

П. А. КОЛЕСНИКОВ

**РОЛЬ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В УГЛЕВОДНОМ ОБМЕНЕ
У ОДНОКЛЕТОЧНОГО ЗЕЛЕННОГО ОРГАНИЗМА (ХЛОРЕЛЛЫ)***(Представлено академиком А. Н. Бахом 2 III 1940)*

В первом сообщении (1) мною было показано, что углеводный обмен у хлореллы не укладывается в общеизвестную схему Эмбдена-Мейергофа гликолиза и брожения. Не было установлено необходимости фосфорилирования при распаде глюкозы у хлореллы. Было показано, что использование хлореллой глюкозы связано с целостностью структуры клеток и происходит только в аэробных условиях. Последнее обстоятельство дало повод предположить, что углеводный обмен у хлореллы происходит по типу окислительного брожения. Некоторые результаты исследований в этом направлении приведены в настоящем сообщении.

Хлорелла выращивалась в минеральной питательной среде в люминостатах. Обмен веществ изучался в приборе Варбурга.

Прежде всего было установлено, что свежесобранная хлорелла содержит органические кислоты, которые определялись в приборе Варбурга по принципу Лемана (2). Эти кислоты исчезают при инкубировании хлореллы в темноте в аэробных условиях, но остаются неизрасходованными в анаэробных условиях. Следовательно, они служат субстратом для дыхания хлореллы. Определение при этом дыхательного коэффициента показало, что он всегда был меньше единицы (в среднем 0,77). Это тоже показывает, что непосредственным субстратом дыхания являются не углеводы, а скорее всего соединения типа жирных кислот. О роли органических кислот при дыхании хлореллы говорят и опыты с моноiodуксусной кислотой. Моноiodуксусная кислота, которая, как известно, тормозит окислительно-восстановительные процессы, в наших опытах в концентрации 1 : 10 000 полностью приостанавливала окисление хлореллой глюкозы и слабо тормозила собственное дыхание хлореллы, но в концентрации 1 : 1 000 она тормозила и собственное дыхание и через 40 мин. приостанавливала его совсем, причем дыхательный коэффициент в этих условиях был всегда равен 1,5. Это говорит за то, что моноiodуксусная кислота прекращала окислительно-восстановительные процессы, но не приостанавливала распада высокоокисленных продуктов, которые до этого там имелись.

Установив эти факты, мы попытались выяснить вопрос о том, какие из известных органических кислот участвуют в обмене у хлореллы и могут ли они образоваться из сахаров. По этому вопросу в литературе имеются некоторые указания (3, 4).

4 Доклады Акад. Наук СССР, 1940, т. XXVII, № 4.

Мы прежде всего изучали дыхание хлореллы в растворах глюкозы, фруктозы и различных органических кислот. Результаты показали, что, как правило, в опытах с глюкозой и фруктозой дыхательный коэффициент был повышенный. Приближаясь в первый час опыта к единице, он повышался к концу 3—4-го часа опыта до 1,5. После того, как эта наша работа была выполнена и доложена, в печати появилась работа Гаффрона (5), вполне совпадающая с нашими данными о повышенном дыхательном коэффициенте в опытах с глюкозой. Объяснение этого факта, очевидно, надо искать в вышеприведенном нами факте нахождения у хлореллы высокоокисленных продуктов, которые, очевидно, накапливаются в процессе окисления глюкозы и по мере накопления распадаются, давая повышенный дыхательный коэффициент.

Исследуя дыхание хлореллы на растворах различных органических соединений и кислот, мы особенное внимание обратили на дыхание хлореллы в растворах соединений, приведенных в табл. 4 (приведены результаты после вычета показаний дыхания в контроле без субстрата).

Количество поглощенного O_2 и выделившегося CO_2 при дыхании 0,2 г хлореллы в 5 *m*/30 раствора глюкозы и натриевых солей органических кислот в *m*/30 фосфатном буфере рН 6,98 при 25° в течение 240 мин.

№ п/п.	Наименование органического соединения	Поглощено O_2 ml	Выделилось CO_2 ml	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\frac{CO_2}{O_2}$ вычисленный (полное сгорание)
1	Глюкоза	640	811	1,26	1,0
2	Масляная кислота . . .	850	615	0,72	0,8
3	Уксусная кислота . . .	720	285	0,4	1,0
4	Глиоксилевая кислота . .	347	289	0,83	2,0
5	Диоксималеиновая кислота *	373	561	1,5	2,0
6	Контроль	—	—	0,77	—

Из таблицы видно, что соединения с C_4 атомами сгорают почти полностью до CO_2 . (Найденные дыхательные коэффициенты приближаются к вычисленным.) Соединения с C_2 атомами, уксусная и глиоксилевая кислоты, не сгорают полностью до CO_2 . Вычисленные дыхательные коэффициенты полного сгорания соответственно равны 1,0 и 2,0, найденные же соответственно равны лишь 0,4 и 0,83. Количество CO_2 , выделившееся при распаде глюкозы, приблизительно равно сумме CO_2 , выделившейся из уксусной кислоты или глиоксилевой кислоты плюс соединение с C_4 . Особенно это видно в опытах с диоксималеиновой кислотой (см. таблицу). Из этого следует, что можно предположить, что происходил распад глюкозы на C_2 - и C_4 -соединения, причем C_4 -соединения служат энергетическим материалом—сгорают до CO_2 , а C_2 -соединения не распадаются полностью до CO_2 , но, вероятно, служат материалом для синтеза клеточных веществ. Среди этих веществ, которые служат материалом для синтеза, занимает, возможно, особое место глиоксилевая кислота, которая находится в химической связи с уксусной кислотой. При поисках промежуточных продуктов обмена у хлореллы нам удалось найти глиоксилевую кислоту. Глиоксилевая кислота накапливается у хлореллы на свету, в присутствии моно-

* Диоксималеиновая кислота бралась в виде насыщенного раствора.

индуксусной кислоты или бисульфита, в таких концентрациях этих ядов, которые несколько тормозят даже собственное дыхание хлореллы. Идентификация этой кислоты производилась нами качественными цветными реакциями, она также выделена нами в виде *n*-нитрофенилгидразона. Гидразон хорошо выкристаллизовывается из уксуснокислого раствора при комнатной температуре. Это красивые друзы кристаллов, оранжевого цвета, нерастворимые в спирте, в спиртовом растворе едкого калия дают оранжевое окрашивание, точка плавления его 200° по Дакину (°).

Нам не удалось пока установить у хлореллы связи между использованием уксусной кислоты и накоплением глиоксиловой, но с глюкозой глиоксиловой кислоты образуется больше, чем в контроле. Глиоксиловая кислота накапливается у хлореллы без добавления какого-либо субстрата при освещении. Дыхательный коэффициент хлореллы в растворе глиоксиловой кислоты близок к дыхательному коэффициенту собственного дыхания хлореллы (см. таблицу). Все это делает вероятным предположение, что глиоксиловая кислота является естественным продуктом обмена у хлореллы и, возможно, играет роль промежуточного продукта при образовании клеточных веществ из первичных продуктов фотосинтеза.

В литературе имеется указание, что из глиоксиловой кислоты под действием ферментов может образовываться гликолевый альдегид (7). Мы нашли, что в подобных же условиях, как и при изолировании глиоксиловой кислоты, имеет место накопление вещества, которое обладает некоторыми свойствами альдегида. Это соединение выделено нами в виде *n*-нитрофенолгидразона и 2—4-динитрофенилгидразона. Полученные при комнатной температуре, они плавятся при 170°—180°. Кристаллы красного цвета. В спиртовом растворе едкого калия дают синее окрашивание. Полученные при нагревании на кипящей водяной бане, они плавятся при 250—280°. Нам еще не удалось их полностью очистить. По данным Степанова и Кузина (7) свойства выделенного соединения близки к тем, которые они описали для гликолевого альдегида. Изучение этого соединения продолжается.

Из других органических соединений обратила на себя наше внимание диоксималеиновая кислота, которой за последнее время стали придавать большое значение в окислительных процессах у растений (8). Из приведенной выше таблицы видно, что она является соединением, которое дает высокий дыхательный коэффициент. Кроме того мы нашли, что она ускоряет окисление уксусной кислоты и глюкозы и, более того, она уничтожает индукционный период, который всегда наблюдается при окислении хлореллой уксусной кислоты и глюкозы. Это дает повод предполагать, что она может являться одним из тех C₄-соединений, которое дает повышенный дыхательный коэффициент в опытах с глюкозой. Мы обнаружили в эфирном экстракте, после выпаривания эфира, вещество, которое легко окисляется перманганатом и в растворе четыреххлористого титана в серной кислоте дает желто-красное окрашивание, которое, как считает Шмальфус (9), характерно для диоксималеиновой кислоты.

Следует отметить, что Грин с сотрудниками (10) обнаружили у хлореллы диэнольное соединение путем титрования вытяжки из хлореллы 2—6-дихлорфенолиндофенолом. Они считают, что это аскорбиновая кислота. Мы поставили опыт по выяснению роли аскорбиновой кислоты при дыхании хлореллы. Оказалось, что хлорелла к аскорбиновой кислоте индифферентна.

По всем нашим данным кажется более вероятным, что у хлореллы накапливается диоксималеиновая кислота. Диоксималеиновая кислота, как известно, является исходным продуктом при получении химическим путем гликолевого альдегида. Наличие у хлореллы гликолевого альде-

гида позволяет предположить при обмене углеводов у хлореллы связь между гликолевым альдегидом и диоксималеиновой кислотой. Нами также изучалось влияние на дыхание хлореллы дикарбоновых кислот: янтарной, фумаровой, яблочной, а также лимонной кислоты. Мы не обнаружили каталитической роли дикарбоновых кислот в смысле теории Сцент-Георги (11) и лимонной кислоты в смысле теории Кребса (12).

Однако мы нашли, что дикарбоновые кислоты поддерживают собственное дыхание хлореллы на одном уровне. При этом было установлено, что янтарная кислота расходуется. При инкубировании хлореллы в растворе уксусной кислоты мы не обнаружили янтарной кислоты методом Госци (13). Следовательно, уксусная кислота не окисляется у хлореллы через янтарную, как это нашел Виллянд у дрожжей. К лимонной кислоте хлорелла индифферентна.

Поступило
3 III 1940

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Сб. научных работ комсомольцев-биологов Акад. Наук СССР (печатается).
² Lehman, Biol. Ztbl., 254, 332 (1932). ³ Genevois, Biol. Ztbl., 186, 461 (1927). ⁴ Meyer, Biol. Ztbl., 283, 375 (1936). ⁵ Gaffron, Biol. Ztbl., 59, 233 (1939). ⁶ Dakin, Journ. Biol. Chem., 4, 235 (1908). ⁷ Степанов и Кузин, ЖРФХО, часть хим., 62, 267 (1930). ⁸ Banga u. Philippot, ZS. phys. Chem., 258, 147 (1939). ⁹ Schmalfluss u. Bartermeger, ZS. phys. Chem., 160, 196 (1926). ¹⁰ Green a. Cowerner, Journ. Biol. Chem., 128, 447 (1939). ¹¹ Szent-Georgii, ZS. phys. Chem., 236, 1 (1935). ¹² Krebs a. Johnson, Enzymol., 4, 148 (1937). ¹³ Goszy, ZS. phys. Chem., 236, 54 (1935).