, находясь на растворе одной сахарозы (контроль), сильно увеличивает свой сухой вес (в 3-м опыте в  $1\frac{1}{2}$  раза, как максимум). Фтористый натр с самых минимальных своих концентраций ослабляет эти синтетические процессы, и сухой вес постепенно падает, возвращаясь к исходному уровню (при средних концентрациях NaF), а затем спускается ниже этого уровня, что говорит о том, что теперь реакции распада начинают в пленке брать верх над реакциями синтеза. В связи с этим обнаруживается новое интересное различие между лимонной и глюконовой кислотой. Лимонная кислота обнаруживает резкое сокращение своей продукции еще задолго до того, как прекращаются синтетические процессы в пленке гриба, т. е. когда сухой вес пленки продолжает еще обнаруживать прирост по сравнению с исходным весом, тогда как угнетение в продукции глюконовой кислоты начинается лишь после того, как процессы распада явно возьмут верх над процессами синтеза, т. е. когда сухой вес пленки заметно уменьшается против исходного веса. Между лимонной и глюконовой кислотами здесь обнаруживается принципиально важное различие, которое говорит за то, что пути их образования являются совершенно несходными, и вряд ли поэтому можно подводить обе кислоты под одну и ту же теорию прямого окисления.

На основании развитых выше критических соображений и фактических данных, описанных в двух наших работах, мы приходим к выводу, что в настоящее время нет серьезных доказательств против бродильной теории, и отказ от нее со стороны ее бывшего сторонника (Walker'a) является по меньшей мере преждевременным.

Лаборатория физиологии растений.  
Ленинградский государственный университет.

Поступило  
14 IX 1938.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Барина и Буткевич, Микробиология, **5**, 768 (1936). <sup>2</sup> Bernhauer u. Thelen, Bioch. ZS., **253**, 30 (1932). <sup>3</sup> Буткевич, Менжинская и Трофимова, Микробиология, **3**, 319 (1934). <sup>4</sup> Ehrenfest, Journ. biol. Chem., **100**, XXXVIII (1933). <sup>5</sup> Johnson, Knight a. Walker, Bioch. Journ., **31**, 903 (1937). <sup>6</sup> Lundsgaard, Bioch. ZS., **217**, 162 (1930); **220**, 1, 8 (1930); **227**, 51 (1930); **250**, 61 (1932); *Ergebn. d. Enzymforsch.*, **2**, 179 (1933). <sup>7</sup> Львов и Лимберг, ДАН, XXI, №4 (1938). <sup>8</sup> Nilson, Zeile u. Euler, ZS. f. physiol. Chem., **194**, 53 (1931). <sup>9</sup> Southers a. Walker, Biochem. Journ., **26**, 317 (1932). <sup>10</sup> Turner, New Phytol., **36**, 142 (1937).