

М. В. ФЕДОРОВ

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФИКСАЦИЮ
АЗОТА АТМОСФЕРЫ АЗОТОБАКТЕРОМ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 16 IV 1949)

В наших ранее опубликованных работах (1) были приведены экспериментальные данные, на основе которых устанавливалось наличие в составе катализатора фиксации азота карбонильной группы и ее возможное участие в процессе фиксации молекулярного азота. В связи с тем, что при дегидрировании аскорбиновой кислоты возникают две рядом расположенные карбонильные группы, представлялось интересным установить, как будет влиять эта кислота на фиксацию азота как в нормально развивающихся культурах, так и в покоящихся или же предварительно вымораживавшихся культурах, где имеет место нарушение нормальных физиологических функций. С этой целью были поставлены опыты, результаты которых приводятся ниже.

Опыты ставились на питательной среде для азотобактера (наша модификация) с инвертным сахаром (0,1 моля) в качестве источника углерода. Аскорбиновая кислота вводилась в среду после ее стерилизации (последняя производилась путем фильтрации через бактериальные фильтры). Опыты ставились в колбах, объемом на 300 мл. В каждую колбу наливалось 100 мл питательной среды. После опыта определялся неиспользованный сахар (по Бертрану) и общий азот (по Кьельдалю). В первом опыте производилось выращивание *Azotobacter agilis* на среде с добавленной аскорбиновой кислотой.

Полученные результаты показывают, что наличие в среде аскорбиновой кислоты заметно повышает интенсивность фиксации азота

Таблица I

Влияние на фиксацию азота атмосферы *Azotobacter agilis*
(растущие клетки) аскорбиновой кислоты

Концентрация аскорбиновой кислоты в среде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	1,75	100,0	14,19	14,25	2565,0	100,0
	1,75		14,30			
125	1,75	101,4	18,36	17,97	3234,6	126,1
	1,80		17,58			
250	1,75	100,0	18,18	18,18	3272,4	127,7
	1,75		18,18			
500	1,65	94,3	18,31	18,96	3412,8	133,0
	1,65		19,62			

атмосферы азотобактером (на 39%). При этом заслуживает интереса факт, что малые (125 мг) и большие (500 мг) дозы этого соединения практически дают один и тот же результат. Это указывает на специфическое воздействие этой кислоты. Если бы ее влияние сводилось только к изменению окислительно-восстановительных условий в среде или было бы связано с ее использованием в качестве дополнительного источника углерода, то более высокие дозы должны были бы вызвать и более резкие изменения в продуктивности фиксации азота атмосферы. Однако этого не наблюдается. Аналогичные результаты были получены и во втором опыте, где испытывались еще меньшие дозы этого соединения.

Таблица 2

Влияние на фиксацию азота атмосферы *Azotobacter agile* малых доз аскорбиновой кислоты

Концентрация аскорбиновой кислоты в среде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
0,00	1,80	100,0	11,53	10,84	1951,2	100,0
	1,80		10,16			
5,0	1,80	100,0	13,80	12,14	2185,2	112,0
	1,80		10,48			
10,0	1,20	83,3	9,72	11,54	2077,2	106,4
	1,80		13,35			
20,0	1,80	87,5	13,33	14,07	2532,6	130,0
	1,35		14,81			
40,0	1,80	100,0	16,29	15,04	2707,2	138,7
	1,80		13,80			
120,0	1,45	90,3	16,65	16,08	2894,4	148,3
	1,80		15,51			

Малые дозы аскорбиновой кислоты (20—120 мг) дали примерно те же результаты. Продуктивность фиксации в присутствии этого соединения возросла на 30—40%. Только очень малые количества этого вещества в среде (5—10 мг) не изменили энергии данного процесса. Видимо, они оказались недостаточными для создания в протоплазме клетки азотобактера нужной концентрации этого соединения.

Весьма специфическое влияние аскорбиновой кислоты на фиксацию азота атмосферы в нормально развивающихся культурах азотобактера привело к необходимости дополнительной постановки опытов с клетками этого организма, предварительно подвергавшимися вымораживанию. В них нормальные физиологические функции могли быть частично нарушены инактивацией отдельных ферментов. С этой целью в колбы Эрленмейера производился посев *Azotobacter agile* и после 7-дневного выращивания в термостате (за это время сахар был использован на 75—95% и накоплено азота в составе клеток азотобактера примерно 9,16 мг на 1 г использованного сахара) питательная среда с культурой азотобактера несколько раз вымораживалась (при температуре около -10°) и вновь оттаивалась в термостате (при температуре $+30^{\circ}$). После этого в каждую колбу, с соблюдением стерильных условий, добавлялось по 1,8 г инвертного сахара в растворе и они ставились в термостат на 10 дней после однократного вымораживания и на 26 дней после двухкратного. В контрольном варианте даже при однократном вымораживании не наблюдалось появления новой пленки на

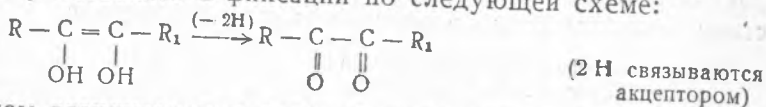
поверхности питательной среды, а в варианте с добавлением аскорбиновой кислоты даже при трехкратном вымораживании неизменно появлялась небольшая свежая пленочка, в которой под микроскопом легко было установить наличие большого количества крупных клеток *Azotobacter agilis*, находившихся в активном движении. Добавление витамина В₂ (лактофлавина) такого эффекта не давало: культура азотобактера в присутствии этого витамина вела себя примерно так же, как и в контроле.

Таблица 3

Влияние аскорбиновой кислоты на фиксацию азота атмосферы вымораживавшимися клетками *Azotobacter agilis*

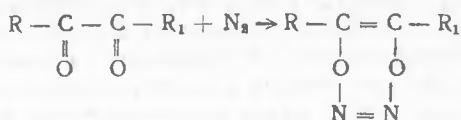
Концентрация аскорбиновой кислоты в среде в мг	Использовано сахара в мг	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
Однократное вымораживание	0,00	100,0	10,79	11,48	2066,4	100,0
			12,17			
100,0	0,90 0,80	109,7	18,02	18,05	3249,0	157,2
			18,07			
Двукратное вымораживание	0,00	100,0	6,28	7,94	1429,2	100,0
			9,60			
100,0	1,30 1,45	289,4	12,02	12,63	2273,4	159,0
			13,24			

Данные табл. 3 также ясно показывают, что в присутствии аскорбиновой кислоты нарушенные вымораживанием физиологические функции восстанавливаются. В первую очередь восстанавливается дыхание. Продуктивность использования сахара в присутствии этого соединения возрастает в несколько раз. Параллельно с этим, хотя и в меньшей степени, возрастает и продуктивность фиксации азота атмосферы. Видимо, аскорбиновая кислота создает условия для восстановления активной деятельности ферментов, обслуживающих эти важнейшие физиологические процессы. Если для ферментного аппарата, обслуживающего фиксацию азота, допустить двухкомпонентное строение и возможное участие в процессе фиксации карбонильной группы, то положительное влияние аскорбиновой кислоты можно было бы приписать активирующему воздействию ее на активную группу фермента, участвующего в фиксации. Это активирующее влияние можно было бы связывать с частичной заменой аскорбиновой кислотой активной группы. В этом случае две карбонильные группы, меняющие свои двойные связи с двойной связью смежных атомов углерода, могли бы участвовать в фиксации по следующей схеме:

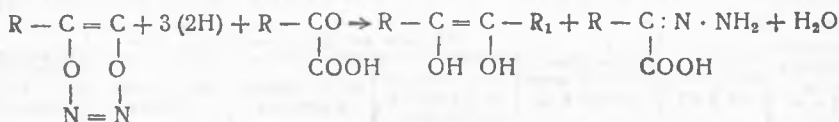


При обратном возникновении двойной связи между атомами углерода у каждого кислородного атома освободилось бы по одной связи, по месту которых и мог бы присоединяться азот, при соответствующем

щих условиях окислительно-восстановительного потенциала, исключая конкуренцию активного водорода:



Если бы такого типа взаимодействие имело место, то дальнейший процесс восстановления азота мог бы осуществляться за счет активного водорода, мобилизуемого из окисляемого вещества:



Производные гидразина могли бы в дальнейшем подвергнуться дополнительному восстановлению и послужить материалом для синтеза аминокислот и белковых соединений азотобактера.

При таком ходе процесса возникали бы затруднения только на первом звене процесса, когда образуются кислородные связи между азотом и углеродом. Такого рода связи довольно редко встречаются среди устойчивых органических соединений, но в отдельных случаях они все же имеют место (например, в группе изо-нитросоединений). Высказанные здесь соображения, хотя и не являются пока всесторонне аргументированными экспериментально, хорошо объясняют, однако, эффект от аскорбиновой кислоты и смену окислительно-восстановительного потенциала в самом процессе фиксации. В первой фазе этого процесса окислительный потенциал должен быть выше, чем во второй, а стало быть, и коллоидный носитель, от которого зависит высота окислительного потенциала, должен меняться в процессе реакций.

На основе изложенных данных следует предполагать, что окислительный потенциал первой фазы реакции лежит около $+0,08$ — $+0,20$ в, а во второй фазе реакции он смещается до $-0,06$ — $-0,20$ в. В силу этого донаторы водорода, обслуживающие вторую фазу процесса, не могут оказать существенного влияния на первую (кислородную) фазу. Между ними слишком велика разница в потенциале, а в биологических системах, как известно, реагируют только близкие между собою окислительно-восстановительные системы. При этих условиях стало бы понятным и значение кислорода для фиксации молекулярного азота азотобактером. Акцептируя водород от активной группы фермента фиксации азота, он способствует образованию карбонильных групп и тем самым способствует процессу фиксации. На активные же формы водорода, мобилизованные флавиновым или близким ему ферментом, он не будет оказывать влияние или же влияние его будет незначительным. В этом случае стал бы понятным, наконец, всем известный факт, что наиболее активным фиксатором азота атмосферы является аэробный азотобактер и наименее активными оказываются анаэробные фиксаторы, располагающие избыточным количеством водорода. В последнем случае первая фаза процесса тормозилась бы из-за невозможности образования свободных карбонильных групп вследствие слишком низкого окислительного потенциала.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева

Поступило
15 IV 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ М. Федоров, ДАН, 50 (1945); Микробиология, 14, в. 6 (1946); Биологическая фиксация азота атмосферы, Сельхозгиз, 1948.