

Т. А. БЕННЕТ-КЛАРК

**РОЛЬ
ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ
В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ РАСТЕНИЙ**

**НАРКОМЗДРАВ СССР
БИОМЕДГИЗ
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
1938**

T. A. BENNET-CLARK

THE RÔLE
OF THE ORGANIC ACIDS
IN PLANT METABOLISM

The reprint from „The New Phytologist“
vol. 32, pp. 37—71, 128—161, 197—230, 1933

Edited by Prof. *S. D. LVOFF*

THE PEOPLE'S KOMMISSARIAT FOR HEALTH
STATE PUBLISHING HOUSE
FOR BIOLOGICAL AND MEDICAL LITERATURE
LENINGRAD BRANCH
MOSKOW • 1938 • LENINGRAD

Т. А. БЕННЕТ-КЛАРК

РОЛЬ
ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ
В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ РАСТЕНИЙ

Перевод с английского *С. О. ГРЕБИНСКОГО*
под редакцией и с дополнительной статьей
профессора ЛГУ *С. Д. ЛЬВОВА*

НАРКОМЗДРАВ СССР
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
БИОЛОГИЧЕСКОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
МОСКВА • 1938 • ЛЕНИНГРАД

Автором настоящей книги дан в сжатом и доступном изложении наиболее полный обзор современных научных взглядов (по данным мировой и, в частности, советской литературы) на химизм образования и переработки органических кислот в высших и низших растениях.

Книга представляет интерес для научных и практических работников — биологов, а также может служить пособием для студентов вузов и втузов при прохождении курса физиологии растений и биохимии.

Отв. редактор *С. Д. Львов.*

Техн. редактор *Р. Н. Мосезич.*

Корректора *И. И. Поляков и Н. А. Тырса-Эльманович.*

Сдано в набор 17/VII 1937 г. Подписано в печать 12/I 1938 г. Объем $8\frac{1}{4}$ п. л.
Колич. зн. в 1 печ. л. 45.600. Уч. авт. л. 10,5. Формат бумаги 60×92
МД—456. Ленбиомедгиз 80/л. Заказ тип. № 2618 Леноблгорлит № 29
Тираж 3.200 экз. Цена 2 р. 30 к. Бумага Камской бум. ф-ки

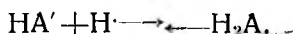
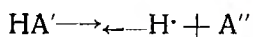
2-я тип. изд-ва ЛОиС, Ленинград, ул. 3-го Июля, 55.

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

ФОРМЫ КИСЛОТНОСТИ И СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ НИМИ

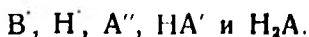
Хотя первыми кислотами, известными человеку, вероятно были кислоты, образующиеся в плодах и при уксуснокислом брожении (что относится к весьма отдаленному прошлому), тем не менее даже в настоящее время очень мало известно как о способе их образования, так и об их роли в обмене веществ у растений.

В настоящее время известно, что лишь в исключительно редких случаях клеточный сок имеет щелочную реакцию; как правило, он кислый, причем очень часто кислотность весьма значительна. Чаще всего кислая реакция сока обусловлена присутствием щавелевой, яблочной и лимонной кислот, о которых у нас и будет идти речь в дальнейшем. Эти кислоты нормально встречаются в виде их солей. Фактическая концентрация свободных кислот обычно сравнительно невелика. Это обстоятельство дало повод к различным ошибочным утверждениям, которых можно немало найти в литературе. Так, например, Гемпель (Hempel, 1917), описывая кислотный метаболизм *Crassulaceae*, делает вывод: „кислотность есть результат комбинации кислой и нормальной солей“. Смолл (Small, 1929) тоже пишет: „в пределах определенного участка значений рН система малатов¹ будет состоять из смеси кислой и нормальной солей“. Подобного рода утверждения создают ошибочное впечатление, что свободные кислоты совсем не содержатся в растительном соке и мы можем его уподобить искусственно приготовленному раствору из смеси кислой и нормальной солей. На самом деле в растительных соках всегда имеются свободные кислоты, находящиеся в равновесии с другими видами ионов. А именно, в них должны находиться: 1) катионы оснований (В'), образованные диссоциацией солей; 2) двухвалентные анионы (А''), образованные из нейтральных солей, и 3) одновалентные анионы (НА'), возникшие при диссоциации кислых солей. Эти последние анионы (НА') диссоциируют дальше, образуя Н-ионы, и дополнительно реагируют с ними, в силу чего имеют место следующие реакции:



¹ Малатами называются соли яблочной кислоты. *Лереб*

Следовательно раствор, который „содержит кислые соли“ двуосновной кислоты, на самом деле состоит из уравновешенной смеси следующих видов ионов и молекул:



Фракция свободной недиссоциированной кислоты может быть связана простым отношением с концентрацией водородных ионов. Недиссоциированная фракция или „остаток диссоциации“ (γ) равен

$$\frac{[H_2A]}{[H_2A] + [HA'] + [A'']} \quad (1)$$

Концентрации различных видов ионов и молекул в состоянии равновесия определяются при помощи констант диссоциации следующим образом:

$$\frac{[HA'] \cdot [H^+]}{[H_2A]} = k_1 \quad (2)$$

$$\frac{[A''] \cdot [H^+]}{[HA']} = k_2 \quad (3)$$

откуда

$$[HA'] = \frac{k_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]} \text{ и } [A''] = \frac{k_2 \cdot k_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]^2};$$

подставляя эти величины в уравнение (1), получаем

$$\gamma = \frac{[H_2A]}{[H_2A] + \frac{k_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]} + \frac{k_2 \cdot k_1 \cdot [H_2A]}{[H^+]^2}}$$

откуда, разделив на $[H_2A]$, получаем

$$\gamma = \frac{1}{1 + \frac{k_1}{[H^+]} + \frac{k_1 \cdot k_2}{[H^+]^2}}$$

Подобным же образом устанавливается зависимость относительного содержания одновалентных и двухвалентных анионов кислоты от концентрации водородных ионов. Для специального случая яблочной кислоты эта зависимость графически выражена на рис. 1. Величина k_1 принята равной $3,95 \cdot 10^{-4}$ и $k_2 = 8,3 \cdot 10^{-6}$. Фракция одновалентных анионов увеличивается до максимума, когда рН достигает средней величины между pK_1 и pK_2 . В кислом растворе преобладает недиссоциированная фракция, а в щелочном соответственно фракция двухвалентных анионов.

Актуальная кислотность растительных соков обычно выражается величиной $pH < 5,5$, а в специальных случаях суккулентных растений, у *Polygonales* и у некоторых других групп

растений, исследованных со стороны их кислотной системы, величина рН сока находится, большей частью, еще ниже — в пределах между 4 и 5. Поэтому некоторая, хотя и небольшая доля от общего количества малатов должна находиться в соке в форме свободной недиссоциированной кислоты. Отношения, показанные на рис. 1, можно сопоставить для примера с данными Смолла, который нашел, что свободная яблочная кислота совершенно отсутствует в малатной системе при $pH=5$, но, хотя и в небольших количествах, обнаруживается при $pH=3,95$.

На самом же деле при $pH=5$ в виде свободной недиссоциированной кислоты должно присутствовать около 3% от общего количества малатов, а при $pH=3,95$ — около 20%.

В кислых растворах солей двуосновных кислот, каковыми и являются растительные соки, мы должны различать четыре величины; в литературе их обычно не отделяют друг от друга с полной ясностью. Первая — концентрация водородных ионов — немецкими авторами очень часто обозначается как „акту-

альная кислотность“. Вторая — концентрация свободной недиссоциированной кислоты; термин „свободная кислота“, часто встречающийся в литературе, не относится к концентрации свободной недиссоциированной кислоты, которая сама по себе недоступна прямому определению; ее можно лишь приблизительно вывести из величины рН методом, указанным выше. Третья — титруемая кислотность. Ее, почти как правило, обозначают в литературе как „свободная кислота“. Но это выражение совершенно ошибочно, так как фракция, способная нейтрализовать прибавляемую щелочь, составляется из фракции свободной кислоты, находящейся в недиссоциированном состоянии, плюс половина фракции одновалентных ионов (HA'). Эти формы кислот могут превращаться друг в друга. В самом деле, представим себе, что свободная недиссоциированная кислота будет использована, тогда нарушенное равновесие восстановится при помощи реакции: $2\text{HM}' = \text{H}_2\text{M} + \text{M}''$, протекающей слева направо; наоборот, при образовании излишка свободной кислоты равновесие

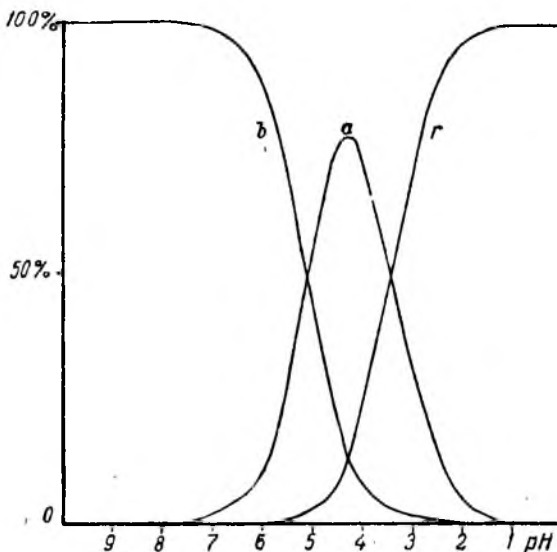


Рис. 1. Процентные соотношения между недиссоциированной яблочной кислотой и ее анионами в зависимости от величины рН.

$$b = M'', a = \text{HM}', r = \text{H}_2\text{M}.$$

восстановится путем обратного течения реакции. Четвертая—общая кислотность—является суммой анионов и молекул недиссоциированной кислоты; ее поэтому лучше всего выражать как сумму молей или эквивалентов кислоты. Эту величину мы определяем осаждением предварительно нейтрализованных кислот в виде нерастворимой соли. Разницу между общей и титруемой кислотностью можно обозначить как нетитруемая кислотность; выражение „связанная кислота“, которое иногда употребляется для обозначения этой формы кислотности, не вполне точно. Путаница между терминами „свободная кислота“ и „титруемая кислота“ напоминает ту путаницу, которая раньше нередко наблюдалась между величинами—актуальная концентрация водородных ионов (рН) и общее количество кислотного водорода (выражаемое в единицах нормальности кислоты).

Обычно величина вновь возникшей или, наоборот, израсходованной за известное время кислоты получается путем определения изменений титруемой кислотности, и это изменение в большинстве случаев будет действительно совпадать с изменением величины общей кислотности. Изменение общей кислотности будет точно равно изменению титруемой кислотности, если за это время не будет происходить изменений в содержании оснований. Единственным основанием, концентрация которого может быстро изменяться в тканях, является аммиак, причем, по данным Руля и да (Ruhl and) и его сотрудников, многие растения, богатые органическими кислотами, также богаты аммиаком, и при этом в содержании последнего наблюдаются быстрые колебания.

К сожалению, пока этими авторами были опубликованы только предварительные результаты их опытов и притом только с двумя объектами—*Begonia* и *Rheum*,—и мы до сих пор имеем еще слишком мало сведений о распространении богатых аммиаком растений в нашей флоре.

В том случае, если аммиак образуется одновременно с образованием кислоты, мы будем иметь увеличение содержания общей кислотности, но титруемая кислотность не будет увеличиваться в таком же размере и даже может уменьшиться, если эквивалентов аммиака будет образовано больше, чем эквивалентов кислоты. Изменение величины общей кислотности будет равно изменению титруемой кислотности плюс изменение в содержании аммиака (в каждом случае увеличение концентрации будем выражать знаком плюс, а уменьшение—знаком минус). Мы подчеркиваем это здесь потому, что изменения в содержании титруемой кислотности и в содержании аммиака можно сравнительно легко определить со значительной точностью, тогда как определение величины общей кислотности представляет большие затруднения и подвержено большим ошибкам.

Поэтому наблюдения над изменениями общей кислотности желательно одновременно проверять определением изменений титруемой кислотности и содержания аммиака, алгебраическая сумма которых будет равна изменению общего содержания кислоты.

Этот вопрос заслуживает внимания, так как большинство данных, касающихся кислотного метаболизма в растениях, получено в опытах с содержащими яблочную кислоту суккулентными растениями. Эти растения характеризуются как очень бедные аммонийными солями, причем отношение числа эквивалентов аммиака к числу эквивалентов титруемой кислоты у них обычно менее 1:100 и колебания в содержании аммиака незначительны. Поэтому для оценки изменений в общем содержании кислот у этих растений мы можем непосредственно использовать уже имеющиеся в литературе цифровые данные о колебаниях в их тканях титруемой кислотности. Однако с таким заключением не соглашается Бендрат (Bendrat, 1929), работающая в лаборатории Рулянда. Она полагает, что по изменению титруемой кислотности нельзя судить о кислотном метаболизме у суккулентов, так как изменение общей кислотности по ее данным во многих случаях идет в направлении, противоположном изменению титруемой кислотности, и почти во всех случаях итог изменения титруемой кислотности отличается от итога изменения общей кислотности. Так, в одном типичном опыте (Bendrat, 1929, стр. 564, опыт № 74), в котором объектом служил *Sempervivum glaucum*, были отмечены следующие изменения:

Общая кислотность	+ 18%
Титруемая кислотность	- 11%
Концентрация Н ⁺	+ 49%

Увеличение общей кислотности, сопровождаемое уменьшением титруемой кислотности, можно было бы объяснить образованием больших количеств аммиака, однако нет никаких данных для предположения, что он образуется в таких больших количествах у суккулентов. В данном случае вполне ясно, что толкование результатов обусловлено экспериментальной ошибкой, потому что увеличение общего содержания кислоты и уменьшение титруемой должны неизбежно привести к уменьшению, а не к увеличению концентрации водородных ионов. Тот факт, что по крайней мере в дюжине опытов знак изменения концентрации Н⁺ противоположен тому знаку, который нужно было бы ожидать от изменения кислотности, ясно показывает, что экспериментальная техника, использованная при определении общей и титруемой кислотности, не гарантировала экспериментатора от серьезных ошибок. К сожалению, эта техника в работе не описана, но различные методы определения общей кислотности, обзор которых дается ниже, далеко не безупречны в смысле точности и значительно уступают в этом отношении методам по определению титруемой кислоты, из чего можно сделать вывод, что последние измерения являются более надежными показателями количественных изменений в кислотности.

Уже было доказано, что единственным основанием, способным вызывать быстрое исчезновение титруемой кислотности путем ее нейтрализации, является аммиак, но более медленная нейтрализация кислот может происходить у многих растений и за счет

других оснований, поглощаемых из почвы. Эти основания высвобождаются из солей после переработки связанных с ними анионов NO_3^- , PO_4^{3-} и SO_4^{2-} в частицы белковой молекулы; но так как сумма эквивалентов оснований, связанных с органическими кислотами, часто превышает сумму эквивалентов нитратов, сульфатов и фосфатов, усвоенных растением, то очевидно, что поглощение катионов должно сопровождаться или переходом H^+ из растения в почву, или же обратно—вхождением в растение таких анионов, как OH^- (гидроксильный ион) или аллюминат-ион, которые теряют свои отрицательные заряды при взаимодействии с другими ионами внутри растения.

Эта медленная нейтрализация, постепенно возрастающая по мере увеличения возраста растения, типична для так называемых „малатных“ растений (таких, как, например, *Crassulaceae*, *Cactaceae*). В этих растениях старые части содержат по сравнению с молодыми меньше титруемой и больше нетитруемой кислоты [Аструк (Astruc), 1903].

Из приведенного выше анализа кислотной системы следует, что уравновешенная смесь кислоты и ее ионов действует в качестве буфера или регулятора концентрации водородных ионов и концентрации свободной недиссоциированной кислоты. Насколько велико в метаболических процессах значение буферной системы в этом втором отношении—пока еще не выяснено. Однако несомненно, что при тех буферных свойствах, какими обладает кислотная система в растительном соке, ни новообразование органических кислот ни их потребление со стороны растения не в состоянии вызвать сколько-нибудь заметных изменений в концентрации свободной недиссоциированной кислоты. При этом могут, конечно, произойти существенные изменения в титруемой кислотности, но, благодаря большим резервам нетитруемой кислоты (соли кислоты), сдвиг общей кислотности будет ничтожный; столь же незначительными будут также изменения в величине pH, а поэтому и в концентрации свободной кислоты. Поэтому нельзя рассчитывать, чтобы изменения титруемой кислотности вызвали заметные сдвиги в различных метаболических процессах, тесно связанных с динамикой органических кислот.

В заключение не мешает остановиться на таком высказываемом иногда соображении, что поскольку органические кислоты присутствуют в растении в высокой концентрации, то им поэтому и нельзя приписывать активного участия в метаболизме, так как только неактивный запасный или ненужный продукт может накапливаться в тканях в значительных количествах. Не касаясь сейчас других соображений, о которых речь будет дальше, мы пока противопоставим этому соображению тот факт, что свободные органические кислоты обычно находятся в растениях в очень низких концентрациях: так, концентрация свободной яблочной кислоты в растительных тканях редко превышает 0,05% свежего веса, а обычно она много ниже, хотя общее содержание малатов может достигать 2% от сырого веса.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДИ РАСТЕНИЙ ВАЖНЕЙШИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Щавелевая кислота. Оксалаты и щавелевая кислота, видимо, встречаются почти во всех растениях, хотя в большинстве случаев лишь в небольших количествах. Все наиболее тщательно проведенные анализы указывают на присутствие хотя бы следов оксалатов; но растений, богатых оксалатами, сравнительно мало, и они относятся по большей части к следующим группам.

Polygonales. Роды *Rumex* и *Oxyria* считались долгое время особенно богатыми щавелевой кислотой. Относительно *Rheum* также предполагали, что это типичное оксалатное растение (Steinmann, 1917), но недавняя работа Рухлянда и Ветцеля (Ruhl and Wetzel, 1927) показала, что корневища и черешки листьев содержат только следы оксалатов, но вместе с тем богаты малатами. Листовые пластинки в начале сезона содержат мало оксалатов, но по мере их старения малаты исчезают и появляются оксалаты. Особенно много последних содержится осенью в отмирающих листьях.

Centrospermae. Этот порядок, близкий к *Polygonales*, содержит много хорошо известных оксалатных растений, которые почти все характеризуются незначительным количеством титруемой кислоты, почему и обладают реакцией, близкой к нейтральной. К таким растениям относятся суккулентные галофиты *Salicornia*, *Salsola*, *Atriplex* и другие. С ними сходны пустынные суккуленты, относящиеся к *Portulacaceae*. Растения, относящиеся к последнему семейству и к *Aizoaceae*, содержат также яблочную кислоту; у *Mesembryanthemum cordifolium*, например, отношение яблочной кислоты к щавелевой может достигать 70:100, но в старых листьях оно падает, примерно, до 25:100. Для других представителей *Centrospermae* мы не располагаем соответствующими данными, но есть основания полагать, что кислотный метаболизм у *Polygonales* и *Centrospermae* должен быть сходен с таковым у *Rheum* и *Mesembryanthemum*, двух лучше всего исследованных родов. Недавняя работа Годей и Иванса (Thoday and Evans, 1932) показала, что малаты и оксалаты у *Mesembryanthemum* не встречаются в клетках совместно, но что одни клетки богаты оксалатами, а другие содержат малаты при полном отсутствии оксалатов. Значение такого дифференцированного распределения кислот еще не выяснено.

Geraniales. *Geranium*, *Pelargonium*, *Tropeolum* и *Oxalis* являются типичными кислыми растениями, богатыми щавелевой кислотой. Виды *Geranium* наряду со щавелевой богаты также яблочной кислотой.

Parietales. Виды рода *Begonia* принадлежат к числу весьма кислых растений, содержащих почти исключительно щавелевую кислоту; в небольших количествах (0,5%) у них имеется, однако, и яблочная кислота (Ruhl and Wetzel, 1926). Поражает чрезвычайно низкий рН клеточного сока листьев, около 1,5—2,0.

Другие растения. Большинство заслуживающих внимания других растений, продуцирующих оксалаты, составляют плесневые грибы. Почти все исследованные грибы продуцируют щавелевую кислоту, в некоторых случаях в очень больших количествах, так что рН среды, в которой они растут, может иметь такую низкую величину, как 1,5.

Группа яблочной кислоты. Вероятно, большинство растений содержит яблочную кислоту, но большая трудоемкость методов, пригодных для ее надлежащего опознавания, не позволила до сих пор широко проследить ее распространение среди растений; в еще большей степени то же самое приходится сказать и относительно родственных ей кислот — винной, янтарной, фумаровой и ди-окси-малеиновой. Ввиду несомненно обширного распространения малатов в растительном мире, в приводимом ниже списке перечислены лишь естественные порядки и особо отмечены те семейства и роды, которые характеризуются особенно сильным накоплением малатов.

<i>Liliiflorae.</i>	Многие виды, <i>Agave</i> , <i>Haworthia</i> и др.
<i>Farinosae.</i>	<i>Bromeliaceae</i> .
<i>Microspermae.</i>	Большинство орхидных.
<i>Polygonales.</i>	<i>Rheum</i> , содержит также щавелевую кислоту.
<i>Centrospermae.</i>	<i>Mesembryanthemum</i> , содержит также щавелевую кислоту.
<i>Ranales.</i>	<i>Ranunculus</i> , <i>Berberis</i> .
<i>Rhoedales.</i>	<i>Fumaria</i> , <i>Glaucium</i> , содержат также фумаровую кислоту.
<i>Rosales.</i>	<i>Crassulaceae</i> , <i>Saxifragaceae</i> , <i>Rosaceae</i> и др.
<i>Geraniales.</i>	<i>Euphorbiaceae</i> . <i>Geranium</i> (+ щавелевая кислота).
<i>Sapindales.</i>	<i>Fraxinus</i> , <i>Staphyleaceae</i> .
<i>Rhamnales.</i>	<i>Rhamnus</i> , <i>Vitaceae</i> , содержат также винную кислоту.
<i>Opuntiales.</i>	Все.
<i>Contortae.</i>	<i>Asclepiadaceae</i> .
<i>Campanulatae.</i>	Многие сложноцветные. <i>Lactuca</i> содержит также янтарную кислоту.

Заслуживает внимания то обстоятельство, что растения, очень богатые малатами, распространены среди многих естественных порядков.

Во всех случаях, когда были сделаны подробные анализы, обнаружено, что яблочная кислота всегда сопровождается по крайней мере следами родственных кислот и щавелевой кислотой. Повидимому, это соотношение имеет значение общей нормы.

Большие количества фумаровой кислоты отмечены у *Fumaria*, *Corydalis* и *Glaucium*. У последней отношение концентраций фумаровой кислоты к яблочной составляет приблизительно 2 : 1. В больших количествах присутствуют также щавелевая и лимонная кислоты и, кроме того, следы ди-окси-малеиновой кислоты [Шмалфус (Schmallfuss, 1923)].

Винная кислота характерна для листьев и плодов *Vitaceae*, которые содержат также небольшие количества яблочной и янтарной кислот.

Янтарная кислота обнаружена в сравнительно больших количествах у *Lactuca* [Ульрих (Ulrich, 1926)] вместе с приблизительно одинаковым количеством яблочной кислоты. Обе они, а также фумаровая кислота, образуются в значительных количе-

ствах многими плесневыми грибами, особенно мукорами и *Aspergillus fumaricus*. Дальнейшие сведения о распространении этих кислот можно найти в работах Францена (Franzen и др., 1921—1925) и его сотрудников. В растениях, содержащих яблочную и винную кислоты, обычно находятся оба изомера той и другой кислот, как лево-, так и правовращающие, но преобладающими по количеству формами являются l-яблочная и d-винная кислоты.

Группа лимонной кислоты. Лимонная кислота по своему строению химически близка к яблочной кислоте, и в настоящее время имеется много оснований полагать, что в растении она образуется из яблочной кислоты. Почти всегда ее находят в тканях, содержащих яблочную кислоту. В плодах цитрусов (*Rutaceae*), у некоторых представителей *Solanaceae*, многих *Aspergilli* и у большинства *Penicillia* она накапливается в больших количествах в сопровождении только следов других кислот (яблочная, щавелевая и др.). Многие плоды содержат большие количества лимонной кислоты в сочетании с яблочной кислотой [Францен и Кейсснер (Franzen и Keyssner, 1923), Францен и Гельверт (Franzen и Helwert, 1923)], среди них виды *Prunus*, *Pyrus*, *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*. Интересно распределение кислот среди видов *Prunus*: плоды *Prunus spinosa* и *Prunus domestica* содержат яблочную кислоту со следами лимонной; *Prunus cerasus* содержит приблизительно равные количества лимонной и яблочной кислот; *Prunus padus* содержит почти исключительно лимонную кислоту и лишь следы яблочной. Как изменяются относительные количества этих двух кислот при созревании плодов, еще не исследовано.

Близко родственные к лимонной—трикарбалиловая и аконитовая кислоты получены из мелассы сахарной свеклы, последняя кислота—также из *Aconitum*.

Другие родственные кислоты. Для полноты обзора укажем, что молочная кислота найдена в значительных количествах у *Rubus*, *Agave*, *Solanum* и *Glaucium*. Следы ее найдены у *Echeveria* и у других суккулентов. Гликолевая кислота обнаружена во многих плодах и в других тканях. Глюконовая кислота в больших количествах накапливается многими плесневыми грибами.

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Общие методы. Метод, употреблявшийся Аструком (Astuc, 1903) и Гемпелем,—непрямой и может иметь лишь ограниченное применение, хотя для тех специальных случаев, с которыми они имели дело, этот метод, возможно, и является пригодным. Они определяют титруемую кислотность титрованием едким натром, а нетитруемую кислотность—озолением тканей и определением количества эквивалентов оснований в золе, причем Аструк титровал для этого золу кислотой, а Гемпель опре-

делял отдельно количество Ca, Mg, Al+Fe и Na+K весовым способом. Авторы исходили из предположения, что все (или почти все) неорганические катионы в тканях связаны с анионами органических кислот; после озоления соли органических кислот превращаются в окислы или карбонаты металлов, которые и определяются титрованием или гравиметрически. Ясно, что аммиак полностью улетучивается при озолении. В некоторых случаях присутствие фосфатов также приводит к значительным ошибкам (см. ниже). Метод дает ценные, хотя и недостаточно точные указания об общей кислотности.

Мы не можем входить здесь в детальное обсуждение различных методов, основанных на осаждении кислот. Чаще всего применяют осаждение кислот в виде их кальциевых или свинцовых солей.

Кальциевые соли всех кислот, кроме щавелевой, растворимы в относительно кислом растворе ($\text{pH} = 3$); оксалат кальция при таком pH растворим очень слабо, но его растворимость увеличивается с увеличением кислотности раствора. Поэтому щавелевая кислота и оксалаты легко определяются в присутствии других кислот [см. ссылку у Абдергальдена (Abderhalden, 1925) на статью Бау (Bau)].

Кальциевые соли обычных многоосновных кислот, а также оксикислот, растворимы в воде, но ничтожно мало растворяются в 80% спирте, почему и осаждаются после прибавления спирта к нейтральному водному раствору.

Кальциевые соли уксусной, гликолевой, глиоксалевой и молочной кислот растворимы в 80% спирту. Последний, наряду с кальциевыми солями многоосновных кислот, осаждаёт также и другие вещества, например полисахариды и некоторые белки, а поэтому по весу полученного осадка или по содержанию в нем углерода еще нельзя судить об общей кислотности. Для определения общей суммы эквивалентов кислоты необходимо сначала озолить материал и затем определить в нем содержание Ca в виде CaO или CaSO₄.

Однако при этом часто встречаются с затруднениями, так как различные вещества, присутствующие в тканевой вытяжке, препятствуют осаждению кальциевых солей органических кислот и особенно яблочной кислоты.

Молочная кислота, например, является одним из таких препятствующих осаждению веществ. Специальный метод определения яблочной кислоты в мышцах, где осаждению ее кальциевых или серебряных солей мешает именно молочная кислота, детально описан Нидгэмом (Needham, 1927).

Многие растения, богатые малатами, содержат также и большие количества различных веществ, препятствующих осаждению малата кальция; *Cactaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, например, содержат слизистые полисахариды (пентозаны и другие), которые препятствуют полному осаждению малатов, и поэтому в опытах с этими растениями необходимо всегда проводить контрольные определения в образцах сока, прибавляя к ним

заранее известное количество яблочной кислоты и наблюдая, в какой мере эта прибавленная кислота снова будет обнаружена при количественном определении. К сожалению, физиологи растений пренебрегали проведением такого контроля (Needham, 1927).

Поэтому точность опубликованных данных об общем содержании кислот в растительных тканях стоит под сомнением.

Таких сомнений не возникает, когда о кислотности судят по количеству щелочи, пошедшей на титрование данного количества растительного материала, но в некоторых случаях и здесь возникает затруднение для правильной оценки получаемых результатов. При титровании с фенолфталеином в качестве индикатора щелочь нейтрализуется не только титруемыми растительными кислотами (яблочная, лимонная, щавелевая и т. д.), но также и более слабыми кислотами и некоторыми другими веществами. Наиболее важными из них являются углекислота и фосфорная кислота, которые присутствуют обычно в небольших количествах, затем белковоподобные соединения, природа которых неизвестна (Nettel, 1917), и малаты алюминия. Так как в некоторых суккулентных растениях малаты алюминия присутствуют в значительных количествах, то необходимо уяснить себе особые свойства этих солей. Растворы этих солей обладают кислой реакцией благодаря тому, что алюминий является очень слабым основанием. При титровании едким натром алюминий осаждается, причем количество алюминиевой соли, находящейся в состоянии гидролиза, зависит от величины рН, при которой раствор титруется. В соке суккулентных растений приблизительно 40% малата алюминия гидролизуется при $\text{pH}=7$ и около 90% при $\text{pH}=9,3$ (конечная точка при титровании с фенолфталеином). Поясним примером значение этого обстоятельства для титрования соков суккулентных растений. Рассмотрим данные первого опыта, представленные в первой строке табл. 1. Так как можно без особой погрешности принять, что все основания здесь представлены в виде солей яблочной кислоты, то отсюда следует, что содержание нетитруемых малатов составляет 22,59 мг-эквивалента¹ (в смысле, определенном в начале статьи). 4,99 мг-эквивалента малата алюминия, при титровании сока до $\text{pH}=7$, должны выделить в процессе гидролиза приблизительно 2,00 мг-эквивалента свободной яблочной кислоты (40% от 4,99); наблюдаемая титруемая кислотность, равная 5,02 мг-эквивалента, таким образом составляется из 2 мг-эквивалентов, образованных за счет гидролиза алюминиевой соли, и из 3 мг-эквивалентов собственно титруемой кислотности, в смысле, указанном выше. Подобным же образом при титровании до $\text{pH}=9,3$ благодаря гидролизу 90% алюминиевой соли дают 4,5 мг-эквивалента кислоты, которая вместе с 3,0 мг-эквивалентами собственно титруемой кислоты в указанном смысле требует при титровании до конечного пункта с фенолфталеином 7,5 мг-экви-

¹ Т. е. сумма мг-эквивалентов кислоты, связанной с катионами $\text{Al} + \text{Fe}$, Ca , Mg , $\text{Na} + \text{K}$.

валента едкого натра. В этом случае, следовательно, общее содержание малатов составляет около 25,6 мг-эквивалента.

ТАБЛИЦА 1

Число мг-эквивалентов на 100 г сока (Нетрепел, 1917)

Растение	Требуется NaOH, чтобы довести реакцию раствора до		Количество различных катионов в мг-эквивалентах			
	pH=7	pH=9,3	Al+Fe	Ca	Mg	Na+K
<i>Rochea falcata</i>	5,02 4,21	7,49 6,61	4,99 6,63	9,13 7,36	1,73 1,10	6,73 6,46
<i>Cotyledon lin- guaefolia</i>	0,59 1,02	2,27 2,41	3,03 2,29	12,00 11,60	0,63 0,76	1,71 1,53

Тодэй и Иванс (Thoday a. Evans, 1931) указывают, что в некоторых случаях на результаты титрования влияет также присутствие фосфатов. Большинство представителей *Crassulaceae* бедно фосфатами, но, например, *Kleinia* содержит много фосфатов, особенно в старых стеблях. Так как фосфаты нейтрализуются до трехосновной соли при титровании до pH=9,3, то титрование дает сумму титруемых фосфатов и малатов, что, конечно, должно иметь немаловажное значение при оценке результатов титрования, за исключением тех случаев, когда ткани содержат очень незначительные количества фосфатов по сравнению с малатами. При pH=4,5 все фосфаты находятся в виде бивалентных ионов (HPO_4^{2-}), и большая их часть продолжает оставаться в этом состоянии и при pH=6. Отсюда следует, что если титровать сок до pH=6, то фосфаты еще не будут реагировать в сколько-нибудь заметных количествах со щелочью, тогда как яблочная кислота будет уже почти вся оттитрована, как это видно из кривых титрования Тодэй и Иванса.

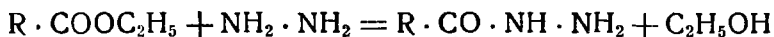
Титрование до этого конечного пункта дает более удовлетворительные результаты для определения титруемой яблочной кислоты (а также лимонной и щавелевой), поскольку они не нуждаются в этих условиях в поправках на содержание фосфатов и алюминатов в клеточном соке. Автор нашел, что chlor-phenol-red является хорошим индикатором для этого конечного пункта; титрование должно производиться с компаратором.

В заключение отметим, что при изучении кислотного метаболизма основной задачей является определение количества вновь образованной или использованной кислоты, а поэтому необходимо учитывать изменение титруемой или общей кислотности. Так как общее содержание кислоты значительно превышает величину титруемой кислотности, то процентное изменение последней будет более значительным; поэтому ошибки, связанные со взятием средней пробы и самими анализами, будут меньше

при учете титруемой кислотности, чем при учете кислотности общей. Для правильного понимания полученных данных об изменении титруемой кислотности надо знать, не произошло ли при этом изменения природы кислоты, а также изменения в содержании алюминия или аммиака в тканях.

Специальные аналитические методы. а) Францен с сотрудниками (1921, 1922) пользовались следующим методом. Кислоты осаждались уксуснокислым свинцом в виде свинцовых солей. Осадок освобождался от белков и углеводных соединений путем разложения их свинцовых соединений углекислотой и промыванием. Затем кислоты освобождались из осадка обработкой сероводородом и после этого переводились в этиловые эфиры. Этиловые эфиры затем фракционированно разгонялись в вакууме.

Таким путем достигали грубого разделения кислот. Полученные эфиры превращали затем в гидразиды соответствующих кислот, встряхивая эфир с гидратом гидразина в спиртовом растворе, согласно реакции:



Гидразиды обычных кислот разделяются относительно легко, и кислоты могут быть охарактеризованы по точке плавления этих гидразидов. Метод не является строго количественным, но даёт наиболее удовлетворительные результаты при определении кислот в тех случаях, когда они содержатся лишь в виде следов. Детали даны в отдельных статьях Францена (1921, 1922).

Поляриметрические методы. б) Самыми распространенными оптически активными кислотами в растениях являются яблочная и винная кислоты, но так как обе они представлены в обеих d- и l-формах, то для определения относительного содержания обоих изомеров поляриметрические методы сами по себе будут недостаточны и могут быть использованы для этой цели лишь в сочетании с другими аналитическими методами.

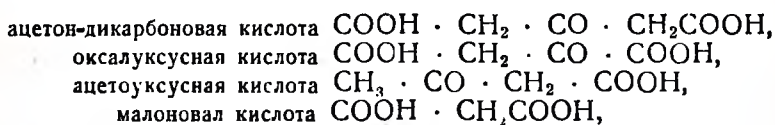
Если один из активных изомеров находится в избытке, то для определения его обычно используется открытие Вальдена, по которому соли уранила (UO_2NO_3 и др.) в присутствии едкого натра или аммиака сильно увеличивают вращение оксикислот. Это явление объясняется образованием соединения, в котором уранил связывается с кислородным атомом гидроксильной группы в α -положении (α -оxygen atom). В разбавленном растворе молекулярное вращение l-яблочной кислоты близко к $-2,5^\circ$, а в виде уранилового соединения в присутствии аммиака оно доходит до -436° . Винная, молочная и другие оксикислоты ведут себя подобным же образом. Некоторые соединения молибдена и вольфрама также увеличивают оптическую активность α -оксикислот. Ауэрбах и Крюгер развили этот метод и использовали его при исследовании метаболизма яблочной кислоты в мышцах. [Об этом — в статье Нидгэма (Needham, 1927).]

в) Янтарная кислота, в отличие от яблочной, винной, лимонной, щавелевой и других кислот, встречающихся обычно в расте-

ниях, плохо окисляется кипящим раствором перманганата, и поэтому, после того как эти кислоты разрушены окислением, янтарную кислоту можно экстрагировать из раствора эфиром, а затем осадить и взвесить в виде серебряной соли [Нидгэм (Needham, 1927)].

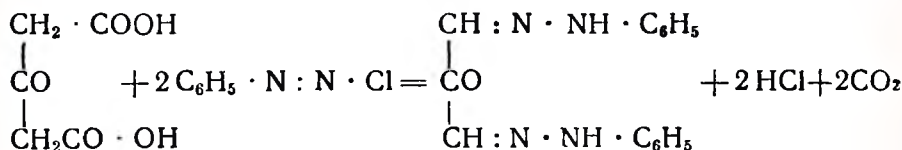
г) Специальные, наиболее удовлетворительные методы для количественного определения лимонной кислоты основаны на превращении последней при нагревании с H_2SO_4 и $KMnO_4$ в ацетон-дикарбоновую кислоту, с потерей CO_2 . В методе, разработанном Кунцом (Abderhalden, 1925), полученная таким образом ацетон-дикарбоновая кислота превращается под воздействием брома в нерастворимый пентабром-ацетон, по весу которого вычисляется количество самой лимонной кислоты.

д) Кислоты, содержащие активную метиленовую группу ($-CO \cdot CH_2 \cdot CO-$), такие, как



реагируя с диазосоединениями, дают гидразоны, которые вообще трудно растворимы.

Например, ацетон-дикарбоновая кислота, реагируя с хлористым диазобензолом:



образует нерастворимый фенилгидразон мезоксалевого альдегида. Этот метод был использован для обнаружения ацетон-дикарбоновой и малоновой кислот среди продуктов метаболизма плесневых грибов [Челленджер, Субраманиам и Уолкер (Challenger, Subramaniam and Walker, 1927)], но не разработан как количественный метод.

е) Заслуживают упоминания хорошо известные реакции Дениже. Применяющийся реактив представляет собой раствор сульфата ртути и серной кислоты в воде. При нагревании его (при температуре не свыше $50^\circ C$) с раствором, содержащим лимонную кислоту, с прибавлением перманганата калия по каплям, лимонная кислота окисляется и выпадает белый кристаллический осадок основной ртутной соли ацетон-дикарбоновой кислоты. Эта реакция, подобно большинству реакций осаждения, не является абсолютно надежной, так как другие вещества также дают осадки. При определенных условиях осаждается двойная соль оксалата ртути [Бернгауэр и Зибенэугер (Bernhauser u. Siebenäuger, 1931)].

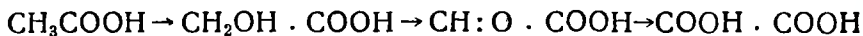
Ацетон также дает осадок с горячим реактивом. В модифицированной форме та же реакция употребляется для испытания на присутствие яблочной кислоты; вместо сульфата берется ацетат ртути с уксусной кислотой, и в тех же самых условиях, как и при испытании на лимонную кислоту, яблочная кислота образует осадок, представляющий собой основную ртутную соль щавелево-уксусной кислоты.

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ РАСТЕНИЙ, ПОСЛУЖИВШИЕ ОСНОВОЙ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ГИПОТЕЗ

а) Щавелевая кислота

Способы образования. Оксалат натрия образуется прямым соединением натрия с углекислотой при высокой температуре; этому факту соответствует хорошо известная теория фотосинтеза Либиха, которая затем получила поддержку Баура (Ba u r, 1908) и др. Нет, однако, никаких прямых доказательств в пользу того взгляда, что щавелевая кислота в зеленых растениях образуется путем восстановления углекислоты. Щавелевая кислота легко образуется *in vitro* окислением многих алифатических и других соединений, таких, как углеводы, яблочная и винная кислоты, а также спирт, уксусная, гликолевая и глиоксалева кислота.

Окисление уксусной кислоты, вероятно, происходит следующим путем:



уксусная
кислота

гликолевая
кислота

глиоксалева
кислота

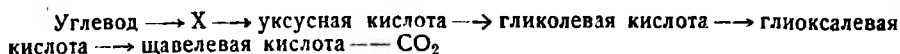
щавелевая
кислота

Вероятнее всего, что в большинстве тех случаев, когда щавелевая кислота образуется *in vitro* при окислении различных алифатических соединений, предшествующим ей промежуточным продуктом является глиоксалева кислота.

Легкое превращение большого числа веществ в щавелевую кислоту *in vitro* вызывает предположение о том, что эта кислота может образовываться в растениях различными путями, но до сих пор еще не удалось точно установить те вещества, которые являются ближайшими предшественниками щавелевой кислоты в процессе ее образования. Некоторые экспериментальные данные в этом направлении имеются в специальном случае плесневых грибов.

Многие расы плесневого грибка накапливают большие количества щавелевой кислоты при культивировании их на таких субстратах, как углеводы, яблочная кислота и др.; они также образуют щавелевую кислоту при снабжении их уксусной кисло-

той. Отсюда вытекает общее предположение, что процесс дыхания у этих плесневых грибов протекает по следующей схеме:

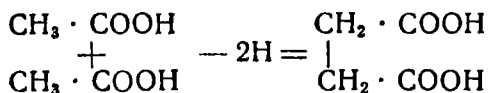


[более детальные данные по этому вопросу см. в третьей части нашего обзора, а также у Bernhauer и Siebenäuger (1931), и в работах Челленджера (Challenger) с сотрудниками].

Накопление щавелевой кислоты легко объяснить, если предположить, что скорость ее образования превышает скорость ее разрушения, и соответственно отсутствие накопления гликолевой и глиоксалевой кислот является результатом того, что константы скоростей образования этих кислот меньше, чем константы скоростей их распада.

На основании этой гипотезы следовало бы ожидать, что щавелевая кислота будет образовываться из глиоксалевой и гликолевой кислот более быстро, чем из уксусной кислоты. Однако теперь экспериментально установлено, что определенные расы *Aspergillus*, которые легко образуют щавелевую кислоту из уксусной, не накапливают ее при даче им гликолевой и глиоксалевой кислот, хотя эти кислоты постепенно исчезают в присутствии гриба [Рэйстрик и Кларк (Raistrick, Clark, 1919), а также неопубликованные данные автора, о которых будет речь дальше]. Ясно, что в этом случае щавелевая кислота отнюдь не образуется по схеме постепенного, шаг за шагом, окисления уксусной кислоты, а поэтому нет уверенности в том, что такое окисление гликолевой и глиоксалевой кислот вообще может иметь место в растительных тканях.

Ветцель (Wetzel, 1927) полагает, что окисление таких соединений, как ацетальдегид и уксусная кислота, должно идти другим путем, путем дегидрирования, связанного с синтезом:



Однако никаких доказательств в пользу такого понимания реакции Ветцель не приводит.

В связи с только что указанными критическими соображениями следует теперь перейти к обсуждению возможности таких путей образования щавелевой кислоты, которые не требовали бы участия глиоксалевой кислоты в качестве промежуточного продукта и не предполагали бы прямого окисления уксусной кислоты или альдегида.

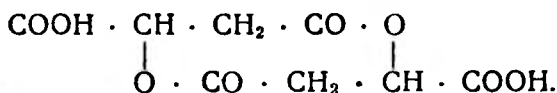
Единственной реакцией такого типа, заслуживающей внимания, представляется только реакция гидролиза щавелевоуксусной кислоты. Щавелевоуксусная и ацетоуксусная кислоты в форме эфиров подвергаются двум типам гидролиза, известным как

Бассалик (Bassalik, 1917) и Штехелин (Staehelin, 1919) утверждают, что им якобы удалось обнаружить особый энзим, который вызывает разрушение щавелевой кислоты. Энзим обнаруживает устойчивость к нагреванию, под влиянием которого он хотя и разрушается, но чрезвычайно медленно. Для осуществления действия фермента необходим кислород, на основании чего энзим относится авторами к группе оксидаз. Однако количество углекислоты, выделяющейся при исчезновении определенного количества оксалатов, оказывается слишком ничтожным по сравнению с тем, какого нужно было бы ожидать при их окислении, почему в настоящее время нельзя сказать ничего определенного о характере этого процесса.

б) Яблочная и родственные ей кислоты

Яблочная кислота—моно-окси-янтарная кислота; в растениях обычно встречаются обе формы этой кислоты—лево- и правовращающая, но в таких плодах, как яблоки, преобладает левовращающая форма. В листьях суккулентных растений, у *Rheum*, а вероятно и многих других, содержание обеих форм приблизительно одинаково. Существующие в настоящее время данные ничего не говорят о влиянии изменяющихся природных и экспериментальных условий на относительные количества обоих изомеров.

Яблочная кислота, найденная у представителей *Crassulaceae*, часто принимается за изо-яблочную $\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{CH}(\text{COOH})_2$. Основанием для этого служат наблюдения Майера (Maier, 1878, 1899), по которым экстрагированная из *Crassulaceae* яблочная кислота дает соли, отличающиеся в некоторых отношениях от обычных малатов. Эберсон (Aberson, 1898) переисследовал поведение этой кислоты и также обнаружил различия в ее свойствах по сравнению с обычной яблочной кислотой. Замечательно, что эта так называемая крассуляциевая кислота при перегонке в вакууме образует малиды,¹ тогда как из обычной кислоты в этих условиях образуется смесь малеиновой и фумаровой кислот. Эберсон показал, что крассуляциевая кислота является окси-янтарной кислотой $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHON} \cdot \text{COOH}$, а не изо-яблочной (окси-метилмалоновой) кислотой. Францен и Остертаг (Franzen и Ostertag, 1922) позже показали, что единственная разница между крассуляциевой и обычной яблочной кислотой состоит в том, что первая из них является смесью обычной яблочной кислоты с небольшими количествами ее ангидридной формы (ангидрида малил-яблочной кислоты):



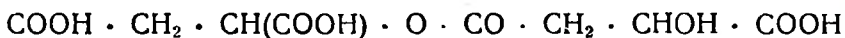
¹ Малиды—неполные сложные эфиры (типа лактиды) двух частиц яблочной кислоты.—Пер.

Им удалось изолировать этот ангидрид в виде его диэтилового эфира.

Неясно, однако, присутствует ли ангидрид в живых тканях, так как вполне возможно, что он образовался в процессе экстракции яблочной кислоты из тканей.

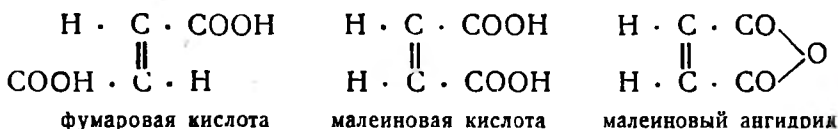
При нагревании яблочная кислота теряет воду, причем за ее счет образуются различные продукты, характер которых зависит от условий, при которых производилось нагревание.

Первым продуктом является малил-яблочная кислота



и малид (неполный эфир яблочной кислоты, формула дана выше).

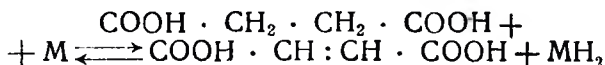
При дальнейшем нагревании от каждой молекулы кислоты теряются одна или две молекулы воды с образованием малеинового ангидрида и фумаровой кислоты:



Малеиновая кислота не обнаружена в живых тканях, но фумаровая кислота широко распространена. Энзим фумараза превращает фумаровую кислоту в смесь фумаровой и l-яблочной кислот, с определенным количественным соотношением между ними, причем то же соотношение достигается при действии энзима на одну l-яблочную кислоту. Фумараза широко распространена в животных тканях и бактериях [Вольф (Wolf, 1929)] и вероятно присутствует в некоторых плесневых грибах, так как Челленджер и Клейн (Challenger и Klein, 1929) показали, что *Aspergillus niger* превращает фумаровую в l-яблочную кислоту; d-яблочная кислота при этом совсем не образуется или, во всяком случае, ее ни разу не удалось обнаружить. В настоящее время неизвестно в точности, сопровождается ли d-яблочная кислота в растениях d-фумаразой или же ее судьба отличается от судьбы l-яблочной кислоты.

Яблочная кислота легко окисляется in vitro; сильные окислители дают щавелевую кислоту и, в конце концов, CO₂; слабые — типа H₂O₂ — дают щавелевоуксусную кислоту. В соответствии с этим многие полагают, что именно таким путем происходит разрушение яблочной кислоты и в самих растениях, причем известную опору этой точке зрения как будто можно усматривать в тех процессах, которые наблюдаются в покоящихся бактериях, хотя до сих пор вполне точно не установлено, действительно ли здесь происходит прямое окисление яблочной кислоты.

Покоящиеся бактерии в отсутствии кислорода, но при наличии подходящего водородного акцептора, типа метиленовой синьки, могут производить дегидрирование янтарной кислоты до фумаровой кислоты



но они не в состоянии дегидрировать ни яблочной кислоты (до щавелевоуксусной) ни фумаровой. Однако в присутствии кислорода они превращают фумаровую кислоту в пировиноградную, причем можно считать почти доказанным, что сначала образуется щавелевоуксусная кислота, а затем уже обычным путем отщепляется CO_2 с образованием пировиноградной кислоты.

Реакции представлены в табл. 2.

На первый взгляд представляется вероятным, что реакции, изображенные в этой схеме, действительно могут осуществляться внутри растения; однако фактические данные, о которых будет речь дальше, заставляют усомниться в реальности этих реакций и приводят к мысли, что основной путь, по которому идет переработка яблочной кислоты в растении, имеет другое направление.

В пояснение схемы не мешает еще отметить, что щавелевоуксусная кислота может существовать в трех формах: в виде кетоформы, которая преобладает в ее солях, и двух энольных форм: оксималеиновой кислоты, которая образуется при действии слабых кислот на соль щавелевоуксусной кислоты, и оксифумаровой кислоты, образующейся при действии сильных кислот на оксималеиновую кислоту.

Давно известно, что яблочная кислота, присутствующая в растительных тканях, исчезает при их освещении, причем ряд исследователей это действие освещения пытался свести к чисто фотохимической реакции.

Шпэр (Sproer, 1913) показал, что кислотность выжатого сока *Opuntia* уменьшается, если сок выставить на солнечный свет. Этот процесс идет без участия какого-либо фермента, так как, согласно опытам Шпэра, такому же раскислению на свету и примерно с той же скоростью, как и в случае выжатого из растения сока, подвергается и искусственно приготовленный раствор чистой яблочной кислоты, если только к нему добавить золы растения. Эта скорость была, однако, в тридцать—сорок раз меньше той скорости, с которой кислота разрушается в неповрежденном живом растении. Шпэр предполагает, что первой стадией процесса является отщепление CO_2 из карбоксильной группы с образованием спирта:

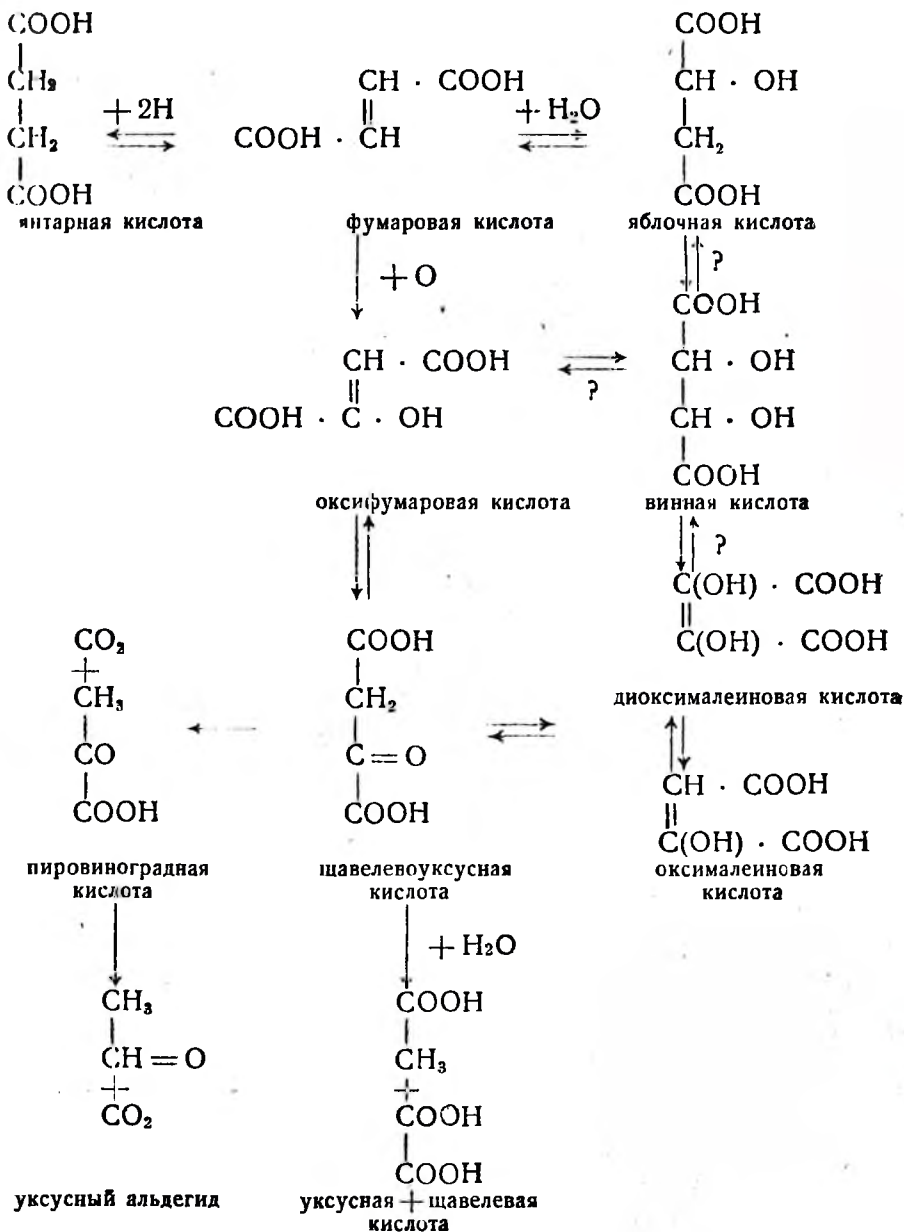


Другие продукты, которые удалось здесь обнаружить, образуются, можно предполагать, за счет этого спирта — в результате

его последующего окисления. Таковы альдегиды, гликолевая и шавелевая кислоты, муравьиный альдегид, муравьиная кислота и другие.

ТАБЛИЦА 2

Биологически возможные взаимоотношения между кислотами, входящими в группу яблочной кислоты



Хорошо известно, что и другие оксикислоты в водных растворах на солнечном свете в присутствии определенных солей подвергаются разложению.

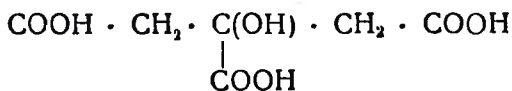
Так как исчезновение кислот на свету в живых тканях предвращается действием наркотиков, что было известно еще до работы Шпэра (Аструп, 1903), то невозможно принять гипотезу, которая отрицала бы связь этого процесса с жизненной активностью тканей. Вопрос этот мы обсудим позднее, в связи с суккулентными растениями.

В заключение следует отметить, что в растениях широко распространена, и притом часто в значительном количестве, аминокислота, соответствующая яблочной кислоте,—аспарагиновая кислота и ее амид—аспарагин $\text{COOH} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$. Аспарагин тесно связан с белковым метаболизмом, и этот факт используется сторонниками того взгляда, что яблочная кислота образуется скорее из белков, чем из углеводов (Костычев, 1927). Однако доказательства в пользу этого взгляда весьма скудны, и нет никаких прямых оснований утверждать, что если азот в молекуле аспарагина происходит из белка, то и углеводный скелет также должен образовываться из белка, а не из углеводов.

К обсуждению сложной проблемы происхождения яблочной кислоты в растениях мы еще вернемся в связи со специфическими особенностями некоторых типов растений.

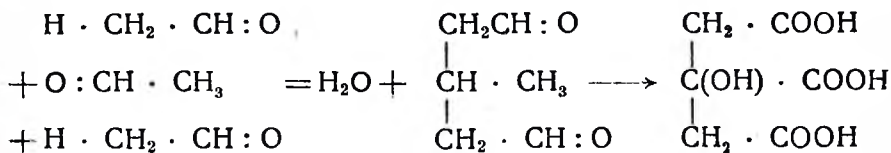
в) Лимонная кислота

Наличие бокового ответвления в химической структуре лимонной кислоты



дало повод к созданию разнообразных гипотез об ее происхождении в растениях.

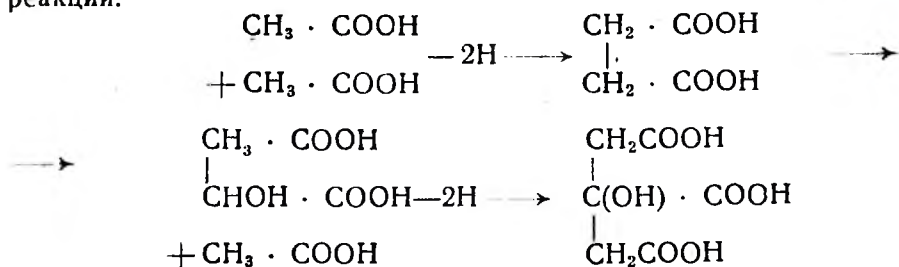
Эйлер (Euler, 1903) высказал предположение, что она образуется путем конденсации трех молекул ацетальдегида и дальнейшего окисления продукта конденсации таким образом:



Однако нет никаких экспериментальных доказательств того, что эти реакции могут иметь место.

То же самое приходится сказать и относительно взгляда Буткевича, что превращение сахаров в лимонную кислоту

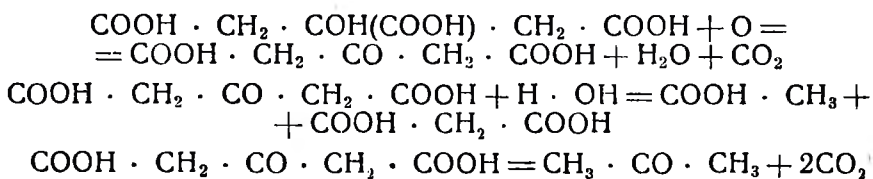
Хотя эта гипотеза достаточно обоснована с чисто химической точки зрения, недавние работы о накоплении лимонной кислоты плесневыми грибами наводят на мысль, что лимонная кислота может быть образована из уксусной кислоты путем таких реакций:



Следует отметить, что, за исключением окисления янтарной кислоты до яблочной, эти реакции не могут быть воспроизведены *in vitro*.

Гипотеза интересна тем, что подчеркивает близкую связь, которая действительно имеется между яблочной и лимонной кислотами.

Лимонная кислота легко окисляется *in vitro* до ацетон-дикарбоновой кислоты, и поэтому многие авторы считают, что ее исчезновение из живой ткани происходит именно этим путем [Бернгауер и Зибенэугер (Bernhauer и Siebenäuger), 1931]. Уолкер, Субраманиам и Челленджер (Walker, Subramaniam и Challenger, 1927) обнаружили ацетондикарбоновую кислоту, а также ацетон, малоновую и уксусную кислоты в культурах *Aspergillus niger*, выращиваемых на растворах цитрата аммония и лимонной кислоты. Поэтому они предполагают, что исчезновение лимонной кислоты из тканей происходит путем таких последовательных реакций:



Эти реакции, очевидно, могут иметь место у плесневых грибов, но они в состоянии объяснить исчезновение лишь очень небольшой части лимонной кислоты, большая же ее часть превращается в другие вещества, как это показывают данные, о которых будет речь позднее.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ КИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Резкие колебания кислотности, какие наблюдаются в растительных тканях в природных условиях, справедливо побудили

исследователей заключить, что органические кислоты играют какую-то важную роль в метаболизме. Эти изменения кислотности связаны с нормальными суточными и сезонными колебаниями в интенсивности света и температуры.

В ряде работ было исследовано влияние внешних условий, искусственно создававшихся в опыте, как, например, продолжительное голодание в темноте, изменение газового состава воздуха и тому подобное. Полученные в этих опытах результаты дали возможность по-новому подойти к оценке различных гипотез, выдвинутых в разное время для объяснения роли растительных кислот в метаболизме.

Результаты таких экспериментальных работ удобнее, однако, рассмотреть в связи с нашей оценкой гипотез, которые они вызвали или осудили, а в этом разделе речь будет идти только о суточных и сезонных колебаниях кислотности у различных типов растительного мира.

Первым отмеченным в литературе случаем резкого изменения кислотности растительной ткани было наблюдение, что в соке *Bryophyllum* (одного из *Crassulaceae*) кислотность значительно возрастает ночью и уменьшается снова в течение дня. Все *Crassulaceae* ведут себя подобным же образом, а затем было найдено, что такое же явление наблюдается почти у всех суккулентов; заслуживающее внимания исключение относится к некоторым представителям порядка *Centrospermae* (*Mesembryanthemum*, *Portulaca* и некоторые галофиты).

Способность к резкому изменению кислотности наблюдается и у некоторых растений не суккулентного типа. Мы видим, таким образом, что это явление имеет широкое распространение, но, как показывают собранные данные, желательнее было бы более систематически изучить растительный мир в этом отношении.

Crassulaceae. Представители этого семейства содержат яблочную кислоту со следами янтарной, щавелевой и лимонной кислот. Неоднократно повторявшееся утверждение, что имеющаяся в них кислота является изо-яблочной, оказалось, как было показано выше, ошибочным.

Характер и размах суточных колебаний кислотности показаны в табл. 3, в которой приведены данные по содержанию титруемой кислоты в листьях *Bryophyllum calycinum* в различные часы дня. Данные эти взяты у Крауса (Краус, 1883) и относятся к зрелым листьям, которые оставались в связи с растением, находившимся в природных условиях.

По Краусу эти колебания кислотности связаны с изменениями в содержании углеводов в противоположном направлении (максимум содержания сахара вечером, минимум — утром), и сверх того Краус показал, что изменения в титруемой кислотности не стоят ни в каком соотношении со степенью нейтрализации кислот основаниями.

Эти факты приводят к заключению, что ночное увеличение кислотности происходит благодаря образованию яблочной кислоты

ТАБЛИЦА 3

Титруемая кислотность в миллиграмм-эквивалентах кислотности на 100 г сырого веса в листьях *Cryophyllum calycinum*

Время дня	Кислотность	Время дня	Кислотность	Время дня	Кислотность
6 часов утра . . .	12,25	4 часа дня . . .	2,0	2 часа утра . . .	8,30
8 " " . . .	10,0	6 часов веч. . .	1,38	4 " " . . .	12,0
10 " " . . .	10,50	8 " " . . .	2,25	6 часов " . . .	11,8
12 " дня . . .	8,75	10 " " . . .	4,25	8 " " . . .	12,0
2 часа " . . .	4,63	12 " ночи . . .	6,75		

из сахара. Образовавшаяся кислота не вся остается в форме свободной кислоты, но часть ее диссоциирует, так что получается уравновешенная смесь кислоты и ее ионов, как это было

показано в вводном обзоре. Неправильно поэтому утверждать, что вновь образованная кислота превращается в кислые соли (Вольф, 1931), хотя при определенных условиях значительная доля кислоты может действительно находиться в форме одновалентных ионов (НА').

Сходные с показанными для *Bryophyllum* в табл. 3 результаты воспроизведены также на рис. 2 для *Sedum praealtum*, *Bryophyllum* и *Opuntia*. Время дня (в часах) отмечено на горизонтальной оси. Листья *Bryophyllum* оста-

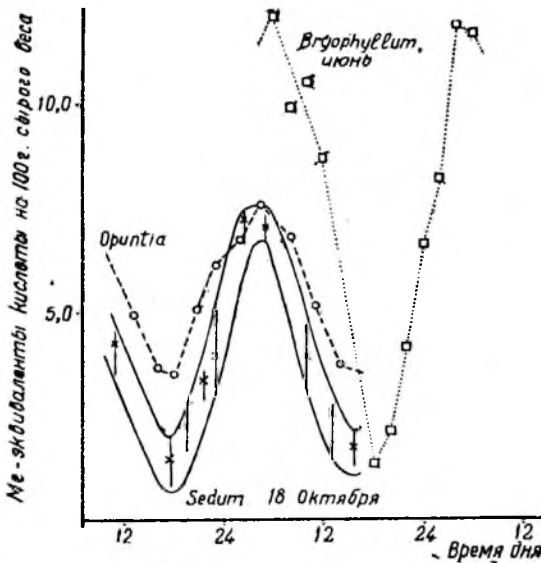


Рис. 2. Колебания титруемой кислотности в течение суток в листьях *Sedum* (Bennet-Clark, 1930), *Bryophyllum* (Kraus, 1883) и в филлокладиях *Opuntia* (Richards, 1915).

вались в связи со стеблем, а листья *Sedum* и филлокладии *Opuntia* были отделены от стебля. Во всех остальных отношениях опыт проходил в условиях, возможно более близких к естественным. Следует отметить, что изменения в кислотности у всех объектов в данном опыте были в основном одинаковы.

Следует твердо помнить, что изменения в титруемой кислотности происходят не от нейтрализации кислоты аммиаком

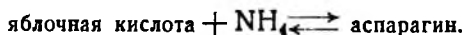
(см. об этом также на стр. 9, в связи с работой Бендрат). Если не происходит увеличения аммиака, то ясно, что общее количество нитрируемой кислоты не должно сколько-нибудь ощутимо изменяться в течение суток. Работа Вольфа (Wolf, 1931) с полной ясностью показала, что изменения в содержании аммиака в течение дня слишком незначительны, чтобы быть источником ошибки в определении кислотности. Размер суточных колебаний азотистых соединений в листьях опять-таки настолько незначителен, что исключает возможность образования из них яблочной кислоты. Эти данные представлены в табл. 4, где величины выражены в мг-эквивалентах на 100 г сырого веса. Так как обычные амиды (аспарагин, глутаминовая кислота) имеют два атома азота на молекулу, то для определения всего количества азота в аспарагине приходится удваивать найденное количество амидного азота; отсюда обозначение — „2-амидный“. Растворимый азот минус аммиачный азот, минус „2-амидный N“ дает главным образом азот аминокислот. Для краткости мы пользуемся в таблице для обозначения этой величины немецким термином „rest-N“.

ТАБЛИЦА 4

Суточный метаболизм азота и кислоты¹

		<i>Bryophyllum calycinum</i>		<i>Bryophyllum proliferum</i>	
		5 час. 30 мин. вечера	9 час. утра	5 час. вечера	9 час. утра
Белковый азот	мг	168,0	163,0	240,0	233,0
	мг-экв.	12,0	11,60	17,10	16,60
NH ₃ -N	мг	1,00	0,55	0,68	0,57
	мг-экв.	0,07	0,04	0,05	0,04
2-амидный N	мг	5,35	6,80	4,85	6,90
	мг-экв.	0,38	0,49	0,35	0,49
Rest-N	мг	16,15	20,15	19,47	28,52
	мг-экв.	1,15	1,44	1,39	2,04
Сумма малатов (мг-экв.)		13,10	26,00	14,40	24,00

Из цифровых данных этой таблицы видно, что уменьшение за ночь белкового азота и азота аминокислот совершенно ничтожно и не стоит ни в каком соответствии с увеличением кислотности в течение ночи. Содержание амидов (вероятно аспарагина) увеличивается с увеличением содержания яблочной кислоты, а содержание аммиака уменьшается, как и следует ожидать, согласно уравнению:



¹ Указанные количества относятся к 100 г сырого веса и выражены как в миллиграммах, так и в миллиграмм-эквивалентах.

Однако из сопоставления цифр видно, что этой реакцией захватывается не свыше 0,2—0,3% титруемой кислоты.

Вольф (1931) показал также, что почти во всех случаях уменьшение в содержании сахаров в течение ночи было более чем достаточно, чтобы объяснить накопление кислоты за счет этого источника. Так, для *Bryophyllum calycinum* изменения в содержании сахаров и кислоты в период между 5 часами дня и 9 часами утра выражаются следующими цифрами.

ТАБЛИЦА 5

Объект	Температура в градусах С	Уменьшение редуцирующих сахаров в мг-молях на 1 г сухого веса	Увеличение яблочной кислоты в мг-молях на 1 г сухого веса
<i>Bryophyllum calycinum</i> 7/8 VIII	8	0,32	0,21
	20	0,50	0,50
	35	0,43	0,22
<i>Bryophyllum calycinum</i> 9/10 IX	10	0,26	0,42
	21	0,56	1,10
	37	0,46	0,24

В согласии с этими данными Вольфа, автор в своей работе, о которой речь будет ниже, также пришел к выводу, что образование одного моля яблочной кислоты связано с исчезновением из тканей по крайней мере одного моля редуцирующего сахара.

Постепенное старение листьев вызывает значительные изменения в их кислотном метаболизме, причем наиболее важно отметить постепенную нейтрализацию титруемой кислоты основаниями, поглощаемыми из почвы. В качестве типичного примера приведем в табл. 6 данные из работы Аструка (1903).

Как видим, в содержании нетитруемой кислоты (щелочность золы) за день не происходит никаких заметных изменений. У самых молодых листьев и титруемая кислотность также не изменяется за день. Но по мере старения листьев (листья нижних этажей) она начинает медленно уменьшаться. Бендрат также отмечает, что в молодых листьях кислотность изменяется мало, причем все же ночью она несколько выше, чем утром. К сожалению, заключения Аструка и Бендрата основаны на единичных анализах молодых листьев. Следовало бы этот вопрос подвергнуть более систематическому исследованию.

Размах суточных колебаний зависит от времени года. У Крауса имеются следующие данные для *Bryophyllum*: 20 февраля утром 3,75 мг-эквивалента на 100 г сырого веса; вечером 1,2 мг-эквивалента на 100 г; 27 июня утром 13,8 мг-эквивалента на 100 г сырого веса; вечером 1,1 мг-эквивалента на 100 г.

Более полные данные, иллюстрирующие это явление, даны на рис. 3. Две кривые наглядно показывают размах изменений

и величине максимума и минимума суточных кислотности в различное время года.

Измеренные величины кислотности представлены здесь в виде вертикальных линий, которые показывают высшую и низшую цифру из четырех измерений и каждая взята из кривой типа, представленного на рис. 2. Благодаря такому способу учета, случайность измерений, обычно приуроченных к произвольно избранному часу утра или вечера, в значительной мере устраняется.

Из рис. 3 видно, что суточных колебаний кислотности на широте Дублина (где проводились опыты) практически не наблю-

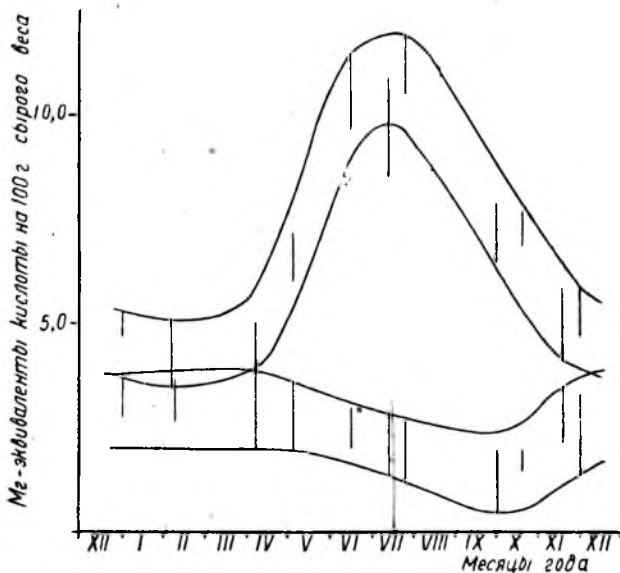


Рис. 3. Максимумы и минимумы суточных колебаний титруемой кислотности в различные сезоны года. *Sedum praealtum* (Bennet-Clark, 1930).

дается в течение по крайней мере четырех зимних месяцев. Кроме действия возраста и сезона, почвенные условия очевидно также должны оказывать заметное влияние на кислотность суккулентов, а вероятно и других растений (Ruhland и Wetzel, 1926). Автор нашел, например, что два растения *Crassula lactea* одинакового возраста, отчеренкованные от одного и того же родительского растения, но выращенные на различных почвах, обнаружили в июне совершенно различную величину максимальной титруемой кислотности, а именно: 8,3 и 2,2 мг-эквивалента на 100 г сырого веса. Пока еще трудно сказать, в чем причина такого крупного различия между ними. Сначала возникла мысль, что низкая кислотность одного растения была следствием более интенсивной нейтрализации кислоты основаниями, поглощенными из почвы, так как это растение росло на относительно щелочной

почве (рН = 9), а другое на почти нейтральной (рН = 6,8); сумма малатов была приблизительно одинакова в обоих растениях. Рулянд и Ветцель (1926) указывают, однако, что обильное азотистое удобрение приводит к значительному повышению кислотности в случае *Begonia*. Возможно, поэтому, что условия азотистого питания в большей степени, чем величина почвенной кислотности, обуславливают те изменения в содержании кислот, которые наблюдались у *Crassula lactea*, а также у *Sedum praealtum*. О коррелятивном соотношении между энергией дыхания и содержанием кислоты у нас будет еще речь ниже. Из всего сказанного ясно видно, что при сравнительных опытах совершенно необходимо точно знать условия почвы и климата, при которых выращиваются опытные растения суккулентного типа.

Cactaceae. У представителей этого семейства, подобно *Crassulaceae*, также наблюдается в такой же типичной форме процесс разрушения кислот на свету. Превращение углеводов в яблочную кислоту происходит ночью, а обратный процесс, связанный с фотосинтезом, наблюдается днем. Типичные результаты иллюстрированы кривой, относящейся к *Opuntia* [Ричардс (Richards, 1915)], которая дана на рис. 2.

ТАБЛИЦА 6

Кислотность листьев *Sempe. vivum tectorum* в миллиграмм-эквивалентах на 100 г сырого веса

Положение листа	Титруемая кислотность		Нетитруемая кислотность	
	утро	вечер	утро	вечер
Первый (верхний)	3,6	4,4	5,0	7,4
Четвертый	4,4	3,8	7,4	8,2
Шестой	5,4	2,6	14,4	14,4
Восьмой	6,0	2,0	15,4	14,4
Десятый	8,8	2,0	22,6	24,2
Двенадцатый (самый нижн.).	7,5	1,8	31,4	30,4

Другие суккулентные растения. Имеющиеся данные, к сожалению, очень скудны и состоят обычно из разрозненных парных анализов (вечер и следующее утро), причем имеющиеся цифры, в общем, говорят о высоком содержании титруемой кислотности. Результаты ряда таких анализов представлены в табл. 7. Из нее видно, что поведение *Mesembryanthemum* и *Portulaca* отличается от поведения других суккулентов, которые, в общем, сходны с *Crassulaceae*.¹

Эти роды, как было уже выше отмечено, богаты шавелевой кислотой, и в их листьях с возрастом отношение $\frac{\text{шавелевая кислота}}{\text{яблочная кислота}}$ постепенно увеличивается. Своеобразие этих растений, возможно,

связано с различной величиной этого соотношения и не вполне однородной судьбой этих двух кислот в течение дня. Возможно, здесь имеет значение наблюдение Годэ и Ивэнс (1932), которые нашли, что оксалаты и малаты накапливаются в различных клетках. Очевидно, что если малаты подвергаются у этих растений обычному метаболизму, типичному для толстянковых, то оксалаты, подвергаясь превращениям другого типа, будут маскировать общую картину, поскольку для анализа берутся ткани в целом.

Несуккулентные растения. Данные для этих растений не вполне надежны, но все же можно утверждать с известной уверенностью, что типичный для *Crassulaceae* метаболизм, характерный для суккулентов, имеет широкое распространение также и среди несуккулентных растений. Два семейства, орхидные и бромелиевые, почти во всех своих родах обнаруживают особенно крупные суточные колебания.

Табл. 7 показывает, что среди несуккулентных растений имеется действительно немало представителей с ясно выраженной суточной периодичностью в величине кислотности. Мы должны, таким образом, признать, что это явление широко распространено среди всего растительного мира.

Два несуккулентных растения были более полно исследованы и заслуживают поэтому особого внимания. Полученные результаты показывают, однако, что к интерпретации их надо относиться с некоторой осторожностью.

Rheum sativum (ревень). Штейнман (Steinmann, 1917) показал (табл. 7), что у ревеня наблюдается небольшое увеличение титруемой кислотности в течение дня, более заметное, если перерезать главные жилки листа и таким образом создать препятствие для оттока ассимилятов. Он вывел отсюда заключение, что кислота образуется в течение фотосинтеза. Тот факт, что повышение температуры усиливает выделение CO_2 за счет дыхания и одновременно вызывает уменьшение органических кислот, служит ему дальнейшим аргументом в пользу того, что кислоты образуются в процессе фотосинтеза, а не дыхания. Тот же самый вывод как будто вытекает и из наблюдений Аструка, нашедшего, что зеленые части пестрых листьев *Pelargonium* и *Acer* содержат приблизительно в пять раз больше титруемой кислоты, чем соседние белые участки.

Однако эти заключения необходимо пересмотреть заново в связи с последними работами Рулянда и Ветцеля (1927, 1929).

Эти авторы показали, что у ревеня около половины всей кислоты представлено в виде аммонийных солей; они не проследили, однако, происходят ли суточные колебания в содержании аммиака. Ясно, что если содержание аммиака уменьшается днем, то титруемая кислота будет возрастать без всякого новообразования ее за счет фотосинтеза или другим путем. Рулянд и Ветцель имели дело главным образом с сезонными изменениями в содержании кислоты. В корневище ревеня, находящемся в состоянии покоя, приходится на долю аминокислот около 60—70% азота,

ТАБЛИЦА 7

Процентное изменение в титруемой кислотности в течение ночи
(увеличение кислотности показано знаком +, уменьшение знаком -)

Р а с т е н и е	Процент измене- ния	Автор
<i>Phoenix dactylifera</i>	+ 44	Warburg
<i>Billbergia zebrina</i>	+ 86	"
<i>Nidularia maynedorffii</i>	+ 95	"
<i>Hoplophytum grande</i>	+ 286	"
<i>Tillandsia biflora</i>	+ 74	"
<i>Tradescantia discolor</i>	+ 36	"
<i>Aloe arborescens</i>	+ 2	Hempel
<i>cymbaefolia</i>	+ 340	"
<i>Haworthia turgida</i>	+ 80	Kraus
<i>Sanseveria fasciata</i>	+ 30	Warburg
<i>Convallaria majalis</i>	+ 2	"
<i>Clivia nobilis</i>	+ 22	"
<i>Pancreatum</i> sp.	+ 22	"
<i>Cypripedium villosum</i>	- 70	Bendrat
<i>Cattleya</i> sp.	+ 133	Warburg
<i>Oncidium</i> sp.	+ 180	"
<i>sphacelatum</i>	+ 79	Bendrat
<i>Vanilla planifolia</i>	- 45	"
<i>Peperomia</i> sp.	+ 40	Warburg
<i>Ficus elastica</i>	- 3	"
<i>Hokea laurina</i>	+ 12	"
<i>Polygonum platycodon</i>	+ 3	"
<i>Rumex obtusifolius</i>	+ 25	Warburg
<i>Rheum sativum</i>	- 9	Steinmann
<i>Mesembryanthemum linguaeforme</i>	- 3	Warburg
"	- 60	Kraus
"	+ 14	"
"	+ 35	Hempel
<i>anthelminticum</i>	+ 58	Warburg
<i>Portulaca grandiflora</i>	- 18	"
<i>Laurus nobilis</i>	+ 15	"
<i>Crassula arborescens</i>	+ 20	Kraus
<i>Bryophyllum calycinum</i>	+ 200	"
"	+ 1260	"
<i>Saxifraga elatior</i>	- 15	Warburg
<i>Vicia faba</i>	+ 13	Kraus
<i>Geranium pyrenaicum</i>	+ 10	"
<i>pratense</i>	+ 700	"
<i>Croton magnum</i>	+ 64	"
<i>Begonia warczewiczii</i>	0	Warburg
<i>semperflorens</i>	+ 80	Ruhlandt и Wetzel
<i>Hedera helix</i>	- 3	Warburg
<i>Eryngium spinosissimum</i>	+ 8	"
<i>Kleinia articulata</i>	0	"
"	+ 30	"
"	+ 440	Thoday и Evans

при прорастании же корневища аминокислоты исчезают и количество аммиака и яблочной кислоты увеличивается в черешках листьев и в самих листьях; следовательно аммиак и яблочная кислота могут образоваться за счет исчезновения аминокислот. Молярная концентрация аммиака оказалась, по их расчету, равной молярной концентрации l-яблочной кислоты, а последняя — вдвое меньше концентрации неактивных малатов. Рулянд и Ветцель заключили из этого факта, что l-яблочная кислота образуется вместе с эквивалентом NH_3 из аминокислот и что i-малаты не образуются заново, но передвигаются, как таковые, из корневища при прорастании. Неясно, почему авторы приходят к такому выводу. Путаницу вносит употребление термина i-яблочная кислота; в растворе это вещество является смесью равного числа молекул правой и левой яблочной кислоты, откуда следует, что на самом деле полученные авторами результаты, вопреки их утверждению, означают, что молярная концентрация NH_3 равняется молярной концентрации правой, а не левой яблочной кислоты.

В самом деле, согласно Рулянду и Ветцелю, соотношение $(\text{NH}_3) : (l\text{-малаты}) : (i\text{-малаты}) = 1 : 1 : 2$, а в действительности это означает:

$$(\text{NH}_3) : (l\text{-малаты}) : (d\text{-малаты}) = 1 : 2 : 1.$$

По мере вегетации содержание яблочной кислоты уменьшается, а щавелевой возрастает. Рулянд и Ветцель заявляют, что здесь имеет место „Übergang von Äpfelsäure, und zwar nur die inaktive Form, in Oxalsäure“.¹

Согласно этому взгляду, уменьшение наблюдается лишь для i-яблочной кислоты, но не для l-яблочной, а щавелевая кислота, наоборот, возрастает в своем количестве. Все это, однако, говорит на самом деле о том, что и левые и правые малаты расходуются с одинаковой скоростью, несмотря на то, что концентрация левой кислоты была больше.

В конце вегетации к моменту начинающегося пожелтения листьев в них остаются только l-малаты и оксалаты, причем в течение процесса желтения оксалаты остаются в листьях без изменений, а l-малаты передвигаются вниз по стеблю. Но в корневище находятся только i-малаты. Авторы заявляют, что l-малаты превращаются в i-малаты, из чего следует заключить, что по какой-то неизвестной причине ровно половина l-малатов превращается в d-малаты.

С большим интересом будем ожидать дальнейшего продолжения этих исследований, поскольку полученные до сих пор результаты не отличаются ясностью.

Begonia semperflorens. Рулянд и Ветцель показали, что это растение очень богато кислотами и их солями. Около 20% сухого веса приходится у него на долю оксалатов, 0,5% — на долю малатов и 0,3% — на долю других кислот. Большие количе-

¹ Превращение яблочной кислоты, и притом только неактивной ее формы, в щавелевую кислоту. — *Ред.*

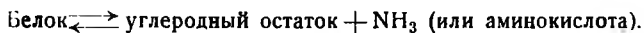
ства аммиака представлены в виде солей; рН колеблется между 1 и 2. Титруемая кислота возрастает в течение ночи; является ли это реальным возрастанием или нет — неясно, так как хотя и высказывается утверждение, что количество аммиака уменьшается ночью, но, с другой стороны, авторы заявляют, что количество связанных кислот остается постоянным в течение суток, что было бы невозможно, если бы содержание аммиака подвергалось изменениям. Азотистое удобрение приводит к увеличению содержания оксалатов, причем нитраты дают больший эффект, чем аммонийные соли. Сходные результаты были еще раньше получены Бенекке (Beneske, 1903) с другими растениями, причем он ставил эти результаты в связь с тем фактом, что усвоение нитратных ионов освобождает катионы, которые фиксируют оксалаты и тем побуждают растение к усиленному их образованию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно различать три группы растений.

I. Растения, содержащие яблочную кислоту, кислотный метаболизм которых происходит по типу толстянковых (*Crassulaceae*) растений. Яблочная кислота здесь образуется из углеводов в темноте и снова превращается в углеводы на свету. В эту группу входят, по видимому, все суккулентные растения за исключением некоторых *Centrospermae*. Многие несуккулентные растения относятся к этому же типу; особенно заслуживают внимания орхидеи и бромелиевые. Многие растения, содержащие яблочную кислоту, у которых не удалось обнаружить ясно выраженной суточной периодичности, могут, однако, принадлежать к этому же типу, только суточные колебания у них столь незначительны, что не превышают возможных ошибок анализа.

II. Растения, также характеризующиеся накоплением яблочной кислоты, но с тем отличием, что в молодых органах у них содержится только яблочная кислота, но с возрастом появляется щавелевая, а яблочная исчезает. *Rheum* и *Mesembryanthemum*, несомненно, относятся к этой группе, как вероятно и многие другие растения, богатые щавелевой кислотой. *Rheum*, а возможно и другие растения этой группы, богаты аммиаком. Этот факт подчеркивает взаимную связь метаболизма яблочной кислоты с белковым метаболизмом, о чем у нас будет речь дальше, но сам по себе он еще не доказывает, что углеродная часть белков или аминокислот является тем источником, из которого образуется яблочная кислота в растениях этого типа. В самом деле, яблочная кислота, полученная из углеводов типичным для толстянковых растений способом, связывая аммиак, может вызвать сдвиг в правую сторону в реакции:



III. Растения, содержащие щавелевую кислоту. *Begonia* и *Oxalis* определенно относятся к этой группе. Возможно, однако, что их

следует рассматривать как специальный случай группы II, с тем лишь отличием от типичных представителей этой группы, что реакция перехода яблочной кислоты в щавелевую, каким бы путем, прямым или косвенным, она ни осуществлялась, происходит у них с гораздо большей скоростью, чем у растений группы II, как, например, у *Rheum*.

Для полноты нашего обзора следует в заключение упомянуть о мясистых плодах, которые, как правило, богаты кислотами из группы яблочной или лимонной кислоты.

По мере созревания (старения) плодов кислота исчезает, однако химический механизм и значение этого процесса до сих пор остаются неясными благодаря слабой разработанности этого вопроса. В настоящее время нет оснований предполагать, что химизм превращения органических кислот в созревающих плодах чем-либо по существу отличается от такового в зрелых листьях, однако при недостаточной изученности этого вопроса нет основания включать его обсуждение в рамки нашего обзора.

Плесневые грибы также продуцируют кислоты, и изучение у них этого процесса дало стимул к созданию разнообразных гипотез, имеющих отношение также и к кислотному метаболизму зеленых растений. Однако специфические особенности питания плесневых грибов настолько велики, что трудно проводить прямое сравнение их метаболизма с метаболизмом высших растений. Поэтому кислотный метаболизм плесневых грибов рассматривается особо в последней части этой книги.

ЛИТЕРАТУРА К ПЕРВОЙ ЧАСТИ

- Abderhalden, E. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. 1, 6. Berlin 1925.
- Aberson, J. H. Die Äpfelsäure der *Crassulaceen*. Berichte d. d. chem. Ges., 31 2, 1432, 1898.
- Astruc, A. Recherches sur l'acidité végétale. Ann. Sc. Nat. Bot. Ser. 8, 17, 1, 1903.
- Bassalik, K. Über die Rolle der Oxalsäure bei *Rumex acetosa*. Bull. Acad. Sc. Cracovie, p. 203, 1917.
- Bau, A. Цит. у Abderhalden, стр. 693, см. выше.
- Baur, E. Über ein Modell der Kohlensäureassimilation. Z. phys. Chem., 63, 683, 1908.
- Bendrat, M. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. VII. Zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter Pflanzen. Planta, 7, 508, 1929.
- Benecke, W. Über Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen. Bot. Zeitung, 61, 79, 1903.
- Bennet-Clark, T. A. The metabolism of succulent plants. Ph. D. thests. Cambridge University, 1930.
- Bernhauer, K. und Siebenäuger, H. Zum Chemismus der Citronensäurebildung durch Pilze. IV. Über die Umwandlung der Zuckersäure. Biochem. Z., 230, 466, 1931.
- Bernhauer, K. und Siebenäuger, H. Zum Chemismus der Citronensäurebildung durch Pilze. V. Die Citronensäurebildung aus Essigsäure. Biochem. Z., 240, 232, 1931.
- Challenger, F., Subramaniam, V. and Walker, T. K. The mechanism of the formation of citric and oxalic acids from sugars by *Aspergillus niger*. J.C.S., p. 200, 1927.
- Challenger, F. and Klein, L. The formation of *l-malic* from fumaric acid by *Aspergillus niger*. J. C. S., p. 1644, 1929.
- Euler, H. Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, 3, 182, 1903.

- Franzen, H. und Schumacher, E. Über die chemische Bestandteile grüner Pflanzen. Mitt. 14. Über die Säuren der Johannisbeeren. Zeit. physiol. Chem., 115, 9, 1921.
- Franzen, H. und Stern, E. Mitt. 15. Über das Vorkommen von Ethylidene-Milchsäure in den Blättern der Himbeere. Zeit. physiol. Chem., 115, 270, 1921.
- Franzen, H. und Helwert, F. Mitt. 20. Über die Säuren der Kirschen. Zeit. physiol. Chem., 122, 46, 1922.
- Franzen, H. und Ostertag, R. Mitt. 21. Über Nichtexistenz der Crassulaceen-äpfelsäure. Zeit. physiol. Chem., 122, 263, 1922.
- Franzen, H. und Keyssner, E. Mitt. 23. Kritisches über das Vorkommen der Äpfelsäure in der Pflanzen. Biochem. Z., 135, 183, 1923.
- Franzen, H. und Helwert, F. Mitt. 24. Kritisches über das Vorkommen der Citronensäure in der Pflanzen. Biochem. Z., 135, 384, 1923.
- Franzen, H. und Helwert, F. Mitt. 26. Kritisches über das Vorkommen der Weinsäure. Biochem. Z., 136, 291, 1923.
- Franzen, H. und Ostertag, R. Mitt. 27. Kritisches über das Vorkommen der Bernsteinsäure. Biochem. Z., 136, 327, 1923.
- Franzen, H. und Schmitt, F. Die Bildung der Citronensäure aus Ketipmsäure. Ber. d. d. chem. Ges., 58, 222, 1925.
- Hempel, J. Buffer processes in the metabolism of succulent plants. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 13, 1, 1917.
- Kostytchev, S. Plant Respiration. Transl. C. J. Lyon, Philadelphia 1927.
- Kraus, G. Über die Wasserverteilung der Pflanzen. Abh. naturf. Ges. zu Halle, 16, 141, 1883.
- Kraus, G. Über Stoffwechsel bei den Crassulaceen. Abh. naturf. Ges. zu Halle, 16, 393, 1883.
- Kunz, F. Цит. у Abderhalden, p. 722, см. выше.
- Mayer, A. Über die Sauerstoffausscheidung einiger Crassulaceen. Landw. Versuchst., 21, 277, 1878.
- Mayer, A. Neue Untersuchungen über die Crassulaceenäpfelsäure. Landw. Versuchst., 51, 336, 1899.
- Needham, D. M. A quantitative study of succinic acid in muscle. II. Biochem. J., 21, 739, 1927.
- Raistrick, H. and Clark, A. B. On the mechanism of the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. Biochem. J., 13, 329, 1919.
- Richards, H. M. Acidity and gas interchange in Cacti. Carnegie Inst. Publ. No. 209, Washington 1915.
- Ruhland, W. und Wetzel, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. I. *Begonia semperflorens*. Planta, 1, 558, 1926.
- Ruhland, W. und Wetzel, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. III. *Rheum hybridum*. Planta, 3, 765, 1927.
- Ruhland, W. und Wetzel, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. V. *Rheum hybridum*. Planta, 7, 503, 1929.
- Ruhland, W. und Wetzel, K. Zur Frage der Äpfelsäurebildung in Crassulaceen. Planta, 15, 567, 1931.
- Schmallfuss, H. Über Pflanzensäuren aus *Glaucium*. Z. physiol. Chem., 131, 166, 1923.
- Small, J. Hydrogen-ion concentration of plant cells and tissues. Berlin 1929.
- Spoehr, H. A. Photochemische Vorgänge bei Entsäuren der Succulenten. Biochem. Z., 57, 95, 1913.
- Staehelein, M. Die Rolle der Oxalsäure in der Pflanze. Biochem. Z., 96, 1, 1919.
- Steinmann, A. Studien über die Azidität des Zellsaftes beim Rhabarber. Z. f. Bot., 9, 1, 1917.
- Thoday, B. and Evans, H. Buffer systems in *Kleinia articulata*. Protoplasma, 14, 64, 1931.
- Thoday, B. and Evans, H. Studies in growth and differentiation. III. Ann. Bot., 46, 781, 1932.
- Ullrich, H. Tagesschwankungen und andersartig bedingte Veränderungen des Gehalts an verschiedenen organischen Säuren in einigen grünen Pflanzen. Planta, 1, 565, 1926.
- Walker, T. K., Subramaniam, V. and Challenger, F. On the mechanism

- of the formation of citric and oxalic acids by *Aspergillus niger*. II. J. C. S., p. 3044, 1927.
- Warburg, O. Über die Bedeutung der organischen Säuren für Lebensprozess der Pflanzen. Unters. a. d. bot. Inst., Tübingen, 2, 57, 1886.
- Wetzel, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. IV. Zur Entstehung der Oxalsäure. Planta, 4, 476, 1927.
- Wolf, J. Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter *Crassulaceen*. Planta, 15, 572, 1931.
- Woolf, B. Some enzymes in *B. coli communis* which act on fumaric acid. Biochem. J., 23, 472, 1929.

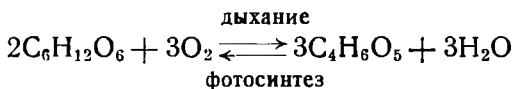
ЧАСТЬ ВТОРАЯ

МЕТАБОЛИЗМ СУККУЛЕНТНЫХ РАСТЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Уже в первом десятилетии девятнадцатого века было известно, что некоторые представители *Crassulaceae* обладают способностью при помещении их в темноту накапливать большие количества кислоты, которая оказалась яблочной кислотой. Так как количество выделяющейся при этом CO_2 значительно меньше по сравнению с количеством образующейся кислоты, то отсюда возникло воззрение, что этот процесс накопления кислоты представляет собой особый уклоняющийся от нормы тип дыхания, при котором в качестве конечного продукта образуется не CO_2 , как при нормальном дыхании, а продукты по сравнению с ней менее окисленные (органические кислоты).

Согласно этому взгляду, процессы дыхания и фотосинтеза у *Crassulaceae* могут быть выражены в виде следующего общего уравнения:



Было выдвинуто немало различных точек зрения для объяснения механизма такого своеобразного процесса, обнаруженного не только у *Crassulaceae*, но также у многих родов и видов растений, принадлежащих к самым различным естественным порядкам. Такой своеобразный метаболизм оказался свойственным не только суккулентным растениям (для них он является общей нормой почти без исключения), но широко распространен и среди растений несуккулентного типа.

Вообще говоря, возможны два типа гипотез о механизме этого процесса. Некоторые исследователи полагали, что яблочная кислота образуется путем постепенного окисления сахара, и что затем, при наличии подходящих условий, она подвергается дальнейшему постепенному, шаг за шагом, окислению до щавелевой кислоты и, наконец, до углекислоты и воды. Ясно, что такой путь непрерывного, шаг за шагом, окисления сахарной молекулы в процессе дыхания резко отличается от обычного хода распада сахаров,

связанного с деятельностью бродильного комплекса ферментов. При нормальном ходе дыхания из гексозы образуются трехуглеродные соединения типа метил-глиоксала. Такой бродильный распад сахара обнаружен в тканях, весьма разнородных по своему характеру. Классическими примерами являются дрожжи и мышцы; бродильный комплекс ферментов (зимаза) вообще широко распространен в растительном мире. Поэтому почти общепринятым является в настоящее время взгляд, что бродильный комплекс энзимов вызывает во всех живых тканях распад сахара в процессе дыхания (Костычев, 1927), а отсюда вытекает, что четырехуглеродные кислоты, подобные яблочной кислоте, должны образовываться каким-то иным путем, а не за счет прямого окисления гексоз.

В соответствии с этой точкой зрения Костычев предполагает, что растительные кислоты происходят из белкового, а не углеводного источника, и этот взгляд поддерживается в настоящее время Руляндом и Ветцелем (Ruhland и Wetzel, 1926, 1927, 1929). Так как имеющиеся по отношению к суккулентам данные стоят в полном противоречии с этой гипотезой, как указывалось в последнем разделе, то Рулянд и Ветцель (1931) для суккулентных растений допускают, что в этом особом случае яблочная кислота происходит от трех- или двухуглеродных соединений, образующихся при распаде сахара.

Если принять, как общий принцип, что процесс гликолиза в своих существенных чертах происходит во всех растениях одинаковым образом и если этот принцип единообразия распространяется и на процессы кислотного метаболизма, тогда с равным основанием следует держаться той точки зрения, что соответствующее единообразие должно существовать и в способе синтеза растительных кислот.

Однако не вполне еще ясно, действительно ли участие бродильного аппарата является необходимым условием для осуществления гликолиза. Недавняя работа Лундсгаарда (Lundsgaard, 1930) показывает, что некоторые компоненты бродильного комплекса инактивируются в присутствии иодацетата. Хотя в этих условиях образование спирта и CO_2 за счет бродильного распада сахара в дрожжах должно было бы прекратиться, однако найдено, что дрожжи продолжают выделять углекислоту.

Таким образом не исключена возможность, что распад сахара может идти и другим путем, а не обязательно через „реакции Нейберга“, которые вызываются зимазным комплексом.

Мы будем поэтому иметь дело с тремя группами гипотез.

А. Гипотезы, согласно которым процессы дыхания и образования кислот происходят не через „реакции Нейберга“, а путем постепенного, шаг за шагом, окисления гексоз до органических кислот.

В. Гипотезы, принимающие, что распад сахаров при дыхании идет через „нейберговские реакции“ и что образование кислот представляет собой результат вторичных или побочных реакций, связанных в определенном пункте с главным направлением реакций гликолиза.

С. Гипотезы, принимающие, что распад сахаров при дыхании идет через „нейберговские реакции“, но что органические кислоты возникают не из сахара в процессе дыхания, а из белков — или в процессе их распада, или в качестве побочных продуктов белкового синтеза.

Так как в настоящее время можно считать вполне твердо установленным, что яблочная кислота у суккулентов образуется вне связи с белковым метаболизмом, то эта третья группа гипотез совсем не будет рассматриваться в настоящей части этого обзора.

ГИПОТЕЗЫ, НЕ ОСНОВАННЫЕ НА РЕАКЦИЯХ НЕЙБЕРГА

Со времен Пфеффера и до наших дней по отношению к метаболизму суккулентных растений господствовало воззрение, что накопление у них органических кислот в темноте связано с недостатком кислорода во внутренней их атмосфере. Работы Варбурга (Warburg, 1886) и Обера (Aubert, 1898) отстаивают именно такую точку зрения. Эти авторы указывают, что для таких ксерофитов, как суккулентные растения, с их затрудненным газообменом, является большим преимуществом, что углекислота не теряется у них из тканей во время дыхания.

Сначала этим фактам давалось чисто телеологическое объяснение, указывалось, что для растений типа суккулентных является чрезвычайно выгодным, что массивно развитые у них внутренние ткани сообщаются с наружным воздухом через относительно ничтожную (по сравнению с объемом) площадь, приходящуюся на долю устьичных отверстий. Предполагалось, что в таких условиях совсем не происходит потери CO_2 в процессе дыхания и углерод вовлекаемых в дыхание углеводов сохраняется в тканях растения в виде таких промежуточных продуктов окисления, как яблочная кислота.

Обер полагал, на основании полученных результатов, что накопление кислоты пропорционально степени суккулентности.

Исключений из этого правила, однако, очень много, и даже классический объект *Bryophyllum* едва ли соответствует правилу Обера, так как, хотя у него и наблюдается весьма „активный“ кислотный метаболизм, но в то же время листья у него широкие и сравнительно тонкие; во всяком случае, правилу Обера нельзя придавать значения точной нормы количественного характера.

Из этого взгляда о связи между накоплением кислоты и степенью суккулентности вытекает, что оба эти явления должны находиться в причинной связи между собой, и такое воззрение действительно принимается большинством исследователей по данному вопросу вплоть до настоящего времени. Так, в 1919 г. мы встретились с этим взглядом в оригинальной работе Шпэра (Sprengel, 1919) о метаболизме суккулентных растений. Он нашел, что парциальное давление кислорода во внутренней атмосфере суккулентных растений ненормально низко, и сделал отсюда вывод, что в таких условиях сахара не могут окисляться до

углекислоты и воды, а лишь до неполной степени окисления, — до яблочной кислоты.

Еще в старых работах можно найти немало данных, которые стоят в полном противоречии с выводами этой гипотезы. Так, например, по данным Варбурга (1886) и Аструка (Astruc, 1903) усиленное накопление яблочной кислоты наблюдалось в их опытах при искусственно увеличенном кислородном давлении и, наоборот, при пониженном кислородном давлении образование яблочной кислоты уменьшалось. Необходимо, однако, отметить, что опыты Ричардса (Richards, 1915) с опунцией дали иные результаты. Но как Ричардс, так и все другие исследователи согласны в том, что понижение температуры приводит к повышению кислотности, а такое изменение температуры, конечно, должно вызвать повышение кислородного давления в тканях.

В литературе пока нет экспериментальных данных относительно состава внутренней атмосферы у суккулентов. Обер сделал некоторые анализы, но он ставил опыты в условиях крайнего разрежения, и несомненно, что внутриклеточный газ у него в этих условиях обогащался углекислотой, выделявшейся из раствора благодаря резко пониженному давлению.

Несмотря на недостаточную убедительность такого рода данных, Ричардс, тем не менее, делает вывод: „Повидимому, свойственное кактусам дыхание должно быть отнесено к типу интрамолекулярного, с той лишь разницей, что процесс не доходит до образования спирта, но останавливается на стадии яблочной кислоты“. Термин „интрамолекулярное дыхание“ должен, повидимому, здесь означать, что кислород, используемый на окисление некоторых углеродистых соединений до CO_2 , получается за счет восстановления других углеродистых соединений: в результате этого должны накапливаться продукты более бедные кислородом, чем углеводы типа спирта или ацетона.

Если „интрамолекулярное дыхание“ не доходит до образования спирта, то мы могли бы ожидать продуктов, занимающих по составу среднее положение между углеводами и спиртом [т. е. между $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)_x$ и $(\text{C}_2\text{H}_6\text{O})_y$], а не продуктов, подобных яблочной кислоте, которая более окислена, чем сами углеводы.

Совсем недавно Ивэнс (Evans, 1932) указал, что работы Шредера (Schroeder, 1924) и Ромель (Romell, 1928) отнюдь не говорят в пользу взгляда, согласно которому кислородное давление в межклетниках суккулентных растений является якобы ненормально низким, так как эти авторы нашли, что сопротивление, встречаемое кислородом при его диффузии через устьица и по межклеточным путям, значительно слабее того сопротивления, которое оказывает пограничный слой клетки, представляющий собой поверхность раздела между воздухом и водой.

Можно подвести следующие итоги по этому вопросу.

Нет никаких доказательств, что ткани суккулентных растений испытывают недостаток кислорода; скорее наблюдается обратное.

Но если бы даже у них и наблюдалось некоторое уменьшение кислорода, хотя и не доходящее до полного его исчезновения, то все же нет оснований предполагать, что это могло бы изменить природу продуктов, образующихся в процессе дыхания; такого рода изменения не обнаружены у других растений. В таких условиях можно ожидать изменения в скорости дыхания, но не в его механизме [Блэкман (Blackman, 1928)].

Даже если допустить возможность „частичного анаэробноза“, то ожидаемые продукты не могут быть более окисленными, чем сахара.

Результаты экспериментальных исследований всех авторов, за исключением Ричардса (Richardson), о влиянии искусственно измененной атмосферы на суккулентные растения явно не согласуются с этой теорией частичного анаэробноза.

Экспериментально наблюдавшееся влияние изменения температуры на содержание кислот в растениях также противоречит этому взгляду.

Майер (Mayer, 1878) первый выдвинул взгляд, что яблочная кислота, образующаяся в суккулентах, возникает путем частичного окисления сахаров. Краус (Kraus, 1883), де Фриз (de Vries, 1884) и Пуриевич (Purjewitsch, 1893) развили дальше эту точку зрения.

Де Фриз (1889) первый подчеркнул, что образование и распад яблочной кислоты идут непрерывно как на свету, так и в условиях продолжительного затемнения. Высокая температура благоприятствует процессам распада, в таком же направлении действует и свет.

Пуриевич (1893) нашел, что у *Crassulaceae* (*Aeonium*) содержание кислоты достигает максимума примерно через 8 часов после того, как листья помещаются в темноту. В других случаях (например у *Robinia*) максимальная величина кислотности была обнаружена после более продолжительного пребывания в темноте, через 24 часа. Это явление было поставлено Пуриевичем в связь с предполагаемой им повышенной стабильностью лимонной кислоты, найденной у *Robinia*.

Натансон (Nathanson, 1910) также присоединился к этой точке зрения, согласно которой процесс дыхания суккулентных растений можно выразить в форме следующих последовательных реакций:



Де Фриз пытался выяснить, почему из всех промежуточных продуктов только одна яблочная кислота накапливается здесь в высокой концентрации, но его объяснение совершенно не соответствует имеющимся данным. Он предполагал, что накопление яблочной кислоты является следствием стимулирующего действия света.

Другое предположение, что накопление кислот является следствием недостатка кислорода в тканях, уже было упомянуто выше. Натансон (1910) и Пфеффер (Pfeffer, 1899) указывают, что экспериментальные данные говорят против того

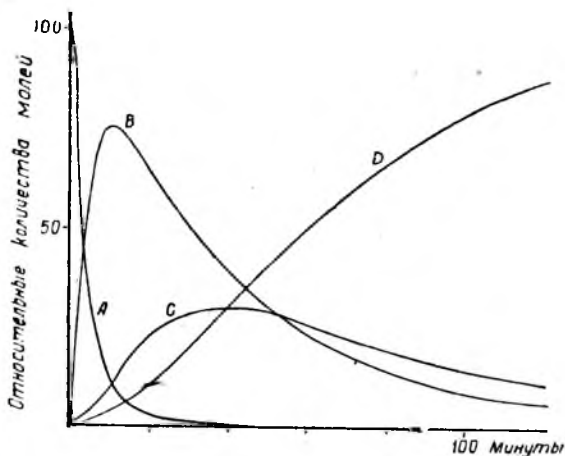
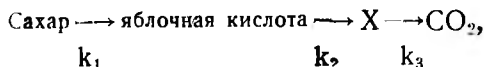


Рис. 4. Относительные количества реагентов в интервалы времени, показанные на абсциссе, при реакции: $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$, когда константы скоростей последовательных реакций связаны соотношением: $k_1 > k_2 < k_3$.

накопление кислоты. Если распад сахара до CO_2 представить в виде таких последовательных реакций:



то концентрации различных веществ в разное время от начала реакции (предполагая, что вначале имеется только сахар) могут быть вычислены, если известны величины констант скорости (k_1 , k_2 , k_3) промежуточных реакций [Резерфорд (Rutherford, 1913)]. Не входя в количественные расчеты (так как величины констант в этом случае неизвестны), можно легко видеть, что если $k_1 < k_2 < k_3$, то тогда концентрации яблочной кислоты и вещества X будут незначительны в течение всего процесса превращения сахара в углекислоту.

Но если $k_1 > k_2 < k_3$, то концентрация яблочной кислоты будет сначала возрастать до определенной максимальной величины, а затем начнет уменьшаться, примерно по логарифмической кривой. В момент достижения максимума скорости образования и распада кислоты равны, почему для этого момента мы можем написать:

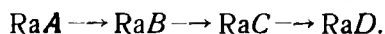
$$k_1 \cdot [\text{сахар}] = k_2 \cdot [\text{яблочная кислота}].$$

взгляда, что уменьшение кислорода способно вызвать такой эффект. Особенно отчетливо этот вопрос освещен у Натансона. Он выдвигает три линии доказательства, о которых у нас уже была речь раньше. Он не дает, однако, объяснения причин накопления яблочной кислоты; как и Пфеффер, он просто заявляет, что этот факт является следствием специфической природы растений.

Автор (1930) первый сделал попытку выяснить те специфические условия, при которых должно происходить

А так как $k_2 < k_1$, то концентрация яблочной кислоты должна к этому моменту быть выше, чем концентрация сахара.

Точные численные соотношения этого типа показаны на рис. 4 для системы, в которой константы скорости известны, а именно, для распада радия A :



Время, в течение которого происходит распад каждого из этих элементов до половины первоначального количества, соответ-

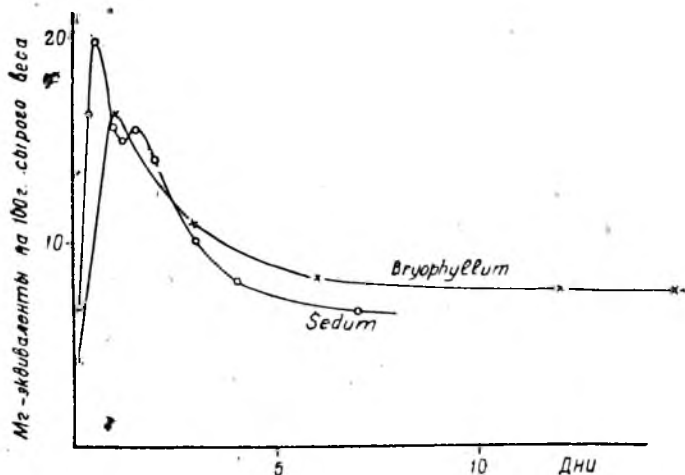


Рис. 5. Величины титруемой кислотности в листьях *Bryophyllum* (Custavson, 1925) и в отрезанных листьях *Sedum praealtum* (Bennet-Clark, 1930) за время длительного пребывания их в темноте при постоянной температуре. Кривая кислотности листьев *Sedum* построена на средних данных, каждый раз из четырех анализов. Листья *Sedum* были помещены в темноту в 6 час. вечера, 2 июня.

ственно составляет 3, 28,6 и 19,5 мин.; таким образом константы скорости связаны неравенствами $k_1 > k_2 < k_3$, как и в только что приведенном примере.

Ординаты кривых представляют относительные числа молекул A , B , C и D в последовательные моменты времени, причем первоначальная величина A принята за 100.

Кривая A показывает изменение во времени концентрации сахара в нашей системе, кривая B — изменения концентрации яблочной кислоты при условии, что $k_1 > k_2$. Эту последнюю кривую можно сравнить с экспериментальными данными об изменениях кислотности суккулентных растений (рис. 5).

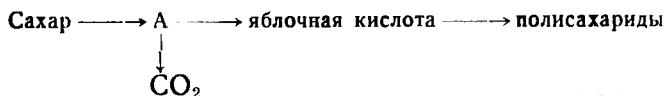
Кривые на рис. 5 показывают изменения в кислотности отрезанных листьев при продолжительном затемнении. К началу периода затемнения в них было много сахара (вследствие пред-

шествующего фотосинтеза), но мало кислоты. Голодание в темноте сначала вызвало подъем кислотности, за которым дальше последовало снижение, подчиненное, в общем, ходу логарифмической кривой. Кривая эта показывает большое сходство с кривой на рис. 4.

Отсюда естественно приходим к выводу, что причина накопления кислоты у суккулентов заключается в различной активности тех энзиматических систем, которые определяют величины k_1 и k_2 . Неспособность тех или иных растений накапливать кислоту (в данном случае — яблочную), повидимому, и связана у них с такими различиями в относительной активности этих двух энзиматических систем ($k_1 < k_2$).

Возможно, что это как раз и имели в виду Пфеффер и Натансон, утверждая, что накопление кислоты есть следствие специфической природы растения; однако точная формулировка процесса, как ряда последовательных реакций, не была ими сделана.

Если принять высказанный нами взгляд на причину накопления кислоты, то вовсе не требуется обязательно предполагать, что CO_2 образуется из яблочной кислоты или из продуктов ее распада. Накопление кислоты по такой схеме могло бы происходить и следующим образом:



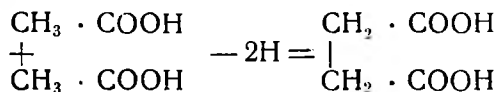
при условии, что константа скорости образования кислоты превышает константу скорости ее дальнейшего превращения.

ГИПОТЕЗЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РЕАКЦИЯХ НЕЙБЕРГА

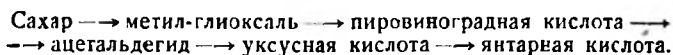
а) Общая характеристика взглядов лейпцигской школы

Здесь относятся две гипотезы: 1) Рулянда и Ветцеля (1931) и Вольфа (Wolf, 1931) и 2) автора этой работы (1930). Лейпцигская теория основана главным образом на работах новейшего времени по изучению образования четырехуглеродистых кислот (янтарной, фумаровой и яблочной кислот) в мышцах.

По общепринятой точке зрения, углеводный распад в мышечном дыхании идет по „схеме Нейберга“; в соответствии с этим сначала был выдвинут взгляд, что янтарная кислота образуется из уксусной по реакции Тунберга, а именно — следующим образом:

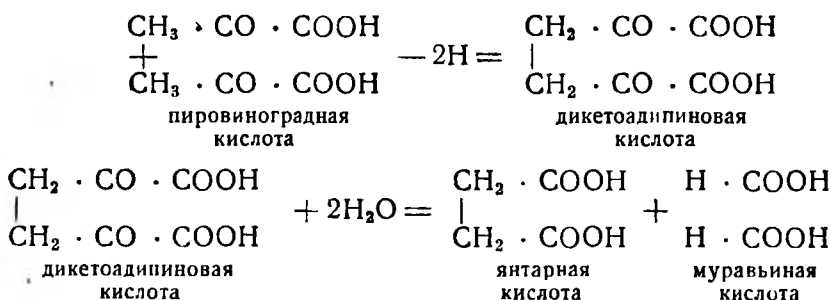


так что полная схема реакций, по которой, как предполагалось, идет образование янтарной кислоты, будет следующая:



Тэниссен и Бринкман (Thoeniessen и Brinkman, 1930), однако, показали, что уксусная кислота не превращается мышцами в янтарную кислоту, но что последняя образуется при пропускании через мышечную ткань пировиноградной кислоты. Действительно, в жидкости, пропущенной через мышечную ткань, пировиноградная кислота исчезает и вместо нее обнаруживаются янтарная и муравьиная кислоты.

Поэтому они предложили следующую схему превращений пировиноградной кислоты до янтарной:



Согласно этой схеме дикетоадипиновая кислота образуется из пировиноградной по несколько модифицированной реакции Тунберга, а затем, гидролизуясь, дает янтарную и две молекулы муравьиной кислоты.

Следует отметить, что эта дикетоадипиновая кислота до сих пор не была обнаружена, и ничего пока неизвестно, способна ли она действительно к быстрому превращению в янтарную и муравьиную кислоты. Правда, отсутствие ее накопления в количествах, доступных определению, можно было бы объяснить быстрым ее гидролизом.

Лейпцигская школа считает вероятным, что дыхание суккулентных растений идет в первой стадии по тому же пути бройдильного распада сахаров, вызываемого зимазой, как и у большинства других растений, но что судьба пировиноградной кислоты в случае суккулентов резко отличается от ее обычной судьбы в остальном растительном мире.

Процесс мыслится следующим образом:



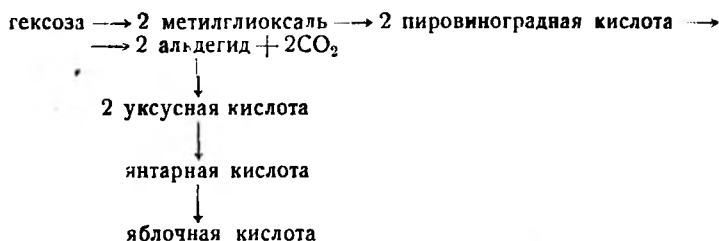
Нормально пировиноградная кислота под действием энзима карбоксилазы распадается на уксусный альдегид и CO_2 . Лейпцигская школа полагает, что у суккулентных растений периодически создаются условия, подавляющие активность карбоксилазы, благодаря чему перестройка пировиноградной кислоты идет особым путем, отклоняясь в сторону новых реакций, отмеченных в схеме стрелками вправо.

Главным основанием для такого взгляда является достаточно обоснованное положение, что реакции Нейберга (гексоза \rightarrow метилглиоксаль \rightarrow пировиноградная кислота \rightarrow альдегид + CO_2) действительно лежат в основе процесса распада сахара.

Теперь хорошо известно, что многие грибы, особенно виды *Mucor*, *Aspergillus* и *Penicillium*, способны накапливать кислоты типа яблочной и лимонной, т. е. с четырьмя и шестью атомами углерода, в тех случаях, когда в качестве единственного источника углерода им дается только спирт, альдегид или уксусная кислота [Буткевич и Федоров (1929) и Хжоншч и Тиукво (Chrzaszcz и Tiukov, 1930)].

Вполне естественно предположить, что это превращение двухуглеродистых соединений в четырехуглеродистые осуществляется путем окисления по типу реакции Тунберга (см. выше).

Поэтому представляется весьма вероятным, что процесс в целом идет по следующей схеме:



Ясно, что если две молекулы уксусной кислоты превращаются в одну молекулу яблочной кислоты, то образование каждой молекулы яблочной кислоты будет связано с образованием двух молекул CO_2 .

Необходимость признания этого условия, как обязательно вытекающего из данной схемы, вынуждает, однако, согласно Вольфу (1931), признать, что эта схема неприменима к суккулентным растениям, так как количество CO_2 , выделяющейся у них при образовании яблочной кислоты, ни в малейшей степени не соответствует тому количеству, которого следовало бы ожидать согласно схеме при распаде пировиноградной кислоты указанным путем.

Это видно из табл. 8, которая составлена по данным Вольфа и автора этой статьи.

ТАБЛИЦА 8

Относительные количества яблочной кислоты и CO_2 , образованные суккулентными растениями при их затемнении

Время, на которое затемнялись растения	мг-эквивалентов яблочной кислоты образовано	Мг CO_2 выделено	Мг CO_2 требуется по реакции Тунберга
--	---	---------------------------	--

Bryophyllum calycinum (Wolf, 1931)

От 17 ч. 30 м. до 8 ч.	0,97	5,0	42,6
" 17 " 30 " 9 "	0,34	5,5	14,9
" 17 " 30 " 9 "	0,50	1,0	22,0
" 15 " 30 " 9 "	1,1	5,0	48,4

Sedum praealtum—отрезанные листья (Benнет-Clark, 1930)

От 18 ч. до 23 ч.	14,2	76,0	625,0
" 20 " 24 "	8,3	59,0	365,0

ОПЕЧАТКА

Страница	Строка	Напечатано	Следует	По чьей вине
50	18 сверху	Тшукво	Тшукво	корректора

в старых работах (И у р и е в и ч, 1893), но В о л ь ф не мог ее обнаружить.

Если муравьиная кислота все же образуется, то, очевидно, она должна превращаться в какие-то другие соединения, но отнюдь не в CO_2 , как это видно из табл. 8. Щавелевая кислота также не обнаружена, так что, если муравьиная кислота окисляется до щавелевой кислоты, то последняя не может сохраняться как таковая, а должна исчезнуть путем восстановления до того или другого альдегида, который в свою очередь должен подвергнуться дальнейшим превращениям в какие-то новые продукты. Во всяком случае ясно, что если реакция Теннисен-Бринкмана действительно имеет место, то некоторые кислоты (муравьиная или щавелевая) должны восстанавливаться до некоторого альдегида, который подвергается дальнейшему превращению.

Нами уже было указано, что различные кислоты с четырьмя атомами углерода в живых тканях вероятно способны легко превращаться друг в друга. О характере этих реакций у нас уже была речь раньше (в первой части). Прямых доказательств в пользу того, что эти превращения действительно происходят у суккулентных растений, мы пока не имеем, но нет никаких оснований предполагать, что они вообще не происходят.

б) Периодические вариации в активности карбоксилазы у суккулентных растений

Рулянд и Ветцель (1931) и Вольф (1931) полагают, что кислоты с четырьмя атомами углерода накапливаются в растительных тканях в заметных количествах в тех случаях, когда распад пировиноградной кислоты не может идти по обычному типу декарбоксилирования, но совершается особым путем без выделения CO_2 .

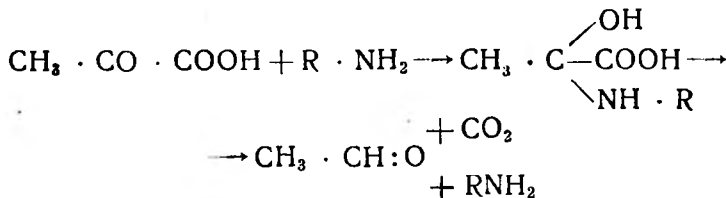
По их мнению, причина этого явления заключается в том, что активность карбоксилазы подавляется под влиянием уксусного альдегида.

Ветцель (1931) показал, что уксусный альдегид действительно подавляет карбоксилазу. Это было доказано опытами с перебраживанием пировиноградной кислоты при помощи препарата сухих дрожжей в присутствии различных концентраций уксусного альдегида. Выделение CO_2 представлено в табл. 9.

ТАБЛИЦА 9

Подавление карбоксилазы уксусным альдегидом		
Прибавлено альдегида	Общая концентрация альдегида в процентах	Выделено CO_2 (мг CO_2 на 1 г дрожжей в час)
0	0,018	638
0,01	0,027	583
0,05	0,06	330
0,10	0,109	298
1,0	1,004	105
2,0	2,001	11

Боклунд (Boklund, 1930) показал, что различные аминокислоты, как, например, анилин, ускоряют отщепление карбоксильной группы от пировиноградной кислоты; он предполагает, что этот каталитический процесс осуществляется путем следующих реакций:



Так как амины, соединяясь с альдегидами, образуют „основания Шиффа“:



то отсюда возникло предположение, что действие альдегидов на карбоксилазу есть результат связывания ими активной аминокислотной группы, которая, повидимому, обуславливает каталитическую активность карбоксилазы.

Отметим, что концентрации 0,05—0,10% уменьшают активность карбоксилазы примерно наполовину. Рулянд и Ветцель отмечают, что Какезита (Kakesita, 1930) нашел в листьях концентрации ацетальдегида порядка 10,9 мг на 10 см³ сока (около 0,1%).

Все эти данные как будто говорят за то, что активность карбоксилазы у суккулентных растений действительно может сильно подавляться уксусным альдегидом.

в) Содержание уксусного альдегида в листьях суккулентов

На самом деле опыт Какезита, на который ссылаются Рулянд и Ветцель, является нетипичным, и на основании его нельзя делать выводы общего характера. В целом данные Какезита не вполне благоприятны для лейпцигской гипотезы. Верно, что в одном опыте он нашел содержание какого-то альдегида равным 0,109%, как указано Руляндом и Ветцелем, но листья в данном случае находились в анаэробных условиях.

Какезита особо подчеркивает, что при нормальных условиях зрелые листья содержат альдегида не свыше 0,017%. В отрезанных листьях содержание альдегида возрастает, достигая через 24 часа максимальной величины около 0,06%, после чего наблюдается медленное уменьшение содержания альдегида.

Это показывает, что в нормальных условиях содержание альдегида в листьях *Bryophyllum* не превышает нормы, типичной для тканей высших растений и для бродильной среды (табл. 9).

Возможно, что метод определения альдегида по Какезита не вполне точен при применении его к сырому соку суккулентных растений. Он прибавлял к соку сульфат гидроксиламина и титровал серную кислоту, которая освобождалась в результате связывания гидроксиламина с альдегидом при образовании оксима. При таких условиях и многие другие вещества, помимо альдегида, могут создать кислую реакцию в растворе сернокислого гидроксиламина.

Автор разработал нефелометрический метод для определения таких малых концентраций альдегида, какие наблюдаются в интересующих нас случаях. Метод основан на замечательно низкой растворимости 2:4-динитрофенилгидразона ацетальдегида. В интервале концентраций между 0,05 и 0,005% уксусный альдегид легко можно определить нефелометрически, прибавляя раствор 2:4-динитрофенилгидразина в N/2 HCl к испытуемому раствору и сравнивая его мутность с мутностью стандартного раствора альдегида.

Когда концентрация альдегида превышает 0,05%, гидразон образует слишком объемистый и хлопьевидный осадок, чтобы проводить нефелометрическое определение. Искусственное при-

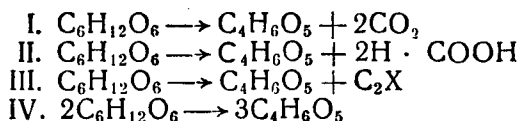
бавление ацетальдегида показало, что осаждению гидразона не препятствуют коллоидальные или другие вещества, присутствующие в соке.

Ни в одном из исследованных суккулентных растений не было найдено концентрации альдегида выше 0,01%. Искусственно обогащенные альдегидом образцы сока, в которых содержание альдегида было доведено до 0,1%, давали значительный осадок динитрофенилгидразона. Нормальный сок давал слабую мутность, имевшую более сильный оранжевый оттенок по сравнению с чистым раствором альдегида. В типичных случаях содержание альдегида по нашим данным выражается следующими цифрами: *Bryophyllum calycinum* — 0,01%; *Crassula arborescens* — 0,007%; *Stapelia variegata* — 0,007%; *Sedum praealtum* при 20°С — 0,006%; *Sedum praealtum* при 2—3°С не давал помутнения, т. е. содержание альдегида было ниже 0,003%. В ряде анализов было найдено, что при выдерживании на холоду концентрация альдегида настолько снижается, что она уже становится недоступной для определения; необходимо в то же время отметить, что сама кислота накапливается при низких температурах в большей степени, чем при обычной комнатной температуре. В целом наши результаты близки к данным Какезита. Найденные величины альдегида в три раза ниже найденных Какезита, и отсюда возникает сомнение, является ли найденный им альдегид действительно ацетальдегидом. Данные Какезита, как и наши, не могут служить опорой для гипотезы, что активность карбоксилазы у суккулентов подавляется альдегидом.

г) Соотношение между количествами потребленного сахара и образованной яблочной кислотой

Химизм превращения углеводов в яблочную кислоту представляет собой весьма сложную и трудную проблему.

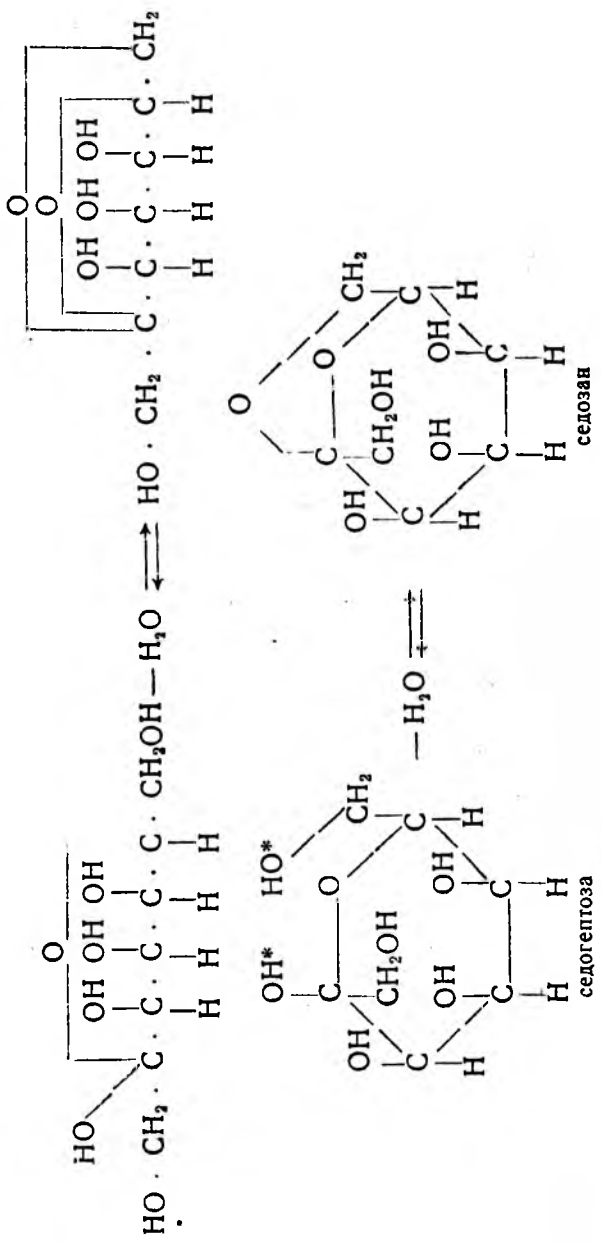
Первая реакция из числа приведенных ниже не наблюдается вовсе; вторая — реакция Теннисе и Бринкмана — в случае своего осуществления требует дальнейшего превращения муравьиной кислоты в какие-то неизвестные продукты путем восстановления COOH-группы в альдегидную группу CH:O , так как других кислот, кроме яблочной, обнаружить не удастся; третья реакция лишь чисто формально указывает на необходимость учитывать возможность образования других веществ, вместо муравьиной кислоты, отмечая лишь, что на образование их идет по два атома углерода параллельно с возникновением одной молекулы яблочной кислоты. В заключение мы особо рассмотрим четвертую реакцию.



Очень важно установить, сколько молекул кислоты образуется за счет каждой исчезающей молекулы сахара. Автор начал иссле-

довать этот вопрос несколько лет тому назад, но полученные им результаты привели лишь к дальнейшему усложнению проблемы.

Было замечено, что содержание редуцирующих сахаров в соке *Sedum praealtum* после нагревания сока с 1% HCl в течение короткого времени, вместо увеличения за счет гидролиза ди- или полисахаридов, уменьшается примерно на 50%. Оказалось, что это явление связано с наличием в соке данного растения больших количеств сахара гептозы. Этот сахар — седогептоза — был впервые найден Ля-Форжем и Гудсоном (La Forge и Hudson, 1917) в листьях *Sedum spectabile*. Они показали, что этот сахар является 2-кето-гептозой, которая обладает свойством при нагревании с разбавленными минеральными кислотами превращаться в ангидридное соединение, уже неспособное восстанавливать щелочной раствор меди. Позднее Ля-Форж (1920) показал, что и конфигурация этого сахара отличается от конфигурации других встречающихся обычно в природе сахаров тем, что все гидроксильные группы у него, повиди-



тому, находятся на одной и той же стороне молекулы. Точное установление конфигурации и положения кислородного мостика было произведено Гиббертом и Андерсоном (Hibbert и Anderson, 1930). Формулы седогептозы и ее ангидридного производного — седозана — даны на стр. 58, написанные как в обычной форме (развернутой цепочки), так и в кольцевой форме, чтобы показать пространственное расположение атомов.

Как видно, в седозане отсутствует кетонная группа, почему он и неспособен восстанавливать растворы меди или ферроцианида.

Нагревание со слабой кислотой приводит к образованию смеси обоих продуктов, причем устанавливается равновесие, при котором около 80% вещества присутствует в виде седозана и 20% в виде свободного сахара. Причиной этой замечательной реакции является близость друг к другу гидроксильных групп, отмеченных звездочками. Эта реакция была использована автором с целью определения количества седогептозы в соке суккулентных растений.

Нагревание на кипящей водяной бане с 1% HCl в течение 15 минут вызывает уменьшение восстановления меди раствором седогептозы на 75%.

Восстанавливающая сила растворов фруктозы за такой короткий период нагревания уменьшается лишь незначительно (всего на 5%). Степень уменьшения восстанавливающей способности раствора после гидролиза кислотой (дисахариды предварительно расщепляются при помощи энзимов) может служить мерой для учета наличного содержания седогептозы.

Точность определения, однако, несколько понижается в присутствии других кетоз.

Оказалось, что содержание альдоз (измеренное иодометрически) + содержание седогептозы (определенное по описанному методу) равняется сумме моносахаров. Следовательно фруктоза и другие кетозы в этом случае отсутствуют или же присутствуют лишь в виде следов. Сахароза не была обнаружена (способ определения — инверсия с инвертазой). Содержание пентоз составляло около 10% от общего содержания альдоз.

В течение суток происходят своеобразные колебания в содержании седогептозы. Результаты опытов, в которых в качестве объекта служили листья *Sedum praealtum*, представлены графиче-

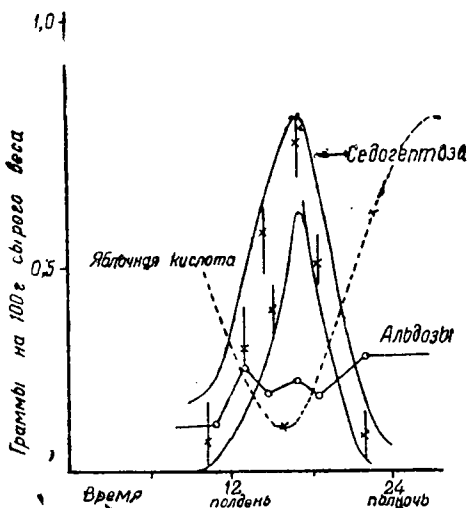


Рис. 6. Суточные колебания кислотности и содержание сахаров в отделенных от растения листьях *Sedum praealtum* 20 июня.

чески на рис. 6. Время дня показано на абсциссе, а ординаты показывают процентное содержание седогептозы и альдоз в разное время суток.

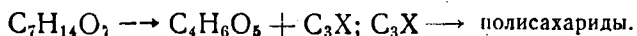
Мы видим, что в содержании альдоз наблюдаются лишь незначительные изменения, причем концентрация их колеблется около 0,2% на сырой вес. Содержание седогептозы повышается от концентрации ниже 0,1% в 10 час. утра до 0,8% в 6 час. дня и затем быстро спадает до 0,1% к полуночи. Содержание седогептозы падает как раз в то время, когда содержание кислоты в листьях возрастает. Максимум содержания седогептозы и минимум кислотности наблюдаются около 6 час. вечера.

В этом опыте между 5 и 10 час. 30 мин. вечера исчезло 0,7 г седогептозы и накопилось 8,0 мг-эквивалентов (0,536 г) яблочной кислоты на 100 г сырого веса. В другом опыте с такими же листьями, находившимися в идентичных условиях, выход CO_2 составил 39 мг на 100 г сырого веса. Пересчитаем эти величины на содержащийся в них углерод:

Исчезнувшая седогептоза содержит	280 мг С
Образованная яблочная кислота содержит	190 " "
Выделившаяся углекислота содержит	10,6 " "
Количество альдоз не изменилось.	

Мы видим, что из 280 мг углерода исчезнувшей седогептозы, 200 мг покрывается яблочной кислотой и CO_2 , судьба же остальных 80 мг, или $\frac{2}{7}$ общего количества углерода, остается пока неизвестной.

Предположим, хотя и без точного согласования с учитываемыми результатами нашего опыта, что $\frac{4}{7}$ углерода седогептозы (а не $\frac{5}{7}$, как в опыте) превращается в яблочную кислоту, а $\frac{3}{7}$ в другие продукты, возможно — в крахмал (так как содержание крахмала в листьях возрастает). Такое предположение требует принятия следующих реакций:



Данные Вольфа (1931) не вполне гармонируют с нашими, но прямое сравнение между ними невозможно, так как Вольф сообщает только о двух единичных анализах: один в 5 час. дня и другой в 9 час. утра. Кроме того, он не представлял себе осложняющего эффекта от присутствия седогептозы.

Седогептоза неспособна сбраживаться обычными дрожжами. Данные Вольфа говорят как будто за то, что и седогептоза и другие сахара используются на образование яблочной кислоты: первая является основным материалом в первом опыте (8°C), но в остальных двух опытах способные к брожению сахара также, несомненно, принимали участие в образовании кислоты. Эти результаты совпадают с данными автора, по которым одна или меньше чем одна молекула кислоты образуется за счет каждой молекулы потребленного сахара.

ТАБЛИЦА 10

Изменения в содержании сахара и кислоты в листьях *Bryophyllum* в течение ночи (Wolf, 1931)

Уменьшение содержания способных к брожению сахаров	Уменьшение содержания неспособных к брожению сахаров (седо-гептоза)	Увеличение содержания яблочной кислоты	Температура (по С)
Милиграмм-моли на 1 г сухого веса			
0,065	0,253	0,210	8
0,275	0,225	0,50	20
0,195	0,233	0,22	35

д) Исчезновение яблочной кислоты в темноте. Лейпцигская гипотеза

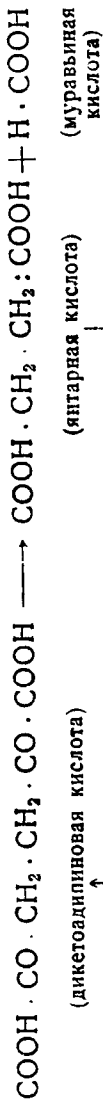
Рулянд, Ветцель и Вольф предполагают, что яблочная кислота окисляется в тканях до оксалукусусной кислоты, согласно приведенной выше схеме (ч. I). Оксалукусусная кислота, по их предположению, обычным путем превращается в пировиноградную кислоту. Ган и Гаарман (Hahn и Haarmann, 1928, 1929) показали, что мышечная ткань способна окислять яблочную кислоту до пировиноградной (вероятно через стадию оксалукусусной кислоты) в присутствии семикарбазида, который фиксирует образованную пировиноградную кислоту в виде ее семикарбазона.

Полная схема реакций, связанных с процессом образования и разрушения яблочной кислоты, может быть представлена как мы это видим на стр. 59.

Таким образом, согласно этой схеме, накопление яблочной кислоты представляется как следствие подавления активности карбоксилазы, а ее исчезновение в дальнейшем — как результат восстановления заново активности этого фермента. Изменения активности карбоксилазы, как предполагается, регулируются изменениями в содержании альдегида в листьях (Рулянд и Ветцель, 1931).

Однако почти с уверенностью можно утверждать, что концентрация альдегида слишком низка, чтобы вызывать заметное подавление карбоксилазы. Согласно данным Какезита, концентрация альдегида в листьях, отрезанных от растения, постепенно повышается до максимальной величины, которая достигается примерно через 24 часа после того, как они были сняты с растения; при этом сначала, когда содержание альдегида еще низко, яблочная кислота накапливается, а спустя 24 часа накопленная кислота начинает исчезать, хотя концентрация альдегида как раз в это время достигает наибольшей величины. Такие соотношения между содержанием альдегида и изменениями кислотности стоят в резком противоречии с требованиями лейпцигской теории.

Сахар



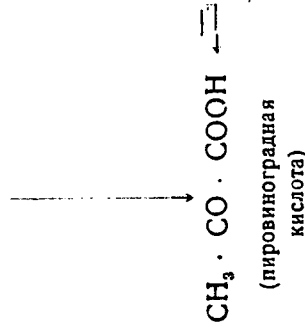
(янтарная кислота)

(муравьиная кислота)

(дикетогидроксиновая кислота)



→



О П Е Ч А Т К А

По чьей вине

Следует

корректора

Напечатано

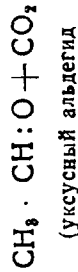
CH₃:COOH

Страница 59 в формуле наверху на право



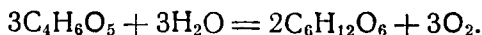
(оксалукусная кислота)

(яблочная кислота)



е) Исчезновение яблочной кислоты на свету

Майер (1878, 1899) первый показал, что освещенные листья некоторых толстянок выделяют кислород, когда они помещаются в атмосферу, совершенно лишенную углекислоты, причем одновременно наблюдается исчезновение яблочной кислоты. Предполагается, что при этом идет реакция:



Было невозможно решить, превращается ли сначала яблочная кислота в CO_2 , подвергающуюся затем фотосинтезу, или же материалом для фотосинтеза служит непосредственно сама яблочная кислота. Майер считает возможным, что кислород в этих условиях фотохимически отщепляется от карбоксильной группы, а образующиеся при этом активные окси-альдегиды подвергаются конденсации с образованием сахаров.

Шпэр (Sprengel, 1913) показал, что полное фотохимическое окисление яблочной кислоты может происходить *in vitro*. Он полагает, что этот процесс происходит также и в самих суккулентных растениях и что полученная таким путем CO_2 используется далее в акте фотосинтеза. Как было уже упомянуто, Шпэр держится взгляда, что разрушение яблочной кислоты есть чисто фотохимическая реакция и ни в какой связи не стоит ни с деятельностью энзимов ни со структурой клетки; однако тот факт, что наркотики задерживают процесс разрушения яблочной кислоты на свету, показывает, что реакция Шпэра не может лежать в основе этого процесса в нормально функционирующем растительном организме. Вольф выставил дополнительные доказательства против того, что реакция Шпэра происходит *in vivo*. Он нашел, что 1-яблочная кислота исчезает быстрее, чем d-яблочная кислота, а это заставляет предполагать, что процесс разрушения кислоты связан с деятельностью оптически активного энзима. Сверх того он показал, что порядок величины температурного коэффициента этой реакции свидетельствует о том, что она должна быть обычной химической, а отнюдь не фотохимической природы (наблюдаемый Q_{10} был между 2 и 3).

Вольф полагает, что распад кислоты в освещенных листьях происходит совершенно таким же образом, как и в темноте. Он предполагает, что яблочная кислота превращается сначала в оксалукусусную, затем в пировиноградную кислоту, из которой образуются CO_2 и уксусный альдегид, а последние, по его мнению, могут в конце концов превращаться в углеводы.

Варбург (1886) и Аструп (1903) показали, что углекислота, подобно наркотикам, подавляет процесс разрушения органических кислот на свету. Вольф подтвердил и расширил эти данные. В результате своих исследований он пришел к выводу, что ускорение исчезновения яблочной кислоты из листьев на свету обусловлено понижением содержания CO_2 благодаря фотосинтезу.

Подавление распада кислоты, вызываемое углекислотой, по мнению Вольфа, является следствием того факта, что CO_2 создает в тканях условия наркоза, причем дыхание до известной степени начинает принимать характер анаэробного дыхания.

Томас (Thomas, 1925) показал, что в таких условиях в тканях яблочк наблюдается накопление спирта (в небольших количествах) и особенно уксусного альдегида (значительно больше, чем спирта). По Вольфу, подобный же процесс должен происходить в листьях толстянковых растений, причем накопление альдегида должно в конце концов привести к подавлению активности карбоксилазы, о чем уже говорилось выше (раздел б).

ж) Итоги лейпцигской гипотезы

Гипотеза Рулянда, Ветцеля и Вольфа может быть, в общем, выражена в форме следующих положений: из сахара под действием зимазного комплекса образуется пировиноградная кислота, но дальнейший распад ее до уксусного альдегида и CO_2 не происходит вследствие ненормально высокого содержания альдегида в тканях, и в результате она превращается в яблочную кислоту. Образование 4-С соединений за счет 3-С соединений с необходимостью предполагает параллельное накопление простейших соединений с 1- или 2-углеродными атомами, которые, с другой стороны, могут, не накапливаясь, быстро превращаться в более сложные соединения.

В действительности 1-С и 2-С соединения не накапливаются и не выделяются; следовательно должно происходить превращение их в какие-то сложные соединения. Такие анаболические синтезы обычно подавляются или даже совсем прекращаются в присутствии анестетиков или в анаэробных условиях; эти гипотетические соединения могли бы вследствие этого накапливаться в таких условиях. Эта возможность в настоящее время исследуется.

Предполагается, что ненормально повышенная концентрация альдегида, которая якобы, периодически возникает в тканях суккулентных растений, обуславливается действием углекислоты, оказывающей наркотическое действие на дыхательную систему. Когда растения освещены, фотосинтез приводит к понижению парциального давления углекислоты; предполагается, что благодаря этому содержание альдегида уменьшается и вновь возвращаясь к норме активность карбоксилазы приводит теперь к исчезновению яблочной кислоты в тканях.

з) Гипотеза восстановления кислоты

Мы выдвинули (1930) другой взгляд на кислотный метаболизм у *Crassulaceae*. Нами было высказано предположение, что процесс гликолиза у суккулентных растений происходит таким же образом, как и в растениях обычного типа, причем часть углерода продуктов гликолиза выделяется в виде углекислоты,

но другая, бóльшая часть, претерпевает процесс окислительного анаболизма, аналогичный тем процессам, которые наблюдаются в яблоках, согласно Блекману (1928), в дрожжах (окислительный синтез спирта до гликогена), по данным Лундина (Lundin, 1923) и Мейергофа (Meuergof, 1925), и, наконец, в мышечной ткани (ресинтез молочной кислоты в гликоген). С этой точки зрения яблочная кислота является промежуточным веществом при превращении продуктов гликолиза в углеводы. В соответствии с данным раньше анализом, ее накопление должно быть обусловлено тем, что константа скорости ее образования превышает константы скорости ее дальнейших превращений.

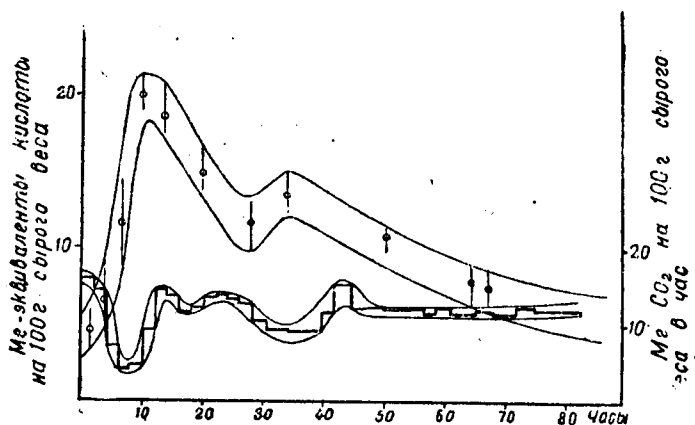


Рис. 7. Изменения интенсивности дыхания (нижняя кривая) и содержания кислоты (верхняя кривая) в отделенных от растения листьях *Sedum praealtum*, помещенных в темноту в 8 час. вечера 17 июня и непрерывно содержащихся в ней при 21° С.

Автор не вдавался в детальный анализ происходящих при этом химических превращений, так как в его распоряжении не было достаточного количества точных фактических данных. Однако был выдвинут взгляд, что исчезновение кислоты из ткани в основе является результатом восстановительных, а не окислительных реакций. Автором для обоснования этой гипотезы выставлены три главные линии доказательств. О них и будет речь в последующих разделах.

и) Влияние длительного голодания на листья *Crassulaceae*

Из отделенных от растения и помещенных в темноту листьев происходит непрерывная потеря углерода (в виде углекислоты). По мере усиления голодания происходят характерные изменения в скорости выделения углекислоты и в содержании кислоты в тканях. Результаты типичного опыта представлены графически на рис. 7.

Цифровые отсчеты, полученные для листьев *Sedum praealtum* в последовательные моменты опыта и характеризующие скорость выделения CO_2 , с одной стороны, и наличное содержание кислоты — с другой, представлены на рис. 7 соответствующими ординатами.¹

Листья, в которых определялось содержание кислоты, были вполне сходны с листьями, у которых определялось выделение углекислоты, причем они были отобраны с одного и того же растения и содержались в одинаковых условиях во время затемнения.

Скорость выделения углекислоты обнаруживает резкий подъем немедленно после того как листья помещаются в темноту (в 8 час. вечера 16 апреля), но затем очень быстро падает примерно до четверти первоначальной величины. Это уменьшение скорости выделения углекислоты совпадает с быстрым увеличением содержания яблочной кислоты. После некоторых колебаний скорость в конце концов приближается к некоторой относительно постоянной величине.

Эту финальную фазу голодания можно рассматривать как фазу наступления равновесия. Листья становятся желтыми и как бы стареют, но это состояние не связано с заметными изменениями в скорости выделения углекислоты.

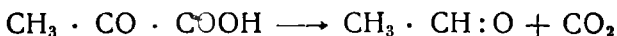
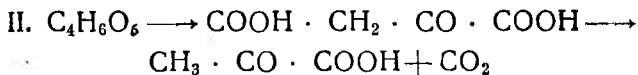
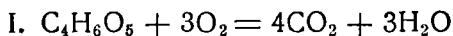
В этих опытах нет того резкого увеличения яблочной кислоты, в два раза и больше, как это наблюдалось в некоторых других опытах. Уменьшение кислотности сменяется вторичным подъемом, выраженным вполне ясно. Второй максимум, далее, снова сменяется уменьшением кислотности, идущим уже безостановочно до конца опыта. Важно отметить, что максимум кривой кислотности не совпадает с максимумом кривой выделения углекислоты. Наоборот, максимум кислотности довольно близко, хотя и не вполне точно, совпадает с минимумом выделения углекислоты. Сходные результаты получены во всех опытах как с *Sedum praealtum*, так и с *Crassula lactea* — с обоими исследованными видами.

Эти результаты показывают, что яблочная кислота не является тем материалом, из которого образуется углекислота. Если бы яблочная кислота была таким субстратом, то выделение углекислоты было бы пропорционально концентрации яблочной кислоты.

Следовательно реакция, предложенная некоторыми старыми исследователями (де Фриз, Натансон, Пуриевич и др.) и обозначенная ниже цифрой 1, а также реакции лейпцигской школы, обозначенные ниже цифрой 2, — не отвечают действительности, и в лучшем случае за их счет можно отнести лишь

¹ Кривая титруемой кислотности построена на средних из четырех отдельных определений. Верхний конец вертикальной черточки, проходящий через точку, соответствующую средней величине, обозначает максимальную величину, а нижний — соответственно минимальную. Определение CO_2 проводилось по методу Петенкофера.

очень небольшую долю общего количества выделенной углекислоты.



Так как пировиноградная и оксалуксусная кислоты не накапливаются, то скорость выделения углекислоты во втором случае также должна была бы быть пропорциональна concentra-

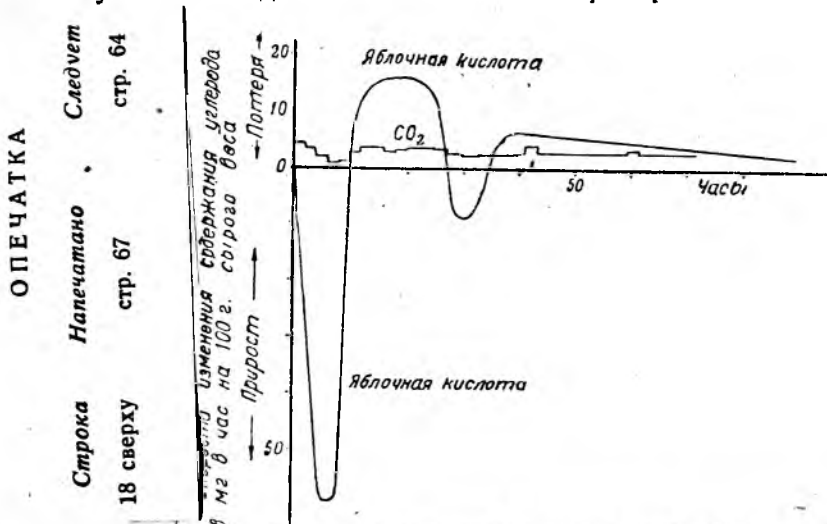


Рис 8. Скорость накопления и исчезновения яблочной кислоты и выделения углекислоты, выраженная в миллиграммах углерода. Листья *Sedum praealtum*. Тот же самый опыт, что и на рис. 7.

ции яблочной кислоты, если только не считаться с возможностью резких колебаний в константах скоростей соответствующих реакций.

Для того чтобы дать ясное представление о том количестве углекислоты, которое может быть выделено за счет яблочной кислоты, данные того же самого опыта выражены графически еще в другой форме.

На рис. 8 кривые воспроизводят не содержание кислоты в тканях, а скорость изменения ее содержания во времени, причем учитывается не кислота в целом, а лишь содержащийся в ней углерод.

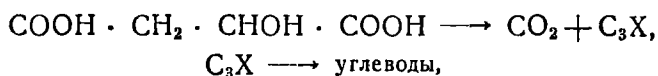
Прирост кислотности показан ординатами вниз от нулевой линии, которая обозначает первоначальное содержание кислот в листе, а потеря титруемой кислотности и углекислоты — ординатами вверх от нее. Все изменения в ту и другую сторону выражены в миллиграммах углерода за 1 час на 100 г сырого

меса (1 мг-эквивалент яблочной кислоты соответствует 24 мг углерода). Отметим, что кривая падения кислоты пересекает нулевую линию в моменты, соответствующие максимуму и минимуму кривой кислотности на рис. 7.

Наиболее важным результатом данного опыта, взятого в целом, является тот факт, что для значительной части того времени, когда растение находится в условиях углеводного голодания, особенно между 11 и 26 часами, скорость исчезновения углерода в форме яблочной кислоты превышает скорость, с которой углерод выделяется в виде углекислоты. Отсюда с необходимостью вытекает, что яблочная кислота, по крайней мере в некоторой своей доле, сохраняется в тканях в какой-то нейтральной форме. Между 15 и 21 часами скорость потери углерода в виде яблочной кислоты равна 16 мг в час, а средняя скорость выделения углерода в форме углекислоты составляет всего лишь 3,3 мг в час.

Если бы происходила реакция, предполагаемая Лейпцигской школой (уравнение II на стр. 67), за час должно было бы удалиться по крайней мере 8 мг.

Если бы процесс происходил на основе следующих реакций



то в виде углекислоты должно было бы выделяться в 1 час по крайней мере 4 мг углерода. Важно отметить, что эти числа (8 и 4 мг в 1 час) являются минимальными величинами, которых можно было бы ожидать на основе реакций лейпцигской школы и только что данной схемы. На самом деле следовало бы ожидать более высоких величин, так как кривая уменьшения углерода яблочной кислоты, изображенная на рис. 8, представляет фактическую скорость (net rate) исчезновения кислоты, а не истинную скорость (gross rate). Почти с полной уверенностью можно утверждать, что образование и исчезновение кислоты происходят непрерывно и одновременно и поэтому истинная (gross) скорость образования или исчезновения яблочной кислоты должна превышать фактическую скорость. Так как фактическая скорость исчезновения кислоты более чем в четыре раза превышает скорость выделения углекислоты, то отсюда следует, что уменьшение кислотности не является следствием отщепления углекислоты из карбоксильных групп яблочной кислоты.

Другими процессами, которые могли бы устранить кислые свойства карбоксильной группы, являются следующие:

1) внутреннее превращение в эфир или ангидрид, 2) превращение в амид или аммонийную соль и 3) восстановление до альдегидной группы. Первые два вряд ли могут происходить в сколько-нибудь значительной степени, так как амиды или аммонийные соли найдены лишь в небольших количествах, а ангидриды и эфиры присутствуют только в виде следов. Исключая

эти возможности, мы поэтому приходим к выводу, что карбоксильные группы восстанавливаются до альдегидных групп. На основании имеющихся данных нельзя предполагать, что яблочная кислота восстанавливается до яблочного альдегида. Однако из яблочной кислоты может образоваться другая кислота или другие кислоты (например гликолевая), которые затем могут быть превращены в альдегид или альдегиды, а возможность превращения таких окси-альдегидов в углеводы отвергать не приходится.

Данные следующего раздела показывают, далее, что уменьшение кислотности, т. е. потеря карбоксильных групп, действительно является скорее следствием восстановления их, чем результатом образования эфиров или ангидридов, которые могли бы получаться за счет внутренних реакций с аммиаком или гидроксильными группами.

к) Значение дыхательного коэффициента

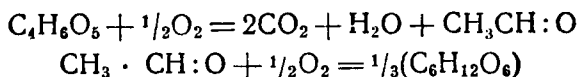
Со времени Соссюра (Saussure, 1804) известно, что величина отношения $\text{CO}_2:\text{O}_2$ у суккулентов сильно отличается от единицы. Пока идет накопление яблочной кислоты, дыхательный коэффициент имеет очень низкую величину (нередко спускаясь до 0,1), так как кислород потребляется при превращении сахаров в яблочную кислоту без какого-либо соответствия с выделением углекислоты. В период постепенного исчезновения яблочной кислоты величина дыхательного коэффициента, наоборот, выше единицы.

Аструг (Astruc, 1903) дает много данных по определению величины дыхательного коэффициента в течение фазы исчезновения кислоты; во многих случаях полученные им цифры лежат между 1,00 и 1,33, но по временам встречаются и более высокие. Среди них отметим следующие: 1,50; 1,48; 1,53; 1,75; 1,78; 2,41; 1,42. Аструг не комментирует значения этих величин.

Когда яблочная кислота полностью окисляется до углекислоты и воды, то отношение $\text{CO}_2:\text{O}_2$ должно быть равно 1,33.

Если яблочная кислота окисляется вместе с другими веществами (например сахаром), то дыхательный коэффициент будет ниже 1,33. Высокие величины, найденные Астругом, можно было бы объяснить одним из двух: или неполным окислением яблочной кислоты, или же превращением части или всего углевода яблочной кислоты в углеводы и сохранением этого углевода в тканях.

На основании взглядов Рулянда и Ветцеля можно ожидать следующих реакций:



При наличии таких реакций и при условии, что образующийся сахар совершенно не подвергается окислению, дыхательный

коэффициент должен быть равен 2; но если происходит хотя бы частичное окисление сахара, дыхательный коэффициент будет ниже двух. Выше двух он не может быть здесь ни при каких обстоятельствах.

Аструп отмечает два случая, в которых величины дыхательного коэффициента составляли 2,39 и 2,41, и мы также наблюдали величины выше, чем два. Такие высокие величины можно объяснить тройко.

1) Альдегид, образование которого предполагается лейпцигской школой, может улетучиться в виде газа из дышащей ткани и поэтому полностью или отчасти избежать окисления в углеводы. Мы в своих опытах показали, что улетучивания альдегида в виде газа не происходит, так как, заставляя проходить воздух из камеры с опытными растениями через насыщенный раствор 2:4-динитрофенилгидразина в N/2 HCl, мы не наблюдали образования осадка, тогда как в контроле, где струя воздуха проходила сначала над 0,1% раствором альдегида, а затем уже в растворе гидразина, появлялся обильный осадок гидразона альдегида.

2) По взглядам лейпцигской школы, половина или менее половины кислоты может быть превращена в сахар. Если же в сахар превращается больше половины кислоты, то дыхательный коэффициент должен быть выше двух. Это и есть взгляд, выдвинутый в предыдущем разделе. Если это действительно происходит, то, как уже было там указано, отсюда следует, что карбоксильные группы восстанавливаются до альдегидных групп.

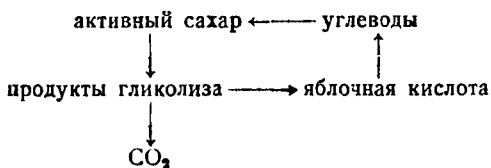
3) Описанные результаты могут быть также следствием экспериментальных ошибок или ошибочной интерпретации анализов. Макэн и Демусси объясняли высокие величины дыхательного коэффициента, исходя из предположения, что углекислота может выделяться из тканевых соков и что, таким образом, зарегистрированное в опыте выделение углекислоты состояло из углекислоты, образованной в процессе дыхания, а также из углекислоты, которая просто улетучилась из тканевых растворов. Последнее могло бы происходить только в том случае, если бы температура или парциальное давление CO_2 в окружающей атмосфере подвергалось изменениям. Вместе в тем отнюдь нельзя считать бесспорным, что повышение температуры будет обязательно вызывать улетучивание CO_2 из тканевых растворов. Наоборот, было найдено, что парциальное давление CO_2 во внутренней атмосфере яблоч с повышением температуры возрастает (E k a m b a g a n, цитировано по B l a k m a n и P a r i j a, 1928). Повышение давления CO_2 должно было бы само по себе привести к обогащению раствора этим газом, но эта тенденция встречает препятствие в понижении растворимости газа при повышении температуры. В таком случае, как листья *Crassula-seae*, где состав внутренней атмосферы совершенно неизвестен, невозможно предсказать, будет ли повышение температуры вызывать поглощение углекислоты раствором или, наоборот, выход ее из раствора. Косвенные доказательства наводят на мысль, что происходит первое. Если принять эти соображения, то тол-

кование Макена и Демусси о причинах высокой начальной величины дыхательного коэффициента у суккулентных растений теряет свою силу.

В нашей работе (1932), где были произведены последовательные измерения дыхательного коэффициента в листьях, содержащихся в течение всего опыта при постоянной температуре и одинаковом наружном давлении CO_2 , были найдены высокие начальные величины дыхательного коэффициента. В период накопления кислоты величины дыхательного коэффициента были найдены значительно ниже единицы, а затем, в течение фазы исчезновения кислоты, они сменились величинами выше 2,0. Так как растения с самого начала опыта были относительно CO_2 в равновесии с окружающей средой, то ясно, что отмеченные высокие величины дыхательного коэффициента в конце опыта не являются следствием улетучивания CO_2 из раствора. Следовательно в этом случае единственно правильным истолкованием результатов опыта может быть лишь тот вывод, что более чем половина кислоты подвергалась здесь восстановлению и, возможно, дальнейшему превращению в углеводы.

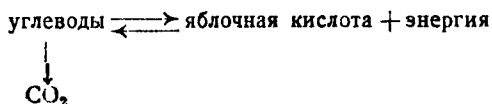
л) Влияние изменения температуры

Данные, рассмотренные в двух последних разделах, приводят к убеждению, что схема приведенных ниже реакций правильно определяет то место, которое яблочная кислота занимает в общем цикле метаболических процессов у растений суккулентного типа.



Эта точка зрения гармонирует со взглядом, что яблочная кислота подвергается процессу восстановления, и, вместе с тем, она согласуется с тем фактом, что скорость выделения CO_2 не пропорциональна концентрации яблочной кислоты. Начальная скорость выделения CO_2 особенно высока, что несомненно связано с высокой начальной концентрацией сахара в начальном периоде затемнения.

В более упрощенной форме этот цикл изменений может быть выражен еще таким образом:



Такое равновесие, согласно принципу Ле-Шателье, должно при повышении температуры смещаться в направлении, в кото-

ром энергия поглощается. Опытные данные говорят в пользу такого понимания.¹

Отрезанные листья *Sedum praealtum*, содержащиеся при высокой температуре в темноте, скоро потеряли кислоту, которую они раньше накапливали, и кислотность у них далее все время держится на низком уровне, как это показано на кривой $\frac{15}{X} a$ на рис. 9.

Совершенно такие же листья, но содержащиеся при 3°С, наоборот, увеличили свою кислотность, сохраняя ее далее примерно на одном и том же высоком уровне, как видно из кривой $\frac{16}{X} a$. Перенесение листьев из низкой в высокую температуру

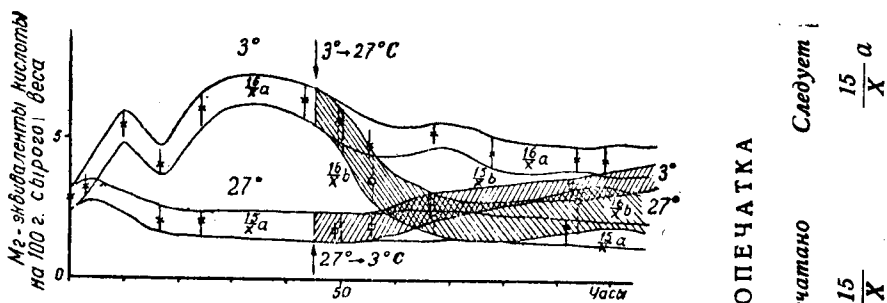


Рис. 9. Ход изменения кислотности (титруемой) в отрезанных листьях *Sedum praealtum* в темноте при разных температурах (3 и 27°С). Листья помещены в темноту 15/X. Двойная кривая с пометкой $\frac{15}{X}$ получена при температуре 27°; с пометкой $\frac{16}{X} a$ — при 3°; с пометкой $\frac{15}{X} b$ — при 3° после предварительного пребывания в течение 45 часов при 27°; с пометкой $\frac{16}{X} b$ — при 27° после предварительного пребывания в течение 45 часов при 3°. Стрелки обозначают время изменения температуры.

вызывает понижение кислотности (кривая $\frac{16}{X} b$) и обратно, перенесение листьев из высокой в низкую температуру приводит к повышению концентрации кислоты.

Имеются некоторые косвенные данные, которые говорят за то, что яблочная кислота, постепенно исчезающая в листьях при перенесении их с холода в высокую температуру, превращается в углеводы.

¹ Утверждение Вольфа (1931), что при 20°С листья суккулентов содержат больше кислоты, чем при 10°С и более низких температурах, основаны на наблюдениях, проводившихся на ранних стадиях голодания. С увеличением длительности голодания содержание кислоты повышается и достигает более или менее постоянной величины, которая оказывается более высокой при более низких температурах.

ОПЕЧАТКА
Следует $\frac{15}{X} a$
Напечатано $\frac{15}{X}$
Строка 19 снизу
Страница 69

На рис. 10 показан ход выделения CO_2 листьями, совершенно однородными с теми, для которых на рис. 9 были получены графики $\frac{15}{\bar{X}}$ a, $\frac{15}{\bar{X}}$ b, $\frac{16}{\bar{X}}$ a и $\frac{16}{\bar{X}}$ b. На рис. 10 график $\frac{15}{\bar{X}}$ показывает скорость выделения CO_2 листьями, содержащимися сначала при 27° , а затем перемещенными в другой термостат с температурой 3°C . Соответственно график $\frac{16}{\bar{X}}$ показывает скорость дыхания листьев, содержащихся сначала при 3°C , а затем перенесенных в термостат с 27°C .

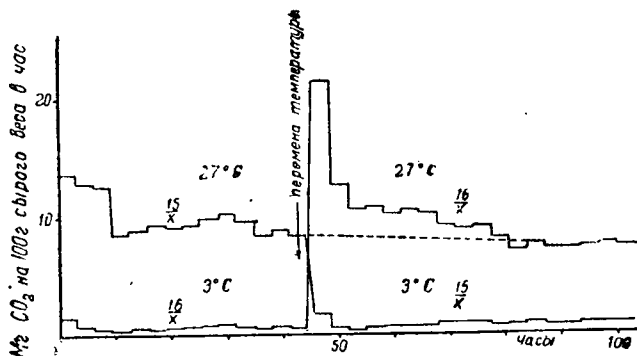


Рис. 10. Ход выделения CO_2 листьями однородного характера с теми, в которых определялась кислотность (рис. 9). Листья находились в темноте. Одни—сначала при 27° , потом—при 3° (пометка $\frac{15}{\bar{X}}$). Другие—сначала при 3° , потом при 27° (пометка $\frac{16}{\bar{X}}$). Смена температуры в том и другом случае через 45 часов (отмечено стрелкой). Заимствовано из работы Беннет-Кларка (1930).

Установившаяся при 27° высокая скорость дыхания (показанная графиками $\frac{15}{\bar{X}}$ и $\frac{16}{\bar{X}}$ и пунктирной линией) держится на этом уровне без потери листьями яблочной кислоты ($\frac{15}{\bar{X}}$ a), из чего и следует заключить, что углекислота дыхания получается здесь за счет углеводных запасов листьев.

Избыточное выделение углекислоты, наблюдаемое при повышении температуры (часть графика $\frac{16}{\bar{X}}$, выше пунктирной линии), происходит очевидно прямо или косвенно за счет яблочной кислоты, которая в это самое время исчезает.

Общее количество углерода, потерянное листьями в форме яблочной кислоты за время их пребывания при высокой температуре, составляет 90 мг на 100 г сырого веса (3,75 мг-эквивалента), а количество выделенной за то же время избыточной углекислоты равняется 118 мг, которые содержат только 32 мг углерода. Таким образом ясно, что уменьшение содержания

яблочной кислоты никак нельзя отнести за счет окисления ее до CO_2 ; максимум только одна треть претворяет это превращение в углекислоту.

Проще всего объяснить это явление можно, предположив, что исчезающая яблочная кислота превращается в сахар, а получившееся в результате этого процесса повышение концентрации сахара приводит к усилению дыхания, и выделение CO_2 становится, таким образом, выше нормы, характерной для данной температуры.

Таким образом, нельзя ожидать точного стехиометрического соотношения между количеством выделенной углекислоты и количеством исчезнувшей яблочной кислоты: относительные количества их, найденные экспериментально, очень непостоянны, но во всех случаях количество углерода, выделенного в виде углекислоты, меньше, чем количество углерода, содержавшегося в исчезнувшей яблочной кислоте.

Мы видим, таким образом, что выводы, основанные на нашей гипотезе и на принципе Ле-Шателье, находят себе подтверждение в опытных данных.

м) Заключительные выводы, связанные с гипотезой восстановления

Данная гипотеза позволяет хорошо объяснить различные процессы, происходящие в листьях *Crassulaceae* при выдерживании их в темноте.

Первое время после затемнения в отрезанных листьях *Crassulaceae* имеется еще много сахаров, и так как углекислота образуется за счет продуктов гликолиза, то скорость ее выделения в этот начальный период должна быть относительно высокой. Концентрация сахара, а вместе с ней и эта начальная скорость дыхания затем быстро уменьшаются вследствие превращения сахара в яблочную кислоту. Последняя постепенно накапливается, так как скорость ее образования превышает скорость ее дальнейших превращений. Превращения эти осуществляются прежде всего путем восстановления кислоты, причем образуется оксиальдегид, подвергающийся далее полимеризации. В конечном итоге за счет яблочной кислоты образуются углеводы. Новое увеличение концентрации сахара вызывает вторичный подъем выделения углекислоты, совпадающий по времени с периодом уменьшения яблочной кислоты. Это увеличение концентрации сахара вызывает затем вторичное увеличение содержания кислоты, за которым следует третий подъем в содержании сахара и соответствующее третье повышение скорости выделения углекислоты.

Таким образом, должны происходить ритмические колебания в содержании кислоты и в скорости выделения CO_2 , причем ритм колебаний у обеих кривых не совпадает, а наоборот, направлен в противоположные стороны. Это видно, например, на кривых рис. 7. Особенно рельефно эта ритмичность выражена на рис. 11, где дана кривая скорости дыхания листьев *Crassula lactea*, со-

державшихся в темноте при постоянной температуре. Отметим, что повышение кислотности обычно сопровождается уменьшением скорости дыхания.

По мнению автора, деацидификация листьев на свету является следствием, прежде всего, высокой температуры у освещенных листьев и действия принципа Ле-Шателье, о чем была речь в предыдущем разделе. Следует здесь вспомнить о давно установленном факте [Аскенази (Askenazy, 1875)], что при освещении листья суккулентов нагреваются больше, чем обычные

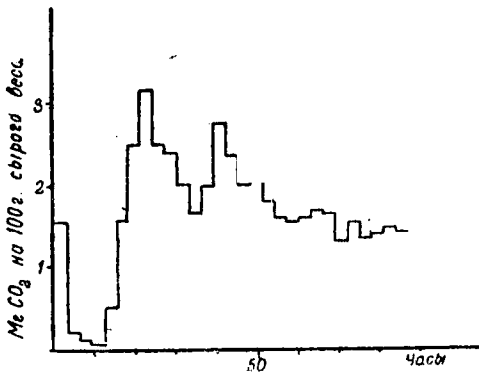


Рис. 11. Выделение углекислоты из отделенных от растения листьев *Crassula lactea*, при непрерывном затемнении при 21° С. Листья помещены в темноту в 5 час. дня, 28 мая.

тонкие листья. Например, в Германии для листьев *Sempervivum* в марте, в полдень, была зарегистрирована такая высокая температура, как 50—60° С. Это явление, стоит, повидимому, в связи с тем, что относительно низкая транспирация у растений с мясистыми листьями не в состоянии обеспечить им достаточного противодействия повышению температуры [Губер (Huber, 1932)].

В настоящее время у нас нет таких твердых данных, которые позволили бы утверждать, что свойственный *Crassulaceae* тип кислотного метаболизма является общим для всего растительного мира. Все же, хотя бы и в условной форме, мы можем высказать такое предположение по крайней мере по отношению к тем растениям, которые обнаруживают суточную периодичность в содержании кислот. В последней части будут приведены данные, которые показывают, что грибы также обладают способностью восстанавливать карбоксильные группы органических кислот.

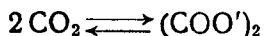
н) Гипотеза фотосинтеза Либих-Баура

Замечательная особенность реакции восстановления карбоксильной группы до альдегидной заключается в том, что она требует для своего осуществления притока энергии. Следует предположить, что эта энергия доставляется некоторой катаболической реакцией, которая связана с реакцией восстановления карбоксила.

Если принять основные положения теории, развитой нами в предыдущих разделах, то мы с новой точки зрения можем подойти к теории фотосинтеза Либиха. Взгляд Либиха, что углекислота в процессе фотосинтеза сначала превращается в щавелевую кислоту, затем в другие кислоты и, наконец, в са-

хар, был отвергнут большинством физиологов растений, главным образом на основании работ Майера и деФриза о кислотном метаболизме. На основании того факта, что органические кислоты исчезают на солнечном свете и снова появляются при затемнении листьев, они пришли к выводу, что органические кислоты не могут быть промежуточным продуктом в процессе образования сахара при фотосинтезе. Предыдущее обсуждение показало, что этот аргумент ошибочен.

Если клетка обладает механизмом сопряженных реакций, при помощи которых карбоксильные группы могут подвергаться восстановлению, то и щавелевая кислота может быть восстановлена и при определенных условиях превращена в углеводы. В связи с этим большой интерес представляет работа Шпэра и Мак Ги (Sproehg и Mc Gee, 1923), пришедших на основании своих опытов к выводу, что между дыханием и фотосинтезом существует глубокая внутренняя связь. Кроме того, Баур (Baур, 1908), показал, что при определенных условиях реакция



обратима; основываясь на этом, Баур предложил свою схему для первой стадии фотосинтеза.

Хотя в настоящее время все эти соображения носят чисто спекулятивный характер, следует, однако, иметь в виду, что первоначальные возражения против теории Либиха в значительной степени потеряли свою силу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные Вольфом и нами, позволяют утверждать, что из каждой молекулы сахара образуется не больше одной молекулы яблочной кислоты. Следовательно за счет каждой молекулы сахара, превращенного в кислоту, два атома углерода (или три, если таким сахаром является седогептоза) должны превратиться в какое-то другое вещество или вещества.

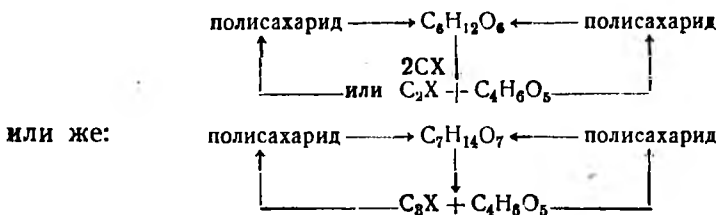
Этот углерод не появляется в форме CO_2 . В тканях *Crassulaceae* не обнаружено также и накопления других кислот, и, таким образом, эту недостачку углерода нельзя отнести за счет использования его на построение муравьиной, щавелевой, гликолевой, глиоксалевой или молочной кислот. Летучие углеродистые соединения обнаруживаются лишь в виде ничтожных следов. Отсюда следует, что исчезновение углерода нельзя объяснить за счет образования 1-С или 2-С соединений. Альдегиды и кетоны, содержащие три углеродных атома, присутствуют также лишь в виде следов, так как динитрофенилгидразин дает только очень слабый осадок с соком растений.

Вследствие этого кажется вероятным, что 1-С, 2-С' или 3-С соединения, образующиеся одновременно с яблочной кислотой из сахара за счет остаточного углерода, перестраиваются далее снова в полисахариды.

Прямые опытные данные также говорят в пользу того, что значительные количества яблочной кислоты (автор полагает, что вся кислота) превращаются в соединения иные, чем углекислота.

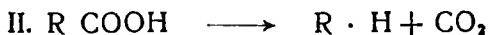
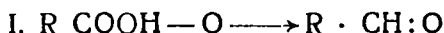
Путем исключения других веществ, которые были упомянуты выше, мы приходим к выводу, что яблочная кислота превращается в полисахариды.

Взаимоотношения между сахаром и яблочной кислотой могут быть схематически выражены в форме такого цикла реакций:



Углекислота преднамеренно исключена из этих схем реакций, так как автор и лейпцигская школа держатся различных взглядов на ее происхождение. Лейпцигская школа полагает, что углекислота происходит из оксалукусусной и пировиноградной кислот, образующихся при частичном окислении яблочной кислоты.

По причинам, которые были обстоятельно изложены выше, автор полагает, что углекислота должна происходить из какого-то промежуточного продукта при превращении сахара в яблочную кислоту и что уменьшение кислотности является следствием скорее реакции I, чем II.



Сопоставление метаболизма *Crassulaceae* с кислотным метаболизмом других растений автор считает целесообразным отложить до конца третьей части этого обзора.

ЛИТЕРАТУРА КО ВТОРОЙ ЧАСТИ

- Aberson, J. H. Die Äpfelsäure der *Crassulaceen*. Ber. d. d. chem. Ges., 31, 2, 143, 1898.
- Askenasy, E. Über die Temperatur welche Pflanzen in Sonnenlicht annehmen. Bot. Zeitung, 33, 441, 1875.
- Astruč, A. Recherches sur l'acidité végétale. Ann. Sc. Nat. Bot., Ser. 8, 17, I, 1903.
- Aubert, E. Recherches sur la respiration et l'assimilation des plantes grasses. R v. Gén. de Bot., 4, 203, 1892.
- Baur, E. Über ein Modell der Kohlensäureassimilation. Z. phys. Chem., 63, 683, 1908.
- Bendrat, M. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. VII. Zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter Pflanzen. Planta, 7, 508, 1929.
- Bennet-Clark, T. A. The metabolism of succulent plants. Ph. D. thesis. Cambridge University, 1930.

- Он же. The metabolism of succulent plants. Rep. Proc. V. Int. Bot. Cong., p. 425, 1930.
- Он же. The respiratory quotients of succulent plants. Sc. Proc. Roy. Dubl. Soc., 20, 293, 1932.
- Blackman, F. F. Analytic studies in plant respiration. III. Proc. Roy. Soc. B., 103, 491, 1928.
- Blackman, F. F. and Parija, P. Analytic studies in plant respiration, I. Proc. Roy. Soc. B., 103, 412, 1928.
- Boklund, U. Kohlensäureabspaltung der Brenztraubensäure. I. Biochem. Z., 226, 56, 1930.
- Butkewitch, W. und Fedoroff, M. W. Über die Umwandlung der Essigsäure durch *Mucor stolonifer*, u. s. w. Biochem. Z., 207, 302, 1929.
- Chrzaszcz, T. und Tiukow, D. Biochemische Umbildungen der Essigsäure durch Schimmelpilze. Biochem. Z., 229, 343, 1930.
- De Saussure, T. Recherches chimiques sur la végétation. 1804.
- De Vries, H. Über Periodicität im Säuregehalte der Fettpflanzen. Verslag. en Med. k. Ak. Wet. Amsterdam, I, 58, 1884. Also in de Vries, Op. e. Period. collata, 4, 369.
- Он же. Über Säurebildung der Fettpflanzen. Bot. Zeitung, 42, 337, 1884.
- Evans, H. The physiology of succulent plants. Biol. Reviews, 7, 181, 1932.
- Franzen, H. und Ostertag, Über Nichtexistenz der Crassulaceenäpfelsäure. Mitt. 21. Zeit. physiol. Chem., 122, 263, 1922.
- Gustafson, F. G. Diurnal changes in the activity of *Bryophyllum calycinum*. J. Gen. Physiol., 7, 719, 1925.
- Hahn, A. und Haarman, W. Über die Dehydrierung der Äpfelsäure. Zeit. f. Biol., 87, 465, 1928.
- Hahn, A., Haarman, W. und Fischbach, E. Über die Dehydrierung der Äpfelsäure. Mitt. 2. Zeit. f. Biol., 88, 587, 1929.
- Hempel, J. Buffer process in the metabolism of succulent plants. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 13, 1, 1917.
- Hibbert, H. and Anderson, C. G. The structure of sedosan. Canadian Journ. Res., 3, 306, 1930.
- Huber, B. Einige Grundfragen des Wärmehaushalts der Pflanzen. I. Ber. d. d. bot. Gesellsch., 50, 68, 1932.
- Kakesita, K. Experimental studies on the regeneration in *Bryophyllum calycinum*. Jap. Journ. Bot., 5, 219, 1930.
- Kostytschew, S. Plant Respiration. Transl. C. J. Lyon, Philadelphia 1927.
- Kraus, G. Über die Wasserverteilung der Pflanzen. Abh. naturf. Ges. zu Halle, 16, 141, 1883.
- Он же. Über Stoffwechsel bei den *Crassulaceen*. Abh. naturf. Ges. zu Halle, 16, 393, 1883.
- La Forge, F. B. and Hudson, C. S. Sedoheptose, a new sugar from *Sedum spectabile*. I. Journ. Biol. Chem. 30, 61, 1917.
- La Forge, F. B. Sedoheptose, a new sugar from *Sedum spectabile*. Journ. Biol. Chem., 42, 367, 1920.
- Lundin, H. Über die Einfluss des Sauerstoffs auf die assimilatorische Tätigkeit der Hefen. Biochem. Z., 141, 310, 1923.
- Lundsgaard, E. Über die Einwirkung der Monolodessigsäure auf die Spaltung und Oxidationsstoffwechsel. Biochem. Z., 220, 8, 1930.
- Mayer, A. Über die Sauerstoffausscheidung einiger *Crassulaceen*. Landw. Versuchsst., 21, 277, 1878.
- Он же. Neue Untersuchungen über die Crassulaceenäpfelsäure. Landw. Versuchsst., 51, 336, 1899.
- Meyerhof, O. Über den Einfluss des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe. Biochem. Z., 162, 43, 1925.
- Nathansohn, A. Der Stoffwechsel der Pflanzen. Leipzig 1910.
- Pfeffer, W. The Physiology of Plants. Transl. A. J. Ewart, Oxford 1899.
- Purjewitsch, K. Abstract in Bot. Cent. 58, 369, 1893.
- Richards, H. M. Acidity and gas interchange in Cacti. Carnegie Inst. Publ., № 209, Washington 1915.
- Romell, L. G. Über die Bedingungen des Kohlensäuretransports zu den Chloroplasten. Flora, 121, 125, 1928.

- Ruhland, W. and Wetzel, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. I. *Begonia semperflorens*. *Planta*, 1, 558, 1926.
- Они же. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. III. *Rheum hybridum*. *Planta*, 3, 765, 1927.
- Они же. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. V. *Rheum hybridum*. *Planta*, 7, 503, 1929.
- Они же. Zur Frage der Äpfelsäurebildung in *Crassulaceen*. *Planta*, 15, 567, 1931.
- Rutherford, E. Radioactive substances and their radiations. Ch. XI. Cambridge 1913.
- Schroeder, H. Die Kohlendioxidversorgung der Chloroplasten. *Flora*, 117, 270, 1924.
- Spoehr, H. A. Photochemische Vorgänge bei Entsäuren der Succulenten. *Biochem. Z.*, 57, 95, 1913.
- Spoehr, H. A. Carbohydrate economy of Cacti. *Carnegie Inst. Publ.*, Nr. 287, Washington 1919.
- Spoehr, H. A. and McGee, J. M. Studies in plant respiration and photosynthesis. *Carnegie Inst. Publ.*, Nr. 325, Washington 1923.
- Thomas, M. A. Quantitative study of the production of ethyl alcohol and acetaldehyde, etc. *Biochem. Journ.*, 19, 927, 1925.
- Toeniessen, E. und Brinkman, E. Über den oxydativen Abbau der Kohlenhydrate im Säugetiermuskul, u. s. w. *Zeit. f. physiol. Chem.*, 187, 137, 1930.
- Warburg, O. Über die Bedeutung der organischen Säuren für Lebensprozess der Pflanzen. *Unters. a. d. bot. Inst.*, Tübingen, 2, 57, 1886.
- Wetzel, K. Beiträge zur Kinetik der Carboxylasewirkung, u. s. w. *Planta*, 15, 697, 1931.
- Wolf, J. Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter *Crassulaceen* *Planta*, 15, 572, 1931.

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

КИСЛОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

а) Введение

Многие плесневые грибы образуют органические кислоты за счет тех органических веществ, на которых они растут. Классическая работа Вемера (Wehmer, 1891) установила ряд условий, управляющих процессом накопления кислот у грибов. С тех пор накопилось большая литература по этому вопросу, и по мере расширения фактических данных возникло много разнообразных гипотез о биологическом значении этого процесса. Для большинства этих гипотез характерно перенесение на плесневые грибки того же понимания процесса накопления кислот, как и для зеленых растений; большинством авторов предполагается, что химический механизм и биологическое значение накопления кислот в существенных чертах одинаковы как у грибов, так и у высших растений. Будет удобнее дать сначала в сжатом виде общие сведения о типичных особенностях плесневых грибов, прежде чем углубляться в детальную характеристику их кислотного метаболизма.

Вообще говоря, можно считать, что *Penicillia* производят главным образом лимонную и глюконовую кислоты, *Aspergilli* — глюконовую, лимонную и щавелевую, а мукооровые — янтарную, фума-

ровую и щавелевую. Но это деление нельзя считать строгим, так как отдельные виды значительно отличаются друг от друга по степени накопления этих кислот при их культурах. Природа этой изменчивости будет подробно разобрана позднее. Хорошо известно, что значительные отличия наблюдаются не только у различных видов, но и у различных рас того же самого вида.

Поведение типичных продуцирующих кислот у плесневых грибов, растущих на сахарных растворах, заключается в следующем: сахар потребляется грибами, и в присутствии необходимых питательных солей (K, Mg, N, P, S) мицелий увеличивается в весе. В то же самое время в мицелии образуются органические кислоты, постепенно диффундирующие в среду, на которой растет гриб.

В связи с этим концентрация кислоты в окружающей среде возрастает, но после того как большая часть сахара в среде уже потреблена, кислота, которая до сих пор увеличивалась в количестве, теперь начинает исчезать, она постепенно абсорбируется мицелием гриба и перерабатывается им в другие продукты. Следует иметь в виду, что образование и исчезновение кислот представляют собой процессы, происходящие внутри живого мицелия. Энзимы, причастные к этим процессам, до сих пор не удалось выделить ни из окружающей среды, ни из препаратов мицелия.¹ Вначале, когда сахара в растворе имеется еще достаточное количество, содержание кислоты в растворе с культурой и в мицелии поднимается до максимальной величины, но дальше при продолжительном голодании кислота начинает убывать, причем эта убывь идет примерно по логарифмической кривой. Кюрри (Curri), Мольтяром (Molliard) и др. было показано, что когда продуцируется несколько кислот, как, например, в случае *Aspergillus niger*, то максимальной концентрации различные кислоты достигают в различное время; первой достигает своего максимума глюконовая кислота, и лишь после того, как ее концентрация начнет снижаться, начинает накапливаться лимонная кислота; пройдя свой максимум, она теперь уступит место щавелевой кислоте, которая, в свою очередь, пройдет сначала через стадию накопления, а затем начинает убывать вплоть до полного исчезновения.

Простейшее объяснение этого явления сходно с тем, которое было уже дано раньше в связи с накоплением кислот у *Crasulaceae*. Последовательное течение реакции:

сахар → глюконовая кисл. → лимонная кисл. → щавелевая кисл. → CO₂

должно привести к накоплению до максимума, а затем к снижению концентрации сначала глюконовой кислоты, потом лимонной и лишь под самый конец — щавелевой, если величины констант скорости последовательных реакций имеют относительные значения:

$$k_1 > k_2 > k_3 > k_4.$$

¹ Глюко-оксидаза, которая превращает глюкозу в глюконовую кислоту, была изолирована из *Aspergillus niger* [Мюллер (Müller), 1928].

Очень часто при исследовании химизма плесневых грибов к культурному раствору прибавляется карбонат кальция. Его влияние на происходящий процесс заключается в том, что кислота, диффундируя из мицелия грибов в окружающий раствор, реагирует с карбонатом кальция, образуя кальциевую соль кислоты и освобождая при этом CO_2 . В этих условиях обычно получают значительно большие выходы кислот (в форме кальциевых солей), почему нужно думать, что кислота путем превращения ее в соль предохраняется от дальнейшего распада. Внешние условия оказывают глубокое воздействие на различные стороны кислотного метаболизма. На важнейших из них мы теперь специально остановимся.

1. Концентрация углекислоты и кислорода. В большинстве работ по метаболизму плесеней вообще не обращалось должного внимания на концентрацию этих газов в атмосфере над культурой гриба. Когда культуры растут в колбах, закупоренных ватой, концентрация кислорода внутри колбы становится меньше, а концентрация углекислоты соответственно больше, чем во внешнем воздухе. Очевидно, концентрация этих газов будет зависеть как от скорости дыхания грибов, так и от плотности ватной пробки. В колбе с культурой *Aspergillus niger*, туго закупоренной ватой, мы находили концентрацию кислорода равной нулю, а концентрацию углекислоты равной 25%. В таких условиях концентрации этих газов за время длительного эксперимента будут постоянно изменяться, так как они в сильной степени зависят от интенсивности дыхания грибов.

Те же самые замечания приложимы также и к методу, которым пользовались Рэйстрик (Raistrick) и его сотрудники. Они выращивали плесневые грибки в колбах, через которые можно было пропускать воздух, но, вместо непрерывного тока воздуха или другой желательной газовой смеси, они ограничивались тем, что ежедневно в течение одного часа пропускали через колбу около 500 мл воздуха, свободного от углекислоты, на остальные же 23 часа ток воздуха прерывался. Разумеется, к концу этого периода весь кислород в колбе потреблялся и замещался углекислотой. Таким образом на короткий период в течение каждого дня создавались аэробные условия, которые постепенно (на неизвестное время) заменялись условиями анаэробноза и наркоза углекислотой.

Продукты, образованные в таких условиях, отличаются от продуктов, образующихся в тех случаях, когда грибы растут в аэробных условиях. Это ясно видно из цифр табл. 12. В опытах в качестве единственного источника углерода была дана глюкоза. Количество углерода, пошедшего на образование различных продуктов, возникших при переработке глюкозы, выражено в процентах от всего углерода исчезнувшей во время опыта глюкозы.

Наиболее существенное различие заключается, как видим, в том, что в условиях, когда гриб находится в атмосфере с увеличенным содержанием углекислоты, в растворе накапливаются спирт

ТАБЛИЦА 12

Продукты, образованные *Aspergillus niger* из глюкозы в аэробных условиях и в условиях чередования анаэробных условий с аэробными (наркоз)

	Наркоз (Рэ й ст р и к, 1931)	Аэробные условия (не- опубликованные данные автора)
Углерод в мицелии	13,1	56,8
Углерод в виде углекислоты	31,4	28,4
Углерод в виде нелетучих кислот (щавелевая, лимонная и т. д.)	15,6	11,6
Углерод в виде нелетучих нейтраль- ных соединений	14,0	2,8
Углерод в виде летучих соединений (главным образом спирт)	25,5	0,9
Общий потребленный углерод (дан- ный в форме глюкозы)	100	100

и другие нейтральные соединения, такие, как глицерин и маннит. В аэробных условиях на эти соединения затрачивается совершенно незначительная доля от использованного грибами сахара. С дру-

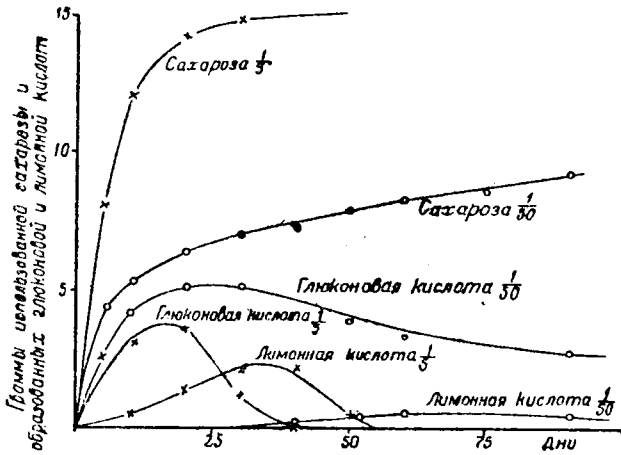


Рис. 12. Динамика сахарозы, глюконовой и лимонной кислот в культурах *Aspergillus niger*, содержащих $\frac{1}{5}$ и $\frac{1}{60}$ „нормальной“ дозировки азотистых солей (в г на 100 мг раствора). Первоначальное содержание сахарозы—15 г (Mollard, 1924).

гой стороны, в этих условиях общий вес мицелия значительно выше, что отчасти должно быть поставлено в связь с высоким содержанием гликогена. Отсутствие продукции спирта при строго аэробных условиях может быть следствием превращения спирта или некоторого его предшественника в гликоген.

Исключая случаи, когда аэробные условия создавались пропусканьем быстрой струи стерильного воздуха через колбу с культурой гриба, состав газовой смеси обычно в опытах не контролировался и не мог оставаться постоянным в течение эксперимента, так как совершенно неправильно считать, что ватная пробка якобы лишь незначительно затрудняет диффузию газов [ср. Raistrik (1931), который полагает, что в его опытах таким путем была будто бы достигнута полная аэрация]. Влияние анаэробных условий или наркоза на кислотный метаболизм еще не было надлежащим образом исследовано, но предварительные результаты показывают, что степень накопления углекислоты в окружающей среде отнюдь не безразлична для динамики превращений интересующих нас органических кислот.

2. Влияние питательных солей. Мольяр (Molliard, 1922) первый обнаружил, что *Sterigmatocystis nigra* (= *Aspergillus niger*) образует глюконовую кислоту при выращивании на культурном растворе, содержащем ненормально малые по сравнению с обычными количества азота. Некоторые из его результатов, о которых у нас будет еще речь дальше, воспроизведены графически на рис. 12. Отметим, что с уменьшением дозировки азота наблюдается увеличенное накопление глюконовой кислоты и пониженное — лимонной кислоты.

До некоторой степени сходные результаты были получены Бернгауэром (Bernhauser). Он нашел, что выходы цитрата увеличиваются с повышением содержания азота, а также с повышением температуры. Наоборот, глюконаты в этих условиях образуются в ничтожном количестве. Природа действий этих двух факторов (азот и температура) пока еще совершенно не выяснена.

б) Гипотеза Францена и Шмитта об образовании лимонной кислоты

Эта гипотеза в общих чертах была уже изложена в первой части обзора. Челленджер, Уолкер и Субраманиям (1927) присоединились к ней и считают, что процесс превращения сахара, происходящий у *Aspergillus*, идет по схеме:

сахар → глюконовая кислота → сахарная кислота → ацетондикарбоновая кислота → малоновая + уксусная кислота → гликолевая кислота → глиоксаль-вая кислота → щавелевая кислота → углекислота

Доказательства, которые можно было бы привести за или против этого взгляда, пока совершенно недостаточны и не позволяют сделать определенное заключение. Еще в 1924 г., до появления этой гипотезы в том законченном виде, как она была развита на основании работ Францена и Шмитта (1925), Буткевич (1924) выступил с решительным утверждением, что лимонная кислота образуется грибом *Aspergillus niger* не из глюконовой кислоты. Он полагал (1923, 1924), что лимонная кислота образуется из глюкозы путем предварительного окисле

ния ее в глюкуроновую кислоту, которая далее подвергается внутренней конденсации с образованием 5-углеродного кольчатого соединения, и что уже это последнее превращается в лимонную кислоту (см. первую часть).

Он показал, что расы *Aspergillus*'а, которыми он пользовался в своих опытах, производили как лимонную, так и глюконовую кислоты при культуре на растворах глюкозы, но если их выращивать на растворе глюконата кальция, то лимонная кислота не образуется. Отсюда его вывод, что накопление лимонной и глюконовой кислоты — два независимых процесса.

Однако такое заключение нельзя считать бесспорным, так как было показано, что присутствие карбоната кальция в культуре этого гриба на глюкозе сильно влияет на характер образования кислот. Это видно из следующей таблицы:

	С СаСО ₃	Без СаСО ₃
Выработано глюконовой кислоты	0,840	0,280
„ лимонной „	0,051	0,727
„ щавелевой „	0,474	0,000

Из этих данных вытекает совершенно очевидный вывод, что карбонат кальция „фиксирует“ („traps“) глюконовую и щавелевую кислоты по мере их образования. Другими словами, свободные кислоты легко превращаются грибом в другие продукты, но соли кальция не так легко поддаются его воздействию. Высокая выработка лимонной кислоты в том случае, когда глюконовая кислота не фиксируется карбонатом кальция, очевидно, может быть следствием превращения глюконовой кислоты в лимонную кислоту. Тот факт, что лимонная кислота не образуется, когда гриб растет на глюконате кальция, не противоречит этому взгляду и скорее говорит в его пользу, так как он лишь подтверждает, как сейчас было сказано, что карбонат кальция действует как „фиксатор“ глюконовой кислоты. Для обоснования точки зрения Буткевича необходимо было бы гриб выращивать на свободной глюконовой кислоте а не на ее кальциевой соли, но это не было сделано и, кажется, не сделано до сих пор.

Другие исследователи, работавшие, повидимому, с другими расами *Aspergillus niger*, получили с ними образование лимонной кислоты и при выращивании гриба на растворах глюконата кальция. Так, Челленджер с сотрудниками (1927) смогли изолировать 1,2 г лимонной кислоты и 3,7 г кальциевой соли сахарной кислоты при культуре *Aspergillus niger* в течение 5 суток на растворе, содержащем 20 г глюконата кальция. Они также показали, что тот же самый гриб накапливал небольшие количества лимонной кислоты при выращивании на растворах кислой калиевой соли сахарной кислоты. Эти факты были приняты как доказательство в пользу того, что имеют место следующие реакции:

глюконовая кислота → сахарная кислота → дикетоадипиновая кислота → лимонная кислота.

Для подтверждения того, что превращение глюкозы в лимонную кислоту действительно происходит таким путем (через первоначальную стадию ее окисления до глюконовой кислоты), было бы необходимо показать, что при выращивании гриба на глюконовой кислоте или на сахарных кислотах получается столь же значительный выход лимонной кислоты, как и при выращивании его на эквивалентном растворе глюкозы.

Результаты опытов Бернгауэра (1931) говорят, однако, за то, что на самом деле этого не происходит: действительно, при выращивании гриба на растворе кислой калиевой соли сахарной кислоты не было получено лимонной кислоты несмотря на то, что им были использованы многие производящие лимонную кислоту расы *Aspergillus niger*. Эти результаты определенно показывают, что сахарная кислота отнюдь не является промежуточным продуктом при превращении глюкозы в лимонную кислоту; но доказательств того, что и глюконовая кислота не является таким промежуточным продуктом, пока не получено.

Описываемые далее опыты, поставленные для выяснения возможности того, что глюконовая кислота образуется как промежуточный продукт на пути от глюкозы к лимонной кислоте, привели Бернгауэра (1928) к убеждению, что это действительно может иметь место. Им было показано, что скорость образования лимонной кислоты из глюконата кальция (другие условия в обоих опытах были одинаковы) были того же порядка, как и при образовании лимонной кислоты из раствора глюкозы в присутствии карбоната кальция. В этой работе, однако, в опытные растворы были внесены слишком крупные массы выросшего мицелия, почему не исключена возможность образования лимонной кислоты за счет полисахаридов, накопленных в мицелии.

С другой стороны, Бернгауэр ясно показал, что расы *Aspergillus*, которые вызывают эти превращения, неспособны образовывать лимонную кислоту за счет сахарной кислоты или ее солей. Раса *Aspergillus*, которая, согласно Челленджеру с его сотрудниками, превращала кислоту калиевую соль сахарной кислоты в лимонную кислоту, четыре года спустя потеряла эту способность, как это было обнаружено Бернгауэром, использовавшим эту старую культуру для переисследования этого вопроса. Этот факт создает затруднения для принятия гипотезы Францен-Шмитта. В то же время результаты, полученные Бернгауэром и Мольяром, трудно примирить с каким-либо другим взглядом, кроме того, что сахар превращается сначала в глюконовую кислоту, а из последней в дальнейшем образуется лимонная кислота.

в) Влияние азотистых веществ на образование глюконовой кислоты

Мольяр, первый обнаруживший образование глюконовой кислоты у плесневых грибов (1922), показал также, что количества накапливаемых грибом глюконовой и лимонной кислот

сильно зависят от количества даваемых грибу питательных солей.

Некоторые из результатов, полученных Мольяром (1924), воспроизведены в форме кривых на рис. 12 (стр. 79).

Мольяр выращивал свои культуры *Aspergillus (Sterigmato-cystis nigra)*, вероятно *Aspergillus niger* на стандартной питательной смеси состава: сахарозы — 15 г, KH_2PO_4 — 0,142 г, MgSO_4 — 0,061 г, ZnSO_4 и FeSO_4 — по 0,007 г, NH_4NO_3 — 0,534 г. Раствор доводился водой до 150 см³. Кроме этого употреблялись растворы, сходные со стандартным в других отношениях, но содержавшие $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{25}$, $\frac{1}{50}$ и так далее количества NH_4NO_3 по сравнению со стандартной смесью.

На рис. 12 отмечены в указанные по оси абсцисс моменты опыта величины найденной в это время лимонной и глюконовой кислот, а также количество потребленной сахарозы. На рисунке имеются две серии кривых: одна соответствует культуре на стандартном растворе с $\frac{1}{5}$ „нормального“ содержания азота, а другая с $\frac{1}{50}$.

Отметим, что в последнем растворе сахар потреблялся более медленно и в то же время накапливались большие количества лимонной кислоты. Примерно спустя 25 дней от начала опыта концентрация глюконовой кислоты начинает уменьшаться. Вместе с тем происходит некоторое, в общем незначительное, накопление лимонной кислоты, которая достигает своего максимума примерно к 75-му дню. В опытах с увеличенной дозой азота сахар исчезает очень быстро; концентрация глюконовой кислоты возрастает до относительно низкой максимальной величины, достигаемой примерно на 15-й день. На 35-й день исчезает вся глюконовая кислота, а концентрация лимонной кислоты, наоборот, достигает своего максимума; на 55-й день исчезает и лимонная кислота.

Отмечая далее, что питание восстановленным азотом благоприятствует образованию глюконовой и не благоприятствует образованию лимонной кислоты, Мольяр не входит в обсуждение значения этих соотношений. Мы можем, однако, отметить, что эти результаты находятся в полном согласии с гипотезой, что глюконовая кислота является промежуточным продуктом при окислении сахара до лимонной кислоты, как говорилось выше. Чтобы привести результаты Мольяра в соответствие с этой гипотезой, необходимо принять в виде предварительного условия, что константа скорости превращения глюконовой кислоты в лимонную увеличивается с повышением дозирования азота. Это, очевидно, должно привести к увеличению накопления лимонной и уменьшению накопления глюконовой кислоты.

Остановимся еще раз на результатах опытов, в которых давалась всего только $\frac{1}{50}$ доля нормального количества азота. Как показано на рис. 12, в течение первых 15 дней вес глюконовой кислоты в культуре составлял около 80% веса исчезнувшей сахарозы. Так как окисление одного моля глюкозы (180 г) должно привести к выработке 1 моля глюконовой кислоты (196 г), то, следовательно, фруктозная часть молекулы сахарозы также

превращается в глюконовую кислоту. Выработка глюконовой кислоты составляет примерно 150 молей на каждые 100 молей потребленной сахарозы.

Общий вывод, что высокие дозы азота благоприятствуют накоплению лимонной и, наоборот, не благоприятствуют накоплению глюконовой кислоты, был подтвержден Бернгауэром (1928). Его опыты проводились совершенно отличным способом. Все его культуры выращивались на растворах стандартной смеси, содержащей различные количества азотных солей, а также карбоната кальция. Опыты прекращались, и культуры анализировались на пятый день от начала опыта.

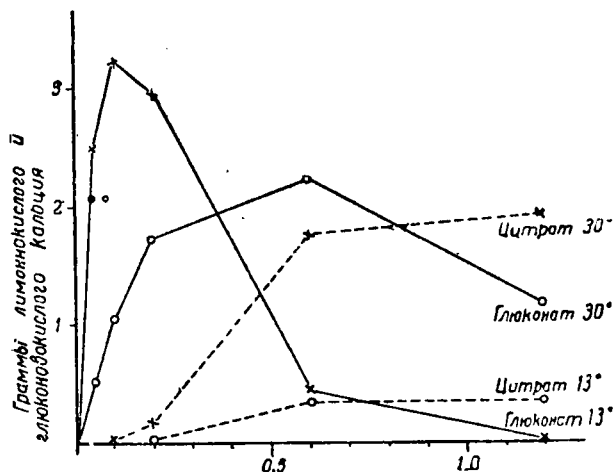


Рис. 13. Выработка лимоннокислого и глюконовокислого кальция в культурах *Aspergillus niger* за 5 суток на 50 мг раствора, содержащего 5 г сахарозы и количества азота ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), показанные на оси абсцисс (Bernhauser, 1928).

Выходы цитрата кальция и глюконата кальция показаны на рис. 13, где по оси абсцисс указана концентрация азотсодержащей соли (в данном случае $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Одна серия культур выращивалась при 13°C и другая при 30°C . Во всех случаях выработка цитрата кальция при низких температурах оказалась незначительной, а выработка глюконата кальция, наоборот, относительно высокой. При высокой температуре, в условиях повышенного снабжения азотом, выработка цитрата держится на высоком уровне, а выработка глюконата заметно падает; и наоборот, при низком снабжении азотом (0,05—0,20% фосфата аммония) выработка лимонной кислоты незначительна, а выработка глюконовой кислоты относительно весьма велика. Эти эффекты, по-видимому, не зависят от природы доставляемого азотистого соединения, так как различные нитраты и аммонийные соли все вызывали сходные изменения.

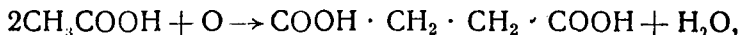
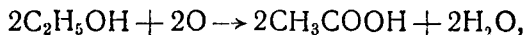
г) Превращение 2-С соединений в 4-С и 6-С соединения

Буткевич и Федоров (1929, 1930) показали, что различные виды мукоровых продуцируют янтарную и фумаровую кислоты, когда снабжаются только ацетатами или спиртом, как источником углерода. *Mucor stolonifer* при кормлении сахаром накапливает фумарат кальция в культурах, содержащих CaCO_3 . Последняя работа Буткевича и Федорова показала, что наряду с фумаровой образуется также янтарная кислота в форме Са-соли, причем на ее долю приходится около 13% от общего количества образованных кислот, а остальные — на долю фумаровой. Они вместе с тем показали, что, наоборот, образуется преимущественно янтарная кислота, а фумаровая — лишь в совершенно незначительных количествах, если вместо сахара, в качестве источника углерода, давать уксусную кислоту. Примерно 15% потребленной уксусной кислоты было превращено в этих условиях в фумаровую и янтарную кислоты после 30 дней роста культуры, причем около 81% от общего количества образованных кислот оказалось янтарной кислотой.

Довольно любопытно, что при снабжении спиртом, как единственным источником углерода, образуется почти исключительно фумаровая кислота и лишь следы янтарной (в виде кальциевой соли). Было также показано, что в культурах на янтарной кислоте, как единственном источнике углерода, образуется значительное количество шавелевой кислоты (в виде кальциевой соли) и только следы фумаровой. Далее, в присутствии сахара образовывалось много фумаровой кислоты, но мало шавелевой.

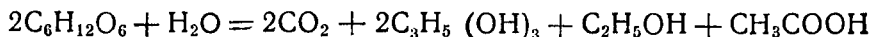
Превращение янтарной кислоты в фумаровую стоит, очевидно, в зависимости от наличия определенных продуктов гликолиза, которые могут действовать как акцепторы водорода.

В связи с этими данными было высказано предположение, что образование фумаровой и янтарной кислот из сахара в аэробных условиях идет путем следующих реакций:



Хорошо известно, что янтарная кислота в небольших количествах образуется также при анаэробных условиях в процессе алкогольного брожения, свойственного как дрожжам, так и мукоровым грибам, и Буткевич с Федоровым предполагают, что она образуется и здесь аналогичным способом.

Буткевич и Федоров высказывают предположение, что часть вовлеченного в брожение сахара реагирует, согласно схеме Нейберга, таким образом:

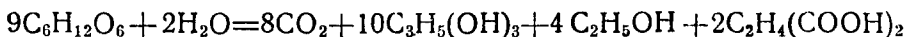


и что уксусная кислота превращается в янтарную по реакции Тунберга:



Два атома водорода (предположительно) присоединяются к молекуле метил-глиоксала с образованием молекулы глицерина. Для образования одной молекулы янтарной кислоты требуются две молекулы уксусной кислоты, из чего, в соответствии с приведенной выше реакцией Нейберга, неизбежно вытекает, что при этом расходуется четыре молекулы глюкозы. Дегидрирование уксусной кислоты до янтарной предполагает, что другая половина молекулы глюкозы воспринимает этот отщепленный водород, превращаясь в метилглиоксаль.

Поэтому в целом процесс должен быть выражен следующим образом:



Как видим, отношение числа молекул янтарной кислоты к числу молекул образованного глицерина составляет 1:5. Фактически наблюдавшиеся соотношения молярных концентраций этих веществ в культурах бродящих дрожжей и мукоровых грибов остаются замечательно постоянными в течение всего развития культуры, хотя абсолютные концентрации изменяются значительно, и таким образом отношение, требуемое гипотезой Буткевича и Федорова, приблизительно достигается. Эти авторы указывают, что их гипотеза представляет частично возвращение к старому взгляду Пастера, по которому янтарная кислота, обнаруживаемая при спиртовом брожении, образуется за счет спирта.

В настоящее время более распространено другое мнение, по которому янтарная кислота, обнаруживаемая при спиртовом брожении, образуется из глутаминовой кислоты. Возможность такого происхождения янтарной кислоты установлена Эрлихом, который показал, что выработка янтарной кислоты увеличивается при прибавлении глутаминовой кислоты к бродящей культуре дрожжей. Некоторые из результатов Эрлиха (1909) приведены в табл. 13. Замечательно, однако, что в отсутствии сахара янтарная кислота почти не образуется даже в присутствии глутаминовой кислоты.

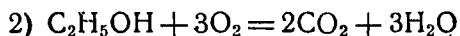
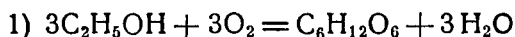
Гипотеза Буткевича находит себе хорошую опору в недавней работе Лундсгаарда (Lundsgaard, 1932). Исходным пунктом работы Лундсгаарда было наблюдение, что дрожжевая суспензия в присутствии одного спирта и при хорошем доступе кислорода обнаруживает дыхательный коэффициент около 0,33. Полное сгорание спирта до углекислоты и воды (реакция 2, см. ниже) должно было бы дать отношение $\text{CO}_2 : \text{O}_2 = 0,66$. Следовательно часть спирта окисляется до других веществ, скорее всего до углеводов (гликогена). Найденный в

ТАБЛИЦА 13

Выработка янтарной кислоты бродящими дрожжами (100 г) в воде (2000 см³) при прибавлении различных веществ

Количество сахара в граммах	Количество азотистых веществ	Выход янтарной кислоты в граммах
200	Нет	1,20
200	1 г глутаминовой кислоты	1,67
200	2 г " "	2,33
200	5 г " " + 5 г фосфата аммония	0,21
0	5 г глутаминовой кислоты	0,05
0	Нет	0,01

опыте коэффициент, равный 0,33, очевидно, является результатом того, что фактически происходит комбинирование двух указанных ниже реакций, согласно которым четверть данного количества спирта окисляется до конца, а остальные три четверти подвергаются обратному синтезу до углеводов:



Известно, что синтез гликогена в мышцах предотвращается отравлением иодуксусной кислотой. Лундсгаард показал, что дыхательный коэффициент дрожжевой суспензии в спиртовом растворе составлял около 0,33 как в нормальных дрожжах, так и в суспензии, отравленной иодуксусной кислотой. Если ресинтез гликогена в дрожжах останавливается, как и в мышцах, в присутствии иодуксусной кислоты, то низкий дыхательный коэффициент, возможно, зависит здесь от того, что спирт окисляется не до углеводов, а до каких-то других продуктов. Действительно, опыт показал, что дрожжевая суспензия в присутствии одного только спирта вырабатывает, наряду с углеводами, также и органические кислоты и что при отравлении иодуксусной кислотой ресинтез углеводов во всяком случае не имеет места.

Значительная часть окисленного спирта превращается в органические кислоты. Количество кислорода, потребленного при превращении спирта в углекислоту и углеводы, может быть вычислено, и разница между этим количеством и общим количеством поглощенного кислорода дает величину кислорода, затраченного на образование кислот.

Количество кислорода, необходимого для окисления спирта в уксусную кислоту, составляет одну молекулу на молекулу спирта; для образования одной молекулы янтарной кислоты надо 1,25 молекулы кислорода, яблочной или фумаровой кислоты — 1,5 молекулы, и, наконец, для образования гликолевой кислоты — 2,0 молекулы кислорода на молекулу окисленного спирта. В опыте фактически было поглощено 1,36 и 1,48 молекулы кислорода на

ТАБЛИЦА 14

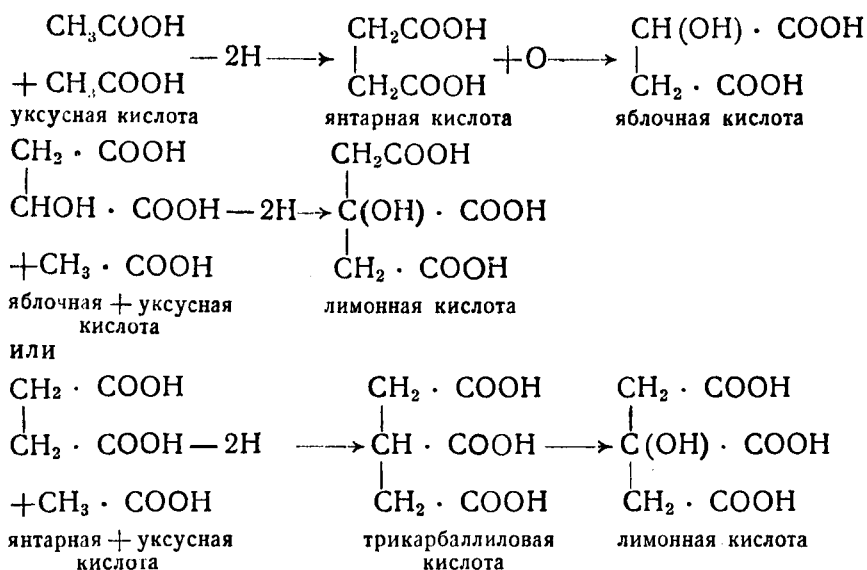
Метаболические продукты, образованные дрожжевой суспензией
(30 мг дрожжей + 1,5 см³ фосфатного буфера + спирт)

	Отравлен- ная иодук- сусной ки- слотой (0,001 моля)	Нормаль- ная
Дыхательный коэффициент	0,34	0,33
Потреблено кислорода в течение 3 часов в мм ³	405	702
Выделено углекислоты в течение 3 часов в мм ³	131	244
Образовано растворимых в эфире кислот в мг-эквива- лентах	4,6	4,6
Потреблено спирта в мг на 100 см ³ в суспензии	31,0	56,0
Полностью окислено спирта (на 100 см ³), вычислено по выделению углекислоты	9,5	17,1
Превращено спирта в растворимые в эфире кислоты (на 100 см ³); вычислено по количеству образован- ных кислот, исходя из предположения, что из одного моля спирта образуется один эквивалент кислоты	21,1	21,1
Окислено спирта до углеводов (на 100 мл) — получено по разности	0,4	16,8
Потребовалось молекул O ₂ для превращения 1 моля спирта в 1 эквивалент кислоты	1,36	1,48

молекулу спирта. Весьма вероятно, поэтому, что образованные кислоты представляют собой смесь только что упомянутых 4-С кислот. Хорошо известно, что как янтарная, так и яблочная кислоты образуются при нормальном брожении (Костычев и Фрей, 1925). Данная работа, в согласии с взглядами Буткевича и Федорова, приводит к мысли, что эти кислоты образуются скорее из углеводов, а не из белков, как полагали Костычев и Фрей (1925), опираясь главным образом на работу Эрлиха. Довольно существенное значение имеет тот факт, что спирт в дрожжах, отравленных иодуксусной кислотой, превращается в эти кислоты, а не в углеводы, так как это приводит к предположению, что происходящая здесь реакция идет прямо от спирта к кислотам, а не через посредство углеводов: спирт → 4-С кислоты, а не: спирт → углеводы → 4-С кислоты.

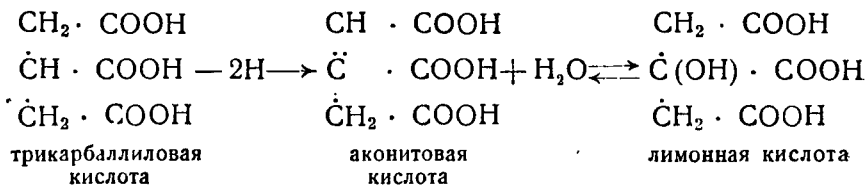
Совершенно так же, как для мукоров и дрожжей было показано, что они превращают 2-С соединения в 4-С кислоты, недавно было установлено, что и *Penicillium* (Chrzaszcz u Tiukow, 1930) и *Aspergillus* (Bernhauer u Siebenäuger, 1931) превра-

щают 2-С соединения в лимонную кислоту. Хронш и Тиуков (Chrzaszcz и Tiukow, 1930), которые первыми обнаружили у некоторых видов *Penicillium* способность к превращению ацетатов в цитраты, считают, что здесь в основе лежит реакция Тунберга. Общую схему реакций они представляют таким образом:



Сначала было невозможно решить, что является более вероятным — непосредственное ли образование лимонной кислоты из яблочной и уксусной путем прямого реагирования их друг с другом, или же такой ход процесса, при котором сначала образуется трикарбаллиловая кислота, которая затем уже подвергается окислению. Совсем недавно Бернгауэр и Бокль (Bernhauser и Bockl, 1932) показали, что в опытах с аспергиллом образуется равновесная смесь аконитовой и лимонной кислот, подобная той равновесной системе фумаровой и яблочной кислот, которая катализируется фумаразой.

Это наводит на мысль, хотя и не имеющую пока прямых доказательств, что возможен и такой ход реакций:

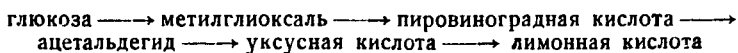


Возможна и другая альтернатива, что фумаровая и уксусная кислоты, посредством реакции Тунберга, непосредственно дают начало аконитовой кислоте.

Выходы лимонной кислоты из ацетатов и спирта достигают примерно того же размера, как и выходы 4-С кислот у мукоров и дрожжей. Согласно данным Хжоншча и Тиукова (1930, 1931), различные виды *Penicillium* широко различаются по их способности образовывать лимонную кислоту при культуре на веществах, содержащих два атома углерода. Сходные результаты были получены Бернгауэром и Зибенэугером, работавшими с *Aspergillus niger*: из исследованных двадцати восьми различных рас только восемь продуцировали лимонную кислоту за счет уксусной.

Максимальные выходы лимонной кислоты достигали до 16% потребленной уксусной кислоты, при этом около 30—40% уксусной кислоты превращалось в щавелевую. Заслуживает внимания тот факт, что наиболее активно производящие лимонную кислоту расы при снабжении их яблочной или янтарной кислотой образовывали только следы лимонной кислоты, а при снабжении их фумаровой кислотой выработка лимонной кислоты составляла только 3%.

С другой стороны, работа Лундсгаарда заставляет считать не вероятным, чтобы углеводы могли быть промежуточным продуктом при превращении спирта или уксусной кислоты в лимонную кислоту. Только что упомянутые авторы сходятся на том, что процесс образования лимонной кислоты из сахаров совершается путем таких последовательных превращений:

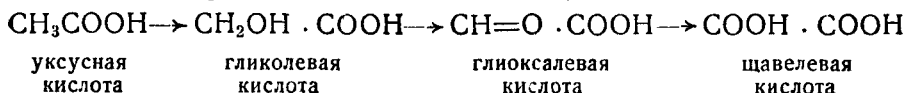


д) Превращение 2-С соединений в щавелевую кислоту

Аспергил и многие другие плесневые грибы продуцируют в значительных количествах щавелевую кислоту при выращивании их на различных органических субстратах. Значительные количества ее образуются при снабжении гриба углеводами и белками, но замечательно, что из более простых углеродистых соединений, которые вообще усваиваются грибами, лишь очень немногие могут превращаться в щавелевую кислоту. Рэйстрик и Кларк (1919) нашли, что *Aspergillus niger* способен развиваться (в присутствии необходимых питательных солей) на следующих кислотах: янтарной, фумаровой, малеиновой, яблочной, винной, молочной, пировиноградной, малоновой, уксусной, гликолевой, глиоксалевой и муравьиной. Щавелевая кислота образуется в заметных количествах (выработка около 30—40% от максимально возможной) при культуре гриба на растворах янтарной, фумаровой, яблочной или уксусной кислот, но совсем не образуется или образуется только в виде очень небольших следов, когда гриб снабжается какой-либо другой из указанных кислот.

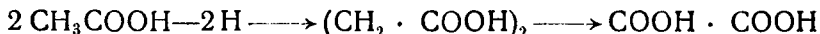
Особенно поражает тот факт, что 3-С кислоты, а также гликолевая и глиоксалева кислоты, не превращаются в щавелевую кислоту. Рэйстрик и Кларк (Raistrick и Clark)

не обратили внимания на то, что из этого факта вытекает невозможность прямого окисления уксусной кислоты до щавелевой. В самом деле, такое превращение могло бы происходить только следующим образом:

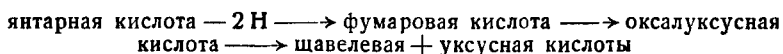


Однако их наблюдения исключают возможность того, что последней стадией при образовании щавелевой кислоты является окислительная реакция, так как в этом случае глиоксалева кислота неизбежно должна бы быть промежуточным продуктом; но в таком случае гриб должен был бы обладать способностью превращать непосредственно глиоксалевою кислоту в щавелевую, однако опыт показывает, что этого не происходит.

Эти результаты были подтверждены Бернгауэром и Шеуэром (Bernhauer и Scheuer, 1932), которые показали, что три расы *Aspergillus niger*, способные вырабатывать до 40% щавелевой кислоты за счет уксусной, не образуют совсем щавелевой кислоты при снабжении их гликолевой кислотой. Лимонная кислота образуется из гликолевой, а из янтарной кислоты вырабатывались и лимонная и щавелевая кислоты. Эти результаты в связи с данными Рэйстрика и Кларка показывают, что превращение уксусной кислоты в щавелевую происходит, видимо, по следующей схеме:



Что же касается превращения янтарной кислоты в щавелевую, то оно, можно полагать, происходит таким образом:



О последней реакции, „кислотном расщеплении“ оксалукусной кислоты, мы уже говорили в первой части статьи. Этот взгляд на происхождение щавелевой кислоты имеет то преимущество, что он легко объясняет, почему из всей группы кислот, исследованных Рэйстриком и Кларком, только уксусная, янтарная, фумаровая и яблочная дают начало щавелевой кислоте. Эти результаты оправдывают вывод, что 2-С соединения вообще не окисляются (*Aspergillus niger*) до щавелевой кислоты и, следовательно, не окисляются до углекислоты. Они подвергаются обратному синтезу до 4-С соединений. Судьба гликолевой и глиоксалевой кислот будет более детально разобрана в одном из последующих разделов. А сейчас приходится, в заключение, сказать, что пока нет прямых доказательств того, что щавелевая кислота может возникать в организме путем окисления других 2-С соединений, так как даже в тех случаях, которые как будто говорят о происхождении щавелевой кислоты за счет 2-С соединений, все же невозможно доказать, что здесь не было предварительного превращения их в более сложные соединения.

е) Максимальные выходы кислот, полученные в культурах грибов, и их значение для оценки различных теорий

Выработка кислоты грибом, растущим на сахаре в присутствии углекислого кальция, значительно выше, чем без него, так как свободные кислоты, реагируя с углекислым кальцием, образуют кальциевые соли, которые мало доступны дальнейшим превращениям, тогда как свободные кислоты способны относительно легко превращаться в другие вещества.

Если принять, что процесс расщепления сахаров идет по схеме реакций Нейберга и получающиеся при этом 2-С соединения превращаются далее в 4-С кислоты, а также в лимонную или в щавелевую кислоту, то отсюда неизбежно следует, что на построение органических кислот в этом случае может быть затрачено самое большее две трети сахара, а одна треть должна выделяться в виде CO_2 . Но если обнаруженные в опыте фактически

ТАБЛИЦА 15

Максимальные выходы некоторых кислот, образованных плесневыми грибами в присутствии CaCO_3

[Цифры обозначают весовые количества (в граммах) образованной кислоты на 100 г потребленного сахара]

Кислота	Наблюдавшаяся выработка	Максимальная выработка, возможная на основании реакций Нейберга	Автор
Лимонная кислота	73,6	75,0	Bernhauer, Böckl и Siebenäuger ¹
	67,8	—	
	74,3	—	
	68,8	—	
	68,2	—	
Фумаровая кислота	85,5	—	Butkewitch (1923) Wehmer (1918)
	63,0	64,5	
Щавелевая кислота	59,0	—	Molliard (1924) Bernhauer (1928) May, Harrick Thom и Church (1927)
	81,0	100	
Глюконовая кислота	81,0	72,6 ²	
	69,0	—	
	54,0	—	

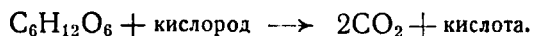
¹ Вычисляя „потребленный сахар“, эти авторы вычитали вес мицелия из фактического расхода сахара, чтобы получить количество сахара, превращенного в кислоту.

² 109,0, если 1 моль сахара даст 1 моль кислоты.

выходы кислот окажутся выше этой нормы, вытекающей из схемы Нейберга, то придется подобный взгляд на способ образования кислот подвергнуть пересмотру.

Отметим, что приведенные здесь выходы кислот удивительно близко подходят к максимальной норме, предугадываемой реакциями Нейберга, как первой стадией расщепления сахара. Данные Буткевича о выработке грибом *Aspergillus niger* лимонной кислоты в количестве 85,5% обычно приводятся как доказательства против гипотезы Хжоншча—Тиюкова об образовании лимонной кислоты. Однако это единственный зарегистрированный в литературе случай такой высокой выработки лимонной кислоты. Высокие выходы глюконовой кислоты, отмечаемые Мольтяром, быть может, действительно говорят за то, что эта кислота образуется путем прямого окисления глюкозы, что во всяком случае будет более вероятно, чем вывод ее сложным путем через 2-С соединения. Это подтверждается также фактом широкого распространения глюкооксидазы Мюллера (Müller, 1928), которая превращает глюкозу в глюконовую кислоту.

В самой общей форме уравнение, которое служит для учета максимального выхода кислоты, основывается на гипотезе, что кислоты образуются из спирта или уксусной кислоты, т. е. через нейберговские реакции, и может быть сведено к следующему:



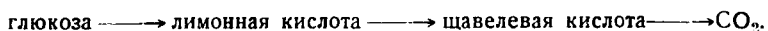
Можно сказать с уверенностью, что некоторая часть сахара, помимо образования CO_2 и органических кислот, превращается еще и в другие вещества, как, например, вещества самого мицелия, а также гликоген, а потому очень высокие выходы кислот, указанные в табл. 15, привлекают к себе особое внимание.¹ Они, правда, не могут служить доказательством против гипотезы об образовании кислот через 2-С соединения, но крайне желательно провести полный учет всего углерода, который дается грибу в форме сахаров и углекислого кальция в условиях, благоприятствующих таким высоким выходам.

ж) Судьба органических кислот в культурах грибов

Из работ Кюрри (1927), Вемера (1891, 1907), Бернгауэра (1928), Мольтяра (1924) и др. хорошо известно, что органические кислоты, образованные плесневыми грибами, сначала накапливаются в растворе с культурой до максимальных концентраций, а затем исчезают. Это обстоятельство послужило источником старого представления, что кислоты являются промежуточными продуктами окисления сахаров до углекислоты и воды при дыхании. Этот взгляд ясно выражен у Кюрри (1927),

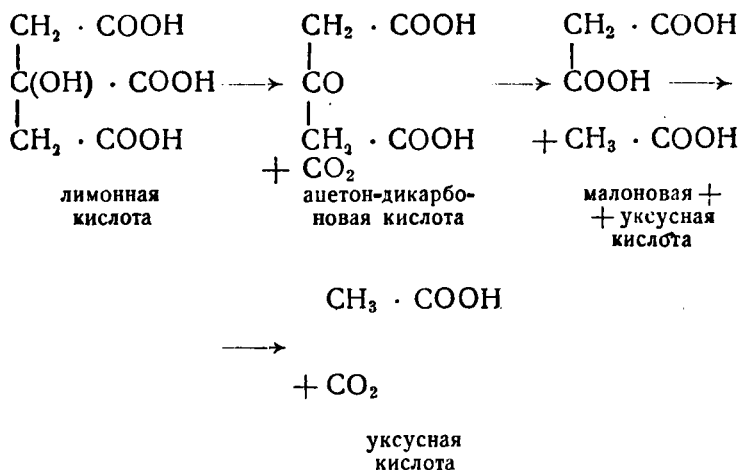
¹ Бернгауэр, Бокль и Зибенэугер в своих вычислениях принимали в расчет образование из сахаров запасных веществ внутри тела мицелия.

а также у Хжоншча и Тиукова (1930), которые дают „уравнение дыхания“ в такой форме:



Этот взгляд дает рациональное истолкование причины накопления кислот и значения их образования. Кроме того, он позволяет объяснить тот факт, что максимум накопления глюконовой кислоты достигается раньше всего, за ним следует максимум лимонной кислоты, который, в свою очередь, сменяется наступлением максимума концентрации щавелевой кислоты.

Последние стадии этого процесса, можно предполагать [Challengenger и др. (1927), Walker и др. (1927)], протекают следующим образом:



При этом образованная таким путем уксусная кислота окисляется далее через гликолевую и глиоксальевую кислоты до щавелевой кислоты, которая в свою очередь окисляется до CO_2 и воды. Единственное доказательство в пользу этого взгляда (не считая его приемлемости с чисто химической точки зрения) содержится только в двух статьях Челленджера и его сотрудников (1927). Они обнаружили ацетон-дикарбоновую кислоту в культурах *Aspergillus niger* на цитрате аммония посредством своей реакции с хлористым диазобензолом (см. часть первую), причем получается мезоксаль-альдегид-бис-фенилгидразон. Они получили 1,3 г этого соединения из культуры гриба на 20 г цитрата аммония + 4 г лимонной кислоты. Культура, снабженная 30 г лимонной кислоты, выработала 3,4 г малоновой кислоты.

Очевидно, эти реакции действительно могут иметь место, но обнаружение следов этих продуктов в культурах еще не может служить доказательством того, что разложение лимонной кислоты в основной ее массе идет по этому пути. Взгляды, которые при-

нимаются в настоящее время большинством исследователей относительно места, занимаемого лимонной и другими кислотами в метаболизме грибов, хорошо подытожены Бернгауэром и Зибенэугером (1931). О них дает представление схема реакций в табл. 16.

Необходимо дать некоторые пояснения к этой таблице. Окисление по типу I начинается с реакций Нейберга, за которыми далее следует синтез 4-С из 2-С соединений. Второй тип окислений включает в себя такие специальные окисления, как образование глюконовой кислоты и других соединений, настолько близких по своему строению к глюкозе, что представляется весьма вероятным их прямое образование из глюкозы. О прямом превращении уксусной кислоты в щавелевую через гликолевую у нас уже была речь раньше. Следует считать, что такой путь превращения или совсем не имеет места или же может иметь отношение лишь к ничтожной доле уксусной кислоты, которая у большинства (если не у всех) плесневых грибов легко превращается в другие вещества. Отметим, что гипотеза Челленджера о судьбе лимонной кислоты принимается также Бернгауэром. Различные кислоты, по их предположению, проходят через такой цикл реакций, который, по нашему мнению, не в состоянии дать удовлетворительного объяснения для тех максимумов, какие обнаруживаются в их концентрации в различные периоды. Эти последовательные превращения кислот вряд ли имеют какое-либо биологическое значение, хотя Хжоншчи и Тиуков (1929, 1930) предполагают, что лимонная кислота накапливается в культурах *Penicillium* в качестве запасного продукта взамен крахмала.

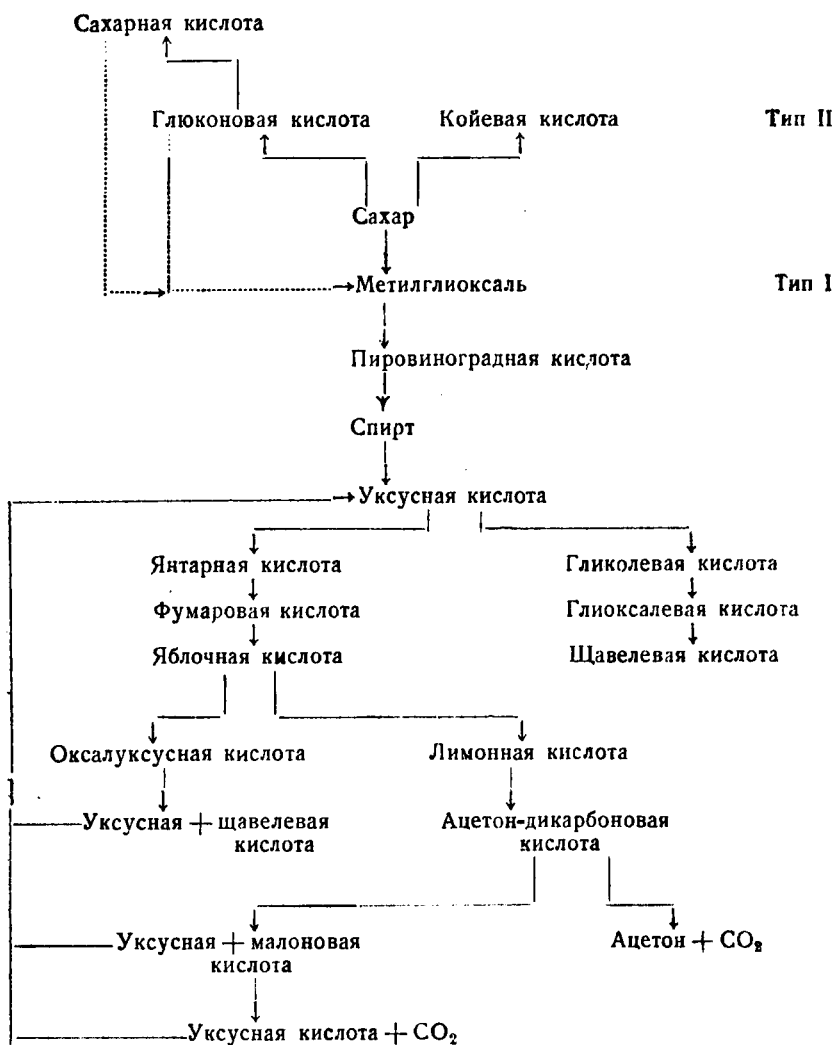
Возможна прямая проверка опытом действительности некоторых из реакций, указанных в табл. 16. Отметим, что за счет кислот образуются согласно этой схеме или новые кислоты или CO_2 и только в отдельных случаях — ацетон, альдегид и спирт. Кроме того, вся образующаяся углекислота отщепляется из карбоксильных групп кислот. Таким образом чистая убыль титруемой кислотности является результатом отщепления карбоксильных групп по реакции $\text{R} \cdot \text{COOH} \rightarrow \text{RH} + \text{CO}_2$.

Поэтому исчезновение каждого эквивалента титруемой кислоты из культуры должно быть связано с образованием по крайней мере одной молекулы CO_2 , если схема реакций, представленная в табл. 16, действительно имеет реальное значение.

Автор выражает благодарность г. Ля-Туш за любезное разрешение опубликовать некоторые из результатов нашей общей работы, предпринятой для проверки этого вопроса. Можно сразу сказать, что результаты нашего исследования прямо противоположны тем воззрениям на судьбу кислот, которые нашли себе выражение в схеме табл. 16. Они показывают, что исчезновение ряда кислот, какие только были исследованы — лимонной, яблочной, гликолевой и щавелевой — не сопровождается дополнительным выделением CO_2 , как это требуется теорией декарбоксилизации.

ТАБЛИЦА 16

Взаимоотношения продуктов метаболизма грибов
(Bernhauer и Siebenäuger)



Методика наших опытов сходна с методикой, применявшейся Косинским (1927). Непрерывный учет скорости выделения CO₂ из культуры *Aspergillus niger*, который выращивался на питательном растворе, содержащем сахар, производился при помощи метода Пфедфера-Петтенкофера. Питательный раствор затем сливался и заменялся дистиллированной водой при стерильных условиях. При этом, как показал Косинский, произ-

ходит сначала снижение скорости выделения CO_2 , идущее примерно по логарифмической кривой, но затем скорость, дойдя до некоторой низшей величины, удерживается на ней в течение нескольких дней, вероятно за счет углеродистых запасов, содержащихся в мицелии. Наша работа показывает, что запасы гликогена медленно уменьшаются в течение этой фазы дыхания, связанной с периодом „голодания“. Источником этого продолжаю-

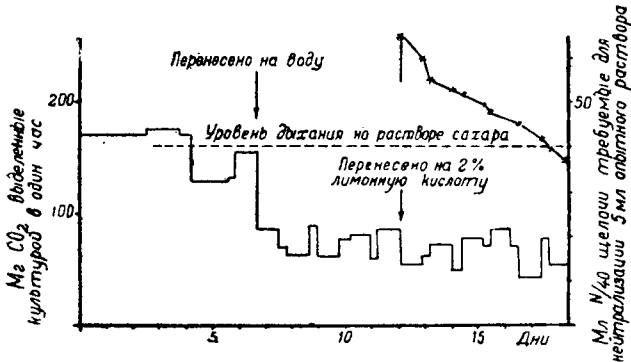


Рис. 14. Изменение в скорости выделения углекислоты культурой *Aspergillus niger* при переносе гриба с питательного раствора (5% глюкоза + питательный раствор Чапека) на воду (первая стрелка) и затем на лимонную кислоту приблизительно 2% концентрации (вторая стрелка). Изменения в титруемой кислотности в период, когда гриб находился на растворе лимонной кислоты, выражены $\times - \times - \times$ кривой (Venet-Clark и La-Touche, неопубликованная работа).

щегося непрерывно выделения углекислоты вероятно является гликоген, постепенно расщепляющийся на сахар:



а постоянная скорость определяется в своей величине скоростью гидролиза гликогена. Если повысить концентрацию сахара путем его добавления, то скорость выделения CO_2 возрастает. Дистиллированная вода затем сливается, а вместо нее вводится раствор лимонной кислоты (в других опытах — другие кислоты).

Графики типичного опыта подобного рода представлены на рис. 14, и мы видим, что прибавление лимонной кислоты не оказывает какого-либо влияния на скорость выделения углекислоты.

Отсюда вытекает, что вся выделяющаяся углекислота, даже после того как культура гриба была перенесена на лимонную кислоту, образуется из гликогена, как показано выше, а отнюдь не за счет прибавленной кислоты. Далее обнаружено, что прибавленная лимонная кислота сначала исчезает очень быстро, хотя и с постепенно уменьшающейся скоростью. Скорость исчезновения лимонной кислоты в случае этого специального опыта

показана на рис. 15. Она выражена в миллиграммах углерода, исчезнувшего в форме лимонной кислоты в час. Количество имеющ йся в данный момент лимонной кислоты определялось титрованием едким натром. Было установлено, что исчезновение лимонной кислоты не связано с накоплением других кислот в растворе с культурой. Определения лимонной кислоты прямым титрованием достаточно близко сходились с определением ее

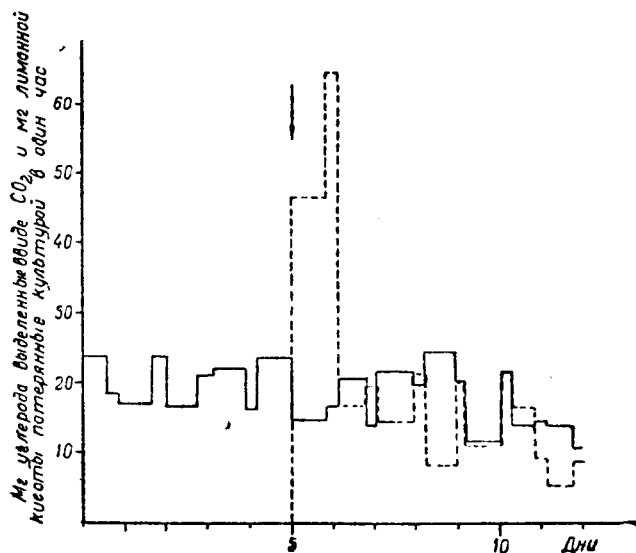


Рис. 15. Скорость, с которой происходит потеря углерода из культуры гриба, находившегося сначала на одной воде, а затем перенесенного на (приблизительно) двухпроцентный раствор лимонной кислоты. Потеря углерода в форме лимонной кислоты показана пунктирной линией, а в форме CO₂ — непрерывной. Стрелка показывает время прибавления лимонной кислоты.

по пентабромацетону, а также хорошо согласовались с данными по учету, в растворе с культурой, содержания углерода, каковое определялось по методу мокрого сжигания Биркиншоу и Рэйстрика (Birkinshaw и Raistrick, 1931).

На рис. 15 показана скорость исчезновения углерода лимонной кислоты, а также скорость выделения углерода в виде углекислоты. Отметим, что перевод культуры „голодающего“ гриба на лимонную кислоту не только не увеличивает скорости потери углерода (в виде CO₂), но общая потеря углерода в виде CO₂ за первые 48 часов составляет меньше половины потери углерода в форме лимонной кислоты.*

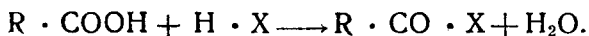
Этот результат с несомненностью говорит за то, что уменьшение титруемой кислотности не может осуществляться путем

декарбоксилизации лимонной кислоты или какой-нибудь другой кислоты, образованной из нее гидролизом или расщеплением.

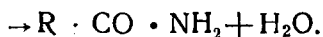
Схема реакций, предложенная Бернгауэром и Зибенэу-гером, приводит к выводу, что постепенно весь углерод лимонной кислоты удаляется в виде углекислоты. Несомненно, что этого на самом деле не происходит, так как потеря углерода в форме лимонной кислоты значительно превышает потерю углерода в форме CO_2 . Можно даже высказать предположение, что вся выделенная CO_2 образуется за счет запасного гликогена в грибе, так как результаты показывают, что скорость выделения углекислоты остается одинаковой как при отсутствии других источников углерода, так и в том случае, когда культура переводится на лимонную кислоту. Но даже если и не принимать такого предположения, то все же общая потеря углерода в форме CO_2 слишком мала, чтобы ею, согласно схеме табл. 16, объяснять уменьшение титруемой кислотности.

Уменьшение титруемой органической кислоты может происходить в результате следующих реакций.

1. Образование эфиров или ангидридов:



2. Образование амидов: $\text{R} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_3 \longrightarrow$



3. Образование солей: $\text{R} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_4\text{OH} \longrightarrow$



4. Декарбоксилизация: $\text{R} \cdot \text{COOH} \longrightarrow \text{R} \cdot \text{H} + \text{CO}_2.$

5. Восстановление до альдегидов: $\text{R} \cdot \text{COOH} + 2\text{H} \longrightarrow$



Быстро гидролизующиеся эфиры или ангидриды не присутствуют в грибах в достаточных количествах, поэтому первая реакция не может иметь реального значения. Реакции 2 и 3 также не могут служить основанием для объяснения исчезновения кислоты, так как ни раствор ни мицелий не содержат заметных количеств амидов или солей лимонной или других органических кислот. Кроме того, общее содержание азота в грибе большей частью очень незначительно. Реакция 4, которая обычно выдвигается в качестве универсальной причины для объяснения исчезновения лимонной и других кислот, не может считаться таковой, так как мы теперь убедились, что не наблюдается избыточного выделения углекислоты в течение той фазы опыта, когда исчезает кислота. Следовательно остается только реакция 5, как единственно возможная альтернатива. Есть основание предполагать, что такое восстановление до альдегидов действительно

происходит, так как хорошо известно, что содержание гликогена увеличивается в тех случаях, когда мицелий гриба вынужден пользоваться органическими кислотами в качестве единственного источника углерода.

Исследователи обмена веществ у грибов не занимались специально изучением химической природы этого процесса (восстановления кислот), но можно предполагать, что он осуществляется при помощи следующих реакций.

1. Лимонная или яблочная кислота \longrightarrow оксалукусная кислота \longrightarrow альдегид $+ 2\text{CO}_2$.

2. Альдегид $+ \text{кислород} \longrightarrow$ углевод.

На возможность такого хода реакций у суккулентных растений было указано Вольфом (1931).

Поскольку прямые опыты показали, что исчезновение кислоты не сопровождается выделением CO_2 , приходится отвергнуть первое объяснение, как менее вероятное по сравнению со вторым, согласно которому кислота восстанавливается до окси-альдегида, который затем превращается в углеводы путем полимеризации или каким-либо другим сходным путем.

Мы также показали, что исчезновение различных других органических кислот из культуры гриба не связано с избыточной продукцией углекислоты. Среди них заслуживает интереса гиколовая кислота. Наши результаты находятся в согласии с данными Рэйстрик и Кларка (1919), а также Бернгауэра и Шейера (1932) в том пункте, что мы не нашли щавелевой кислоты в культурах на гликолевой кислоте. Тем не менее наблюдалось быстрое исчезновение гликолевой кислоты (определенное титрованием), из чего следует заключить, что она должна превращаться в метиловый или этиловый спирт, муравьиный или уксусный альдегид, гликолевый альдегид или глиоксаль. Прямые анализы показали, что летучие углеродистые соединения (помимо CO_2) образуются в совершенно ничтожном количестве по сравнению с количеством исчезающей гликолевой кислоты, и этот факт, в связи с тем, что исчезновение кислоты не сопровождается избыточным выделением углекислоты, определенно говорит за то, что кислота либо превращается в гликолевый альдегид или глиоксаль, либо посредством гунберговской реакции синтезируется в высшую кислоту типа, например, яблочной, которая затем уже восстанавливается до альдегида. Однако обнаружить наличие таких окси-альдегидов не удается, и отсюда следует весьма вероятное предположение, что они, образуясь, немедленно превращаются в углеводы. Пока еще не удалось получить прямых доказательств того, что действительно происходит образование гликогена или какого-либо другого углевода за счет исчезающей кислоты. Это и неудивительно, так как увеличение содержания гликогена, какого можно было бы ожидать на основании наблюденных размеров уменьшения кислоты, должно было бы составлять только совершенно незначительный процент

от общего содержания гликогена и притом того же порядка, как и возможные ошибки в средней пробе и при анализах.

В заключение не мешает отметить, что имеющиеся опытные данные отнюдь не обязывают нас утверждать, что лимонная кислота, например, восстанавливается обязательно до своего собственного альдегида. Она может сначала гидролизиться, образуя яблочную и гликолевую кислоты, и уже эти последние могут быть восстановлены до соответствующих альдегидов.

Нам уже приходилось несколько раньше (1930) высказывать такого же характера соображения относительно судьбы органических кислот в суккулентных растениях и притом на основе до некоторой степени сходных доказательств.

з) Заключительные соображения по разделу

Общая совокупность опытных данных всего больше располагает к принятию взгляда, что распад сахара следует по реакциям, установленным Нейбергом для дрожжей и плесневых грибов, и что возникающие при этом 2-С соединения ресинтезируются затем в 4-С кислоты и лимонную кислоту. Этот ресинтез несомненно имеет место. Отметим, однако, что Рэйстрик и его сотрудники, совсем недавно, в 1931 г., подводя итоги своим исследованиям, формулировали свой взгляд на метаболизм сахара в плесневых грибах в следующих словах: „Первой стадией (распада глюкозы) является реакция Канницаро, которая ведет к образованию из двух молекул глюкозы одной молекулы маннита и одной молекулы глюконовой кислоты. А затем, в зависимости от того, идет ли развитие гриба лучше на кислой или нейтральной среде, будет происходить распад или маннита, или глюконовой кислоты (а в некоторых случаях обоих веществ). Можно представить много доказательств в пользу этого взгляда“. Эти доказательства, однако, не были представлены. Указывалось, правда, на то, что белые *Aspergilli*, создавая нейтральную реакцию в культурной среде, вместе с тем накапливают маннит, максимальная выработка которого, согласно требованиям этой теории, никогда не превышает 50% от потребленной глюкозы.

Однако, с другой стороны, выработка глюконовой кислоты, наблюдаемая в культурах окрашенных *Aspergilli* и *Penicillia*, часто значительно превышает 50%. Это не принимается авторами во внимание, а также не дается никаких объяснений относительно больших выходов кислот. Далее, авторы, хотя и отмечают затруднение для своей теории, происходящее из того факта, что при редукации глюкозы образуется сорбит, а не маннит, однако опять-таки не дают никаких объяснений этому факту.

Последовательный ход образования органических кислот, соответственно взглядам Хжоншча, Тиукова и Бернгауэра, представлен в схеме I. Автор на основании своих соображений, детально изложенных в последнем разделе, считает более вероятной схему II, которая в то же время имеет много аналогий с первой схемой.

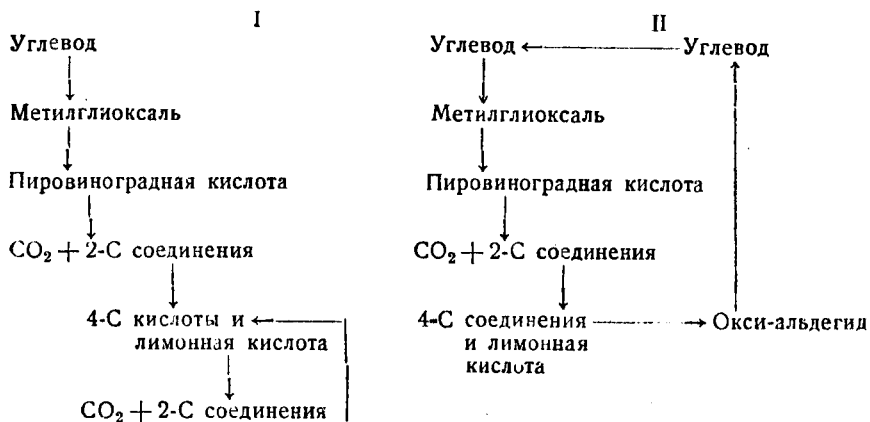
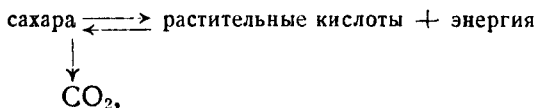


Схема I не в состоянии объяснить ни накопления ни последующего исчезновения лимонной кислоты, тогда как для второй схемы здесь нет никаких затруднений, если только предположить, что скорость образования превышает скорость обратного превращения кислоты. Эти взгляды, основанные на реакциях Нейберга, не в состоянии разъяснить химизма образования глюконовой и щавелевой кислот, а также того своеобразного эффекта, который оказывают азотистые соединения на продукцию аспергиллом лимонной и глюконовой кислот, и таким образом хотя они и могут рассматриваться как полезная рабочая гипотеза для руководства в дальнейших исследованиях, все же они представляют собой не больше как первый подход к выяснению роли, которую растительные кислоты играют в обмене веществ у грибов.

С другой стороны, схема II, которую вкратце можно выразить в следующей форме:



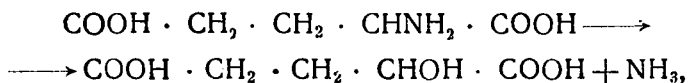
требует очень больших изменений энергии, причем остаются совершенно невыясненными как энергетическая сторона процесса ресинтеза углеводов из кислоты, так и вообще внутренний смысл всех этих превращений. Следует подчеркнуть, что необходимо было бы иметь совершенно бесспорные доказательства в пользу того, что действительно происходят такие замечательные изменения, как превращение растительных кислот в углеводы. Фактические данные говорят за то, что в таких различных группах, как плесневые грибы и суккулентные растения, исчезновение органических кислот обусловлено, повидимому, процессами, иными, чем декарбоксилизация. Наиболее правдоподобной причиной исчезновения кислот в этом случае является восстановление их до альдегидов, а дальнейшее превращение таких оксиальдегидов в углеводы должно считаться по крайней мере возможным.

ОБРАЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА

Костычев и несколько позднее Рулянд и Ветцель были главными сторонниками того взгляда, что растительные кислоты образуются скорее при белковом метаболизме, а не на пути дыхательного распада углеводов. Костычев (1925—1927), повидимому, первоначально предполагал, а Рулянд и Ветцель (1926, 1927) и сейчас держатся того взгляда, что растительные кислоты образуются путем окисления белков или продуктов их распада, но отнюдь не путем окисления углеводов. Этот взгляд первоначально был выдвинут для того, чтобы согласовать процесс образования растительных кислот со схемой распада сахаров по Нейбергу.

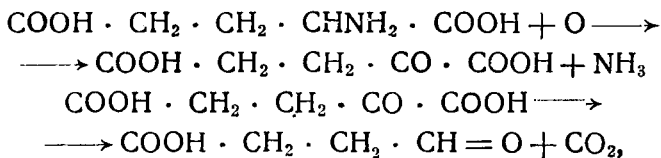
Прямых доказательств в пользу теории белкового происхождения растительных кислот пока не имеется. Указанные исследователи выдвигают четыре ряда доказательств в подтверждение этого взгляда.

1. Чаще всего цитируется из экспериментальных работ, относящихся к этому вопросу, работа Эрлиха о превращении глутаминовой кислоты в янтарную дрожжами (1909). Как было отмечено выше, Эрлих показал, что количество продуцированной янтарной кислоты увеличивается при дополнительном снабжении глутаминовой кислотой, но нужно вместе с тем отметить, что такого дополнительного новообразования янтарной кислоты не наблюдается, если одновременно присутствуют другие источники азота (табл. 13). Такое превращение глутаминовой кислоты в янтарную, следовательно, связано с азотным голоданием, и нельзя поэтому с уверенностью утверждать, что янтарная кислота и в нормальных условиях образуется таким способом. Эрлих предполагал, что превращение глутаминовой кислоты в янтарную происходит следующим образом:



с последующим окислением окси-глутаровой кислоты до янтарной.

Скорее, однако, нужно предполагать, что это дезаминирование является окислительным процессом, так как было показано, что многие амиды и аминокислоты более быстро дезаминируются в присутствии водородных акцепторов. Нейбауэр и Фромгерц (Neubauer и Frommherz, 1911) показали, что дрожжи превращают фенил-глицин ($\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$) в фенил-глиоксалевою кислоту ($\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$), и в настоящее время общепринято считать, что превращение глутаминовой и других аминокислот происходит сходным же образом, а именно:



с последующим окислением альдегида до янтарной кислоты.

Костычев и Фрей (1925) предполагают, что яблочная кислота, которую они обнаружили в бродящей культуре дрожжей, образуется сходным путем окислительного дезаминирования оксиглутаминовой кислоты. На основании данных Эрлиха, что в присутствии сахара¹ и при отсутствии других источников азота глутаминовая кислота реагирует по описанной выше схеме, нельзя еще утверждать, что образование янтарной кислоты растениями нормально должно происходить только этим путем, исключая окислительный синтез из 2-С соединений. Нормальное образование кислоты может происходить и тем и другим способом.

2. Структурное сходство яблочной кислоты и аспарагина и внутренняя связь последнего с белковым метаболизмом растений определенно наводят на мысль, что метаболизм яблочной кислоты и белковый метаболизм связаны друг с другом, но это еще не свидетельствует о том, что углеродный скелет аспарагина образуется из белковых источников. Результаты, полученные Мотэсом (Mothes, 1926), позволяют думать, что углеродный скелет образуется из углеводов способом, сходным с тем, который наблюдается у суккулентных растений. Он показал, что при искусственном кормлении проростков бобов аммонийными солями они значительно увеличивают содержание амидов, что говорит в пользу того, что углеродная часть амидов происходит из углеводов, а азот (в форме аммиака) усваивается из того или иного источника, доступного в данный момент растению,—из внешнего, как в этом опыте, или же из внутренних ресурсов, т. е. за счет продуктов белкового распада. Тот факт, что проростки бобов, содержащиеся в темноте, нормально накапливают аспарагин за счет белков, но что в присутствии наркотиков такое образование аспарагина прекращается и вместо него происходит накопление аммиака, также находится в согласии с этим взглядом. Образование яблочной кислоты из углеводов подавляется наркотиками, причем предполагаемой причиной такого их действия является наличие синтетических реакций, с которыми связан процесс ее образования. По аналогии с этим и образование аспарагина должно естественно задерживаться наркотиками.

3. Рулянд и Ветцель подчеркивают, что исчезновение аминокислот и белков как при нормальном обмене веществ, так и в специальных условиях эксперимента связано с образованием или амидов или аммонийных солей. Они разделяют растения на две группы: „амидные растения“ и „аммонийные растения“, к по-

¹ Обычно оставляется без внимания тот факт, что янтарная кислота не образуется из глутаминовой, если последняя присутствует одна—без сахара.

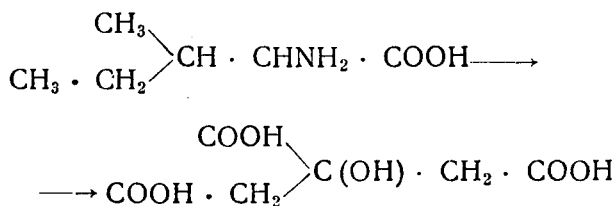
следней группе относятся *Rheum*, *Begonia* и *Aspergillus*. Как было показано в первой части, исчезновение аминокислот из *Rheum* связано, по их мнению, с накоплением малата аммония в черешках листьев. Исчезновение аминокислот из культуры *Aspergillus* на пептоне, как единственном источнике углерода, соответственно связано с накоплением оксалата аммония (Буткевич, 1903). *Begonia* также богата оксалатами аммония, которые предположительно образуются из аминокислот.

Эти наблюдения как будто позволяют думать, что углеродные остатки, образующиеся при дезаминировании аминокислот, могут частично превращаться в яблочную и щавелевую кислоты. Однако едва ли можно предполагать, что все многочисленные модификации углеродных скелетов, оставшихся от аминокислот, должны в процессе нормального метаболизма превращаться только в эти два простых соединения. Автору кажется более вероятным, что эти свободные от азота остатки используются на многочисленные синтезы, которые осуществляются в растении, и что освободившийся аммиак, реагируя с яблочной и щавелевой кислотами, возникающими из углеводов в процессе дыхания, образует аммонийные соли или аспарагин.

Таким образом фактический материал, с которым мы имели дело в этом разделе, не противоречит тому взгляду, что яблочная и щавелевая кислоты образуются из углеводов в процессе дыхания.

Нельзя, однако, утверждать, что они ни при каких условиях не могут образовываться и за счет белковых веществ, но пока в нашем распоряжении еще не имеется сколько-нибудь точных данных относительно химизма превращения аминокислот в яблочную и щавелевую кислоты, за исключением глутаминовой кислоты.

4. Костычев считает невозможным, чтобы разветвленная структура лимонной кислоты могла возникать из углеводов в качестве промежуточного продукта в дыхательном процессе. Эти затруднения, по его мнению, отпадают, если рассматривать лимонную кислоту не как продукт углеводного дыхания, а как образованную из изолейцина:



Он допускает, однако, что все же углеводы являются исходным источником, за счет которого образуется большая часть лимонной кислоты в плесневых грибах. Но он рассматривает кислоту как побочный продукт при образовании белков, а не как промежуточный продукт дыхания. Доказательством этого взгляда

является наблюдение Костычева и Чеснокова (1927), что накопление кислоты у *Aspergillus niger* начинается только после того, как весь доставленный в культуру азот был потреблен. Из этого наблюдения они сделали вывод, что углеродистый материал, пригодный для синтеза белков, используется для этой цели лишь при наличии достаточного количества азота, но после того, как весь азот исчерпан, эти углеродистые остатки не могут дальше превращаться в белки и идут теперь на построение органических кислот (лимонной и щавелевой в случае *Aspergillus niger*). Других доказательств в пользу этого толкования в настоящее время не имеется. Приведенные факты не могут быть приняты как имеющие общее значение, принимая во внимание наблюдения Мольера (1924) и Бернгауэра (1928), о которых уже была речь выше. Хжоншч и Тиуков также указывают, что накопление кислот происходит при обильном снабжении азотистыми веществами.

Костычев жалуется (1927) на неправильное его цитирование и заявляет, что он никогда не придерживался взгляда, будто растительные кислоты не могут образовываться из углеводов. Однако ясно, что он предпочитал точку зрения о происхождении их из белковых источников, разве только количество образовавшихся кислот (как это бывает у плесневых грибов) слишком велико, чтобы допускать такую возможность. Так, например, он утверждает, что яблочная кислота, образованная дрожжами, получается путем окислительного дезаминирования оксиглутаминовой кислоты (1925). Свою точку зрения по этому вопросу Костычев (1927) выражает в форме следующего положения: „Окисление обыкновенных растительных кислот представляет процесс, имеющий больше сходства с белковым дыханием, чем с углеводным дыханием“.

Позднее Костычев (1927) оговаривался, что эти слова относятся к окислению, а не к образованию растительных кислот, и он допускает, что последние могут возникать из углеводов. Если это так, то нелегко понять, что должен означать термин „белковое дыхание“: если принять эти оговорки, то термины „белковое дыхание“ и „углеводное дыхание“ становятся почти тождественными понятиями.

Наконец не следует забывать точку зрения Бенеке (Вепеске, 1903), который считает, что продуцирование кислот у растений связано с образованием белков из нитратов. Он предполагает, что свободные основания, освобождающиеся при восстановлении нитратов до органических азотистых соединений, нейтрализуются растительными кислотами, каковые, по его мнению, и образуются в целях этой нейтрализации. Однако признание полезного значения органических кислот для нейтрализации оснований само по себе не дает нам ничего для выяснения химизма их образования.

Рулянд и Ветцель (1926) придерживались до известной степени сходного взгляда, что функцией кислот является обезвреживание аммиака, образующегося в процессе белкового дыха-

ния. Однако с одинаковым правом можно утверждать, что аммиак образуется из белков для обезвреживания кислот, возникающих при углеводном распаде; и действительно, данные Буткевича (1903) скорее говорят в пользу этого последнего взгляда. Истинное значение образования растительных кислот удастся уяснить лишь после того, как будет ясно понят способ, при помощи которого освобождается энергия при внутриклеточном окислении.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Общие рассуждения о значении растительных кислот в настоящее время представляют небольшую ценность. Стоит, однако, рассмотреть в совокупности все те важнейшие реакции, в которых эти вещества заведомо принимают участие. Табл. 17, где эти реакции представлены в их взаимоотношениях друг с другом, указывает вместе с тем на возможность большого разнообразия в направлении тех превращений, которые наблюдались в различных организмах. Не следует забывать, что вообще невозможно получить доказательства того, что та или иная реакция не имеет места в той или иной растительной ткани. Действительно, наличие каких-либо реакций обычно может быть обнаружено лишь при определенных специфических для данной ткани условиях или же при таком экспериментальном воздействии, которое вызывает преобладание этой реакции. Так, например, превращение глутаминовой кислоты в янтарную происходит лишь тогда, когда бродящие дрожжи снабжаются глутаминовой кислотой при полном отсутствии других источников азота. Предполагается, что эта реакция совершается также и в других организмах, кроме дрожжей, хотя уже при совершенно других условиях. Но доказать такое общее предположение для янтарной кислоты обычно невозможно, так как янтарная и другие 4-С кислоты образуются также из 2-С соединений, которые могут быть получены из углеводов и других источников, и невозможно поэтому с уверенностью утверждать, какой именно из этих процессов является причиной наблюдаемого образования янтарной кислоты.

Поэтому правильнее всего будет подвести итог нашим знаниям по метаболизму растительных кислот, включив в схему все реакции, по отношению к которым имеются указания, что они совершаются в живых тканях (так как обычно невозможно доказать, что такие реакции не могут иметь места в данной ткани); но вместе с тем надо подчеркнуть, что табл. 17 не дает сведений об относительных скоростях (или константах скорости) различных реакций, а в силу этого и о концентрациях отдельных продуктов во времени. Они очень различны в различных тканях и, сверх того, подвержены сильным влияниям окружающих условий.

Некоторые из реакций (табл. 17) требуют специального пояснения. В настоящее время невозможно окончательно решить, происходит ли распад сахаров иным путем помимо реакций Нейберга.

Метаболизм глюконовой кислоты у грибов представляет некоторые затруднения, поскольку установлено, что высокие выходы глюконовой кислоты могут быть получены у грибов, которые образуют уксусный альдегид и спирт при анаэробных условиях. Такие грибы обладают как зимазным комплексом, так и глюкооксидазой. Фактические данные, относящиеся к нашей теории о превращении растительных кислот в углеводы и говорящие за то, что этот процесс, повидимому, действительно имеет место и что при этом предварительно происходит восстановление кислот в альдегиды, были уже достаточно широко обсуждены в разделах о плесневых грибах и суккулентных растениях. Имеются также данные, что и щавелевая кислота восстанавливается в растительных тканях. Но кроме того возможно, что она также окисляется до углекислоты, однако пока не удалось получить прямых доказательств того, что этот последний процесс действительно происходит, хотя он и представляется вероятным по-

ТАБЛИЦА 17

Взаимоотношения растительных кислот в различных процессах метаболизма



общим химическим основаниям. Из схемы реакций исключены предположения относительно дальнейшей судьбы углеродных остатков аминокислот после их дезаминирования. Они могут частично подвергаться окислению и служить таким образом новым источником для образования растительных кислот. В схеме показаны три возможности для судьбы лимонной кислоты: две из них заключаются в восстановлении карбоксильных групп, а третья (окисление с образованием CO_2), если и происходит, то разве лишь при строго аэробных условиях.

В настоящее время у нас нет никаких данных, которые позволили бы судить о том, каким образом доставляется энергия, необходимая для осуществления постулируемого нами превращения растительных кислот в углеводы, и можно только предполагать, что она добывается за счет окисления части кислот или некоторых других веществ. Этот ресинтез следует рассматривать в том же духе, как „окислительный анаболизм“ Блэка на или окислительный ресинтез гликогена из молочной кислоты в мышцах или из спирта в дрожжах.

Истинное значение кислотного метаболизма растений может быть близко к более поздней точке зрения Костычева, согласно которой эти кислоты являются материалом для построения некоторых сложных растительных продуктов.

Так, например, было показано [Уолкер (Walker и др., 1927)], что диальдегид янтарной кислоты и ацетон-дикарбоновая кислота являются материалом для робинзоновского синтеза тропинона, исходного вещества для целого ряда алкалоидов. Растительные кислоты, возможно, используются для построения аминокислот и белков, а также таких комплексных продуктов, как алкалоиды, а посредством восстановления могут давать исходные вещества для построения жиров и углеводов. Таким образом они могут в качестве необходимых звеньев играть существенную роль в тех процессах, при помощи которых энергия дыхания используется в многообразной синтетической деятельности растения.

Совершенно очевидно, что их нельзя рассматривать как бесполезные для растения конечные продукты метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА К ТРЕТЬЕЙ ЧАСТИ

- Венеcke, W. Über Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen. Bot. Zeitung, 61, 79, 1903.
- Bennet-Clark, T. A. The metabolism of succulent plants. Ph. D. thesis. Cambridge University, 1930.
- Bernhauer, K. Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*. Mitt. IV. Die Bedeutung der Mycelentwicklung für die Säurebildung. Biochem. Z., 197, 287, 1928.
- Он же. Zum Chemismus der Citronensäurebildung durch Pilze. II. Die Säurebildung aus verschiedenen Kohlenstoffverbindungen. Biochem. Z., 197, 309, 1928.
- Bernhauer, K. und Siebenäuger, H. IV. Über die Umwandlung der Zuckersäure. Biochem. Z., 230, 466, 1931.
- Он же. V. Die Citronensäurebildung aus Essigsäure. Biochem. Z., 240, 232, 1931.
- Bernhauer, K. und Scheuer, Z. über die Bildung der Glycol- und Glyoxalsäure aus essigsäuren Salzen. Biochem. Z., 253, II, 1932.

- Bernhauer, K. und Böckl, N. VIII. Über die Umwandlung von Aconitsäure in Citronensäure und weiteres über den Abbau der Essigsäure. *Biochem. Z.*, 253, 25, 1932.
- Bernhauer, K., Böckl, N. und Siebenäuger, H. Über Säurebildung aus Zucker durch *Aspergillus niger*. V. Die Bildung von Äpfelsäure neben Citronensäure. *Biochem. Z.*, 253, 37, 1932.
- Birkenshaw, J. H. and Raistrick, H. Quantitative methods and technique, of investigation of the products of metabolism of microorganisms. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, B, 220, 11, 1931.
- Буткевич, В. Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze. *Jahr. f. wiss. Bot.*, 38, 147, 1903.
- Он же. Über die Bildung der Oxalsäure und des Ammoniaks in den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Peptone. *Biochem. Z.*, 129, 445, 1922.
- Он же. Über die Citronensäuregärung. *Biochem. Z.*, 142, 195, 1923.
- Он же. Über die Bildung der Glucon- und Citronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker. *Biochem. Z.*, 154, 177, 1924.
- Буткевич, В. и Федоров, М. Über die Umwandlung der Essigsäure durch *Mucor stolonifer*, u. s. w. *Biochem. Z.*, 207, 302, 1929.
- Он же. Über die Verhältnisse zwischen Essig-, Bernstein-, Fumar- und Oxalsäure in den Kulturen von *Mucor stolonifer*. *Biochem. Z.*, 219, 87, 1930.
- Он же. Über die Umwandlung des Äthylalcohols in den Kulturen von *Mucor stolonifer*. *Biochem. Z.*, 219, 103, 1930.
- Challenger, F., Subramaniam, V. and Walker, T. K. The mechanism of the formation of citric and oxalic acids from sugars by *Aspergillus niger*. *I. J. C. S.*, p. 200, 1927.
- Challenger, F. and Klein, L. The formation of *l-malic* from fumaric acid by *Aspergillus niger*. *J. C. S.*, p. 1644, 1929.
- Chrzaszcz, T. und Tiukow, D. Die Stärkebildung bei den Schimmelpilzen u. s. w. *Biochem. Z.*, 207, 39, 1929.
- Он же. Der Zusammenhang der Stärkebildung mit der Säureanhäufung bei den Schimmelpilzen. *Biochem. Z.*, 222, 243, 1930.
- Он же. Biochemische Umbildungen der Essigsäure durch Schimmelpilze. *Biochem. Z.*, 229, 343, 1930.
- Он же. Die Abhängigkeit der Citronen- bzw. Oxalsäureanhäufung von der Stickstoffnahrung bei Schimmelpilzen. *Biochem. Z.*, 242, 137, 1931.
- Currie, J. N. Citricacid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Chem.*, 31, 15, 1927.
- Ehrlich, F. Über die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholische Gärung. *Biochem. Z.*, 18, 391, 1909.
- Franzen, H. und Schmitt, F. Die Bildung der Citronensäure aus Ketipinsäure. *Ber. d. d. chem. Ges.* 58, 222, 1925.
- Kosinski, I. Die Atmung bei Hungerzuständen bei *Aspergillus niger*. *Jahr. f. wiss. Bot.*, 37, 137, 1902.
- Kostytchev, S. Plant Respiration. *Transl. C. J. Lyon. Philadelphia* 1927.
- Kostytchev, S. und Frey, L. Über Alkoholgärung. XI. Über die bei der Hefegärung in Gegenwart von Calciumcarbonate entstehenden Säuren. *Zeit. physiol. Chem.*, 146, 276, 1925.
- Kostytchev, S. und Tschesnokow, W. Bildung von Citronensäure und Oxalsäure durch *Aspergillus niger*. *Planta*, 4, 181, 1927.
- Lundsgaard, E. Weitere Untersuchungen über die Einwirkung der Halogenessigsäuren auf den Spaltungs und Oxydationsstoffwechsel. *Biochem. Z.*, 250, 61, 1932.
- May, O. E., Herrick, H. T., Thom, C. and Church, M. B. The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum—purpurogenum* group. *I. J. biol. Chem.*, 75, 417, 1927.
- Molliard, M. Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmato-cystis nigra*. *Comptes rend.*, 174, 881, 1922.
- Он же. Nouvelles recherches sur la formation d'acides organiques par *Sterigmato-cystis nigra*. *Comptes rend.*, 178, 41, 1924.
- Mothes, K. Ein Beitrag zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen. *Planta*, 1, 472, 1926.
- Müller, D. Studien über ein neues Enzym, Glycoseoxydase. I. *Biochem. Z.*, 199, 136, 1928.

- Neubauer, O. und Frommherz, K. Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Zeit. physiol. Chem, 70, 326, 1911.
- Raistrick, H. and Clark, A. B. On the mechanism of the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. Biochem. Journ., 13, 329, 1919.
- Raistrick, H. and Co-workers. Studies in the biochemistry of microorganisms. Phil. Trans. Roy. Soc. B, 220. I, 1931.
- Ruhland, W. und Wetzell, K. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. I. *Begonia semperflorens*. Planta, 1, 558, 1926.
- Он же. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. III. *Rheum hybridum*. Planta, 3, 765, 1927.
- Он же. Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. V. *Rheum hybridum*. Planta, 7, 503, 1929.
- Walker, T. K. Subramaniam, V., and Challenger, F. On the mechanism of the formation of citric and oxalic acids by *Aspergillus niger*. J. C. S., p. 3044, 1927.
- Wehmer, C. Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure in Kulturen von *Aspergillus niger*. bot. Zeitung, 49, 233, 1891.
- Он же. Über den Einfluss der Temperatur auf die Entstehung freier Oxalsäure in Kulturen von *Aspergillus niger*. Ber. d. d. bot. Ges. 9, 163, 1891.
- Он же. См. Lafar, F., Handbuch der technischen Mykologie, 4, 239, Jena 1937.
- Он же. Über Fumarsäuregärung des Zuckers. Ber. d. d. chem. Ges., 51, 1663, 1918.
- Wolf, J. Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels succulenter Crassulaceen. Planta, 15, 5/2. 1931.

С. Д. Львов

НОВЕЙШИЕ ДАННЫЕ ПО ХИМИЗМУ ОБРАЗОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В РАСТЕНИИ

Предлагаемая вниманию читателей книжка Беннет-Кларка об органических кислотах представляет собой первую¹ в литературе попытку подвести итоги той научной дискуссии, которая в течение уже целого десятилетия ведется между представителями различных школ и направлений по капитальному вопросу о происхождении органических кислот и их дальнейшей судьбе в растении. Дискуссия эта к настоящему моменту не только не закончилась, а наоборот, как раз сейчас находится в полном разгаре. Целый ряд лабораторных школ, советских и зарубежных, принимает в этой дискуссии оживленное участие, отстаивая свои взгляды и противопоставляя их взглядам других школ, исходящих из совершенно иных, подчас противоположных, точек зрения. Эта дискуссия, за редкими исключениями, имеет отнюдь не спекулятивный характер, а опирается в каждом отдельном случае на новые экспериментальные исследования, вскрывающие новые и новые факты и тем подготовляю-

¹ Если не считать монографии Бернгауэра „Окислительные брожения“ (русский перевод 1935 г.), которая имеет совершенно иной характер, представляя собой как бы особую главу бродильной химии и не затрагивая совершенно биологической стороны проблемы.

щие почву к полному разрешению этой чрезвычайно сложной и важной проблемы. Литература по вопросам, связанным с этой проблемой, чрезвычайно разрослась за последнее десятилетие, рассеяна по различным периодическим изданиям, буквально на всех языках, почему появление в свет такой сводки, как предлагаемая книжка Беннет-Кларка, приобретает особенно крупное значение. В сжатой, компактной форме, не загромождающая изложения второстепенными деталями, автор дает выпуклую характеристику каждому из основных направлений, подвергая их в то же время критическому анализу, основанному в значительной мере на собственных экспериментальных исследованиях. Эти работы Беннет-Кларка, опубликованные лишь в самые последние годы, мало известны русскому читателю и до сих пор еще не нашли себе отклика даже в мировой литературе. Основные результаты собственных экспериментальных исследований Беннет-Кларка были им опубликованы лишь в 1935 г., т. е. уже после выхода в свет сводки на английском языке (1933), хотя в значительной мере они уже были им использованы в данной сводке. Эти работы Беннет-Кларка, как читатель может убедиться при чтении книжки, отличаются новизной и оригинальностью и должны занять в современной литературе видное место, освещая совершенно по-новому вопрос о судьбе органических кислот в растениях.

Как известно, органические кислоты лишь временно накапливаются в растениях, а потом, пройдя через максимум накопления, начинают постепенно уменьшаться в своем количестве, иногда доходя до полного исчезновения. По общепринятому толкованию, являющемуся общим почти для всех старых и современных теорий, они при этом путем тех или иных промежуточных реакций подвергаются полному окислению до конечных продуктов дыхания, т. е. CO_2 и H_2O . Исходя из этой точки зрения, мы должны смотреть на органические кислоты, из какого бы источника они ни получались, как на продукты временной стабилизации тех или иных промежуточных веществ, на которых в данный момент (иногда на очень короткие сроки, иногда на более длительное время) останавливается процесс окисления. С биологической точки зрения всегда представлялось непонятным, для чего растению требуется производить такой временный перерыв в обычно плавном течении дыхательного процесса. Такое объяснение можно еще было дать для суккулентных растений с их массивно построенными („мясистыми“) органами, с затрудненным благодаря этому газообменом и с их суточной ритмикой в образовании и разрушении органических кислот. Предполагалось, что такие растения испытывают недостаток в CO_2 вследствие слабой диффузии ее из внешней атмосферы и задерживают поэтому ночью дыхание на промежуточной ступени с тем, чтобы закончить его лишь днем, когда, с возобновлением фотосинтеза, CO_2 дыхания, не успев улетучиться через устьица, будет вновь использована внутри растения на построение углеводов. Такое объяснение, однако, совершенно неприменимо к таким мощным

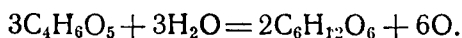
кислотообразователям, как плесневые грибки, неспособным к фотосинтезу, а также и к большинству высших растений, продуцирующих нередко значительные количества органических кислот несмотря на тонкостенную структуру своих листьев.

Принципиально новыми и важными для этой проблемы являются собственные опыты Беннет-Кларка, в которых под пленки плесневого грибка подводился раствор одной лимонной кислоты (или какой-либо другой), и прослеживалась как скорость ее использования грибком, так одновременно скорость выделения при этом CO_2 и поглощения O_2 . В тексте приведен один опыт из этой серии. Мы приведем из работы 1935 г. еще один опыт, построенный по другой схеме и с результатами, выраженными в цифрах.

Как известно из текста, автор полагает, что органические кислоты подвергаются в растении в большей своей части не окислению, а наоборот, восстановлению, регенерируясь через промежуточную ступень альдегидов до углеводов. Направление реакций, с точки зрения этих двух теорий, противоположное. В противоположные же стороны должен быть направлен и газообмен, связанный с этими реакциями. Это обстоятельство облегчает проверку этих теорий на опыте. Так, полное окисление яблочной кислоты должно протекать согласно уравнению:



что предполагает полное сжигание углерода кислоты до CO_2 и дает дыхательный коэффициент, равный 1,33. При регенерации до углеводов мы имеем уравнение:

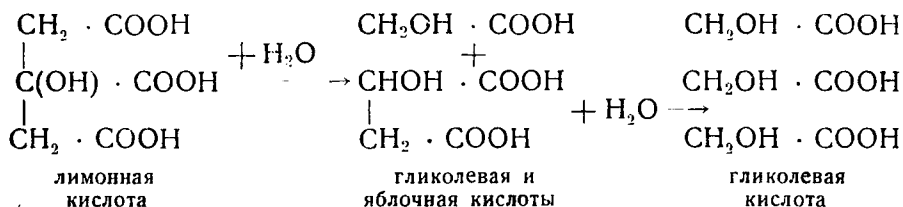


Здесь нет никакого выделения CO_2 , наоборот, освобождается кислород, который замещает часть атмосферного в знаменателе дыхательного коэффициента (для обычного дыхания) и может, таким образом, привести к его крупному повышению сверх нормы. С соответствующими пересчетами все это относится и к другим кислотам, в частности — к лимонной.

В опыте с плесневым грибком (*Aspergillus niger*) последний выращивался сначала на обычном питательном растворе, причем первое время дыхательный коэффициент был выше единицы (автор предполагает, что это связано с превращением глюкозы и нитратов в бедные кислородом белки и липоиды), но затем он снизился почти до единицы. После этого грибная пленка была перенесена на воду. Дыхательный коэффициент продолжал оставаться равным единице (т. е. дыхание шло за счет гликогена). После перевода на лимонную кислоту дыхательный коэффициент поднялся выше единицы, в отдельные периоды он достигал такой высокой цифры, как 1,75, т. е. значительно превышающей норму окислительной реакции, но в целом для опыта подъем был ниже. Цифровые итоги опыта:

	1-я смена лимонной кислоты	2-я смена лимонной кислоты
Израсходовано лимонной кислоты в мг . . .	31,0	26,6
Выделено CO ₂ в мг	30,27	13,79
Поглощено O ₂ в см ³	26,02	9,96
Сколько O ₂ должно освободиться при превращении израсходованной лимонной кислоты в глюкозу (в см ³)	5,41	4,64
Весь использованный O ₂ в см ³	31,13	14,60
Фактический дыхательный коэффициент . . .	1,162	1,383
С поправкой на кислород внутреннего происхождения	0,967	0,943

Окисление 26,6 мг лимонной кислоты должно было бы дать 18,3 см³ CO₂ и поглотить 13,8 см³ O₂ — на самом деле соответствующие цифры иного порядка (13,79 и 9,96). Исходя из своей теории восстановления и ввода вытекающую отсюда поправку на O₂, автор получил как для фазы повышенного, так и для фазы ослабленного дыхания (1-я и 2-я смены) одинаковые дыхательные коэффициенты, в общем близкие к единице, из чего и заключает, что дыхание и в присутствии лимонной кислоты идет исключительно за счет остаточного гликогена, а сама лимонная кислота подвергается регенерации до углеводов. Предварительно, по его соображениям, лимонная кислота может путем распада дать более простые соединения (гликолевую кислоту):



Гликолевая кислота восстанавливается до гликолевого альдегида, а уже последний подвергается конденсации до углеводов. Действительно, специальные опыты показали, что гликолевая кислота также не окисляется: однородные грибные пленки в двух параллельных опытах обнаружили как на воде, так и на гликолевой кислоте совершенно одинаковое низкое дыхание, идущее, очевидно, за счет остаточного гликогена.

Любопытно отметить, что ни лимонная, ни яблочная, ни гликолевая кислоты при подведении их под пленки гриба не давали щавелевой кислоты, из чего автор, в подтверждение соображений, развитых в сводке, снова приходит к выводу, что щавелевая кислота образуется не через гликолевую, а через янтарную и щавелево-уксусную. Но в таком случае следует заключить, что яблочная и лимонная кислоты не могут давать щавелево-уксусной, как это обычно принимается.

Как мы видим, взгляды, развиваемые Беннет-Кларком на основе нового полученного им опытного материала, вносят существенные изменения в наши обычные представления о судьбе и биологическом значении органических кислот, образующихся в растении. Автор усматривает биологическое значение тех циклических процессов, в которые вовлекаются органические кислоты (углеводы \rightarrow органические кислоты \rightarrow снова углеводы), в энергетическом эффекте, сопутствующем этим процессам. Однако энергетическая сторона этих процессов остается пока совершенно невыясненной. Недостаточно полно мы знаем об энергетическом балансе и тех процессов окислительного анаболизма, изучение которых начато значительно раньше (ресинтез молочной кислоты в гликоген в мышцах и др.). Поэтому было бы преждевременно сейчас входить в общую оценку основных воззрений Беннет-Кларка по этому вопросу. Но необходимо признать, что вопросы, поднятые им, поскольку они связаны с прямыми опытными данными, вносят новую струю в изучение этой проблемы и заслуживают серьезного внимания.

Переходя к вопросу о способах образования органических кислот в растении, по которому особенно остро ощущается глубокое расхождение между отдельными школами, необходимо прежде всего подчеркнуть, что вопрос этот имеет крупнейшее значение как в общенаучном, так и в практическом отношении. Органические кислоты занимают такое видное место в общем обмене веществ растения и в своих превращениях так глубоко переплетаются с различными другими процессами, характеризующими жизнедеятельность организма, что проблема генезиса органических кислот становится одной из важнейших узловых проблем современной растительной физиологии. Разрешить эту проблему—это значит одновременно распутать целый комплекс вопросов, связанных с различными сторонами внутренней жизни растения. К этому присоединяется также заинтересованность нашей практики в этой проблеме. Среди органических кислот, вырабатываемых растением, имеется немало таких, которые имеют большое техническое и даже пищевое значение. Особенно важное значение среди них имеет лимонная кислота. Органическая химия до сих пор еще не смогла разработать экономически эффективных приемов для синтетического получения лимонной кислоты. Основным источником лимонной кислоты для нашей промышленности все еще остается само растение. Она получается главным образом из лимонов и плодов некоторых других цитрусовых, но так как культура цитрусовых приурочена к сравнительно ограниченному климатическим зонам, то давно уже делались попытки использовать для этой цели другие, менее требовательные растения, продуцирующие лимонную кислоту. Таковыми оказались в первую очередь многие из числа плесневых грибов, а недавно анализами Шмука (1936) было установлено, что значительное количество лимонной кислоты (до 11% на сухой вес) содержится в листьях махорки. В настоящее время у нас в Союзе делаются попытки (и не безуспешные) поставить производство

лимонной кислоты в промышленном масштабе, используя для этого то или иное из этих двух растений. Уяснение условий образования и накопления кислоты в обоих объектах должно, конечно, иметь первостепенное значение для того и другого производства.

Работы советских ученых занимают крупное место в мировой литературе, посвященной проблеме генезиса органических кислот в растениях. Общеизвестным авторитетом в этой области, как у нас так и в заграничных научных кругах, является московский профессор В. С. Буткевич, имя которого многократно упоминается на страницах этой книги. Широкой известностью пользуются также работы покойного С. П. Костычева, по инициативе которого создан в Ленинграде завод по производству лимонной кислоты при помощи плесневого грибка *Aspergillus niger*. В Москве функционирует завод, добывающий лимонную кислоту из отходов никотинового производства по Шмуку.

По вопросу о происхождении органических кислот внутри растения оживленная полоса исследований началась с 1926 г. Последнее десятилетие оказалось чрезвычайно продуктивным в этом отношении: за этот период из самых различных лабораторий появилось огромное количество новых экспериментальных работ, на основе которых сложились все основные направления. Такой крупный вопрос не мог, конечно, не привлечь к себе внимания и значительно раньше.

Действительно, первые серьезные исследования по этому вопросу относятся еще к 80-м годам прошлого века. Однако, при недостаточно разработанной методике определения органических кислот в растениях и общей сложности всей этой проблемы, тесно связанной с другими отделами физиологии, в свою очередь мало разработанными в то время, эти исходные исследования не могли стимулировать углубленного развития проблемы и в течение нескольких десятилетий оставались на уровне первоначального накопления фактов и чисто ориентировочных соображений. Все же они привели к основному выводу, который в течение всего этого периода считался несомненным, что образование органических кислот в растениях в той или иной форме связано с углеводами. Против этого направления выступила, начиная с 1926 г., лейпцигская физиологическая школа, возглавляемая Руляндом и Ветцелем. Их теория о происхождении органических кислот за счет аминокислот в процессе дезаминирования достаточно подробно изложена в тексте. Проблема генезиса органических кислот вышла из состояния застоя, в котором она долгое время перед тем находилась, привлекла к себе внимание целого ряда крупных лабораторий и превратилась в одну из центральных проблем современной физиологии. Успешному развитию этой проблемы много содействовал тот факт, что к этому времени, благодаря успехам бродильной химии, чрезвычайно расширились и углубились наши знания по линии углеводного обмена в организме. Отсюда естественно родилась тенденция связать процесс образования органических кислот с теми бродильными реакциями,

на которые, как на универсальный фундамент, опирается углеводный обмен, и рассматривать таким образом органические кислоты как одно из разветвлений этого единого по своему внутреннему химизму бродильно-углеводного обмена. Эта тенденция для истекшего десятилетия является доминирующей и послужила основой для целого ряда гипотез, которые можно для краткости называть бродильными. Они достаточно широко и полно разобраны Беннет-Кларком в сводке.

Третья группа гипотез опирается в общем на важное открытие Мольяра, который еще в 1922 г. показал, что плесневые грибки, вне всякой связи с бродильными реакциями, способны непосредственно окислять глюкозу, давая глюконовую кислоту. Позднее Мюллером (1935) был обнаружен особый фермент глюко-оксидаза, осуществляющий эту реакцию. Способность глюкозы подвергаться непосредственному окислению, установленная этой работой Мольяра, дала повод к построению так называемых гипотез прямого окисления. Выдающимся представителем этого направления является В. С. Буткевич.

* * *

Важнейшими теориями первой группы, связывающими в той или иной форме образование органических кислот с азотистым метаболизмом растения, являются теории Рулянда—Ветцеля и Костычева. Обе теории изложены в тексте. Отметим лишь, что существенное различие между ними—в том, что первые мыслят образование органических кислот на путях распада белковых веществ (при дезаминировании аминокислот), а Костычев—наоборот, на путях их синтеза, хотя и незавершенного. Поскольку исходным материалом для построения органических кислот по теории Костычева являются все же углеводы, эту теорию правильнее называть углеводно-азотистой. Теория Костычева не встретила сочувствия в научных кругах (см. критику ее в тексте). К содержащимся там критическим соображениям необходимо добавить, что, по имеющимся наблюдениям, подтверждаемым и производственной практикой, для обеспечения максимальных выходов лимонной кислоты необходимо под готовые грибные пленки вводить раствор сахарозы с добавкой азота, что противоречит исходному пункту этой теории и заставляет ее сторонников осложнять теорию дополнительными гипотезами спекулятивного характера (о стимулирующем действии азота на такие процессы, которые согласно теории могут происходить лишь при недостатке азота).

Азотистая теория Рулянда—Ветцеля основана главным образом на их экспериментальном исследовании метаболизма яблочной кислоты в ревене. Эти работы лейпцигской школы до сих пор не проверялись в других лабораториях, и первое критическое исследование, посвященное этой теории и выполненное с тем же материалом (ревенем), было опубликовано лишь

в 1935 г. Беннет-Кларком и Вудруфом (Bennet-Clark и Woodruff, 1935). Часть результатов этой работы использована Беннет-Кларком в сводке. Приведем некоторые дополнительные данные, содержащиеся в этой работе и усиливающие скептическое отношение к руляндовской теории. Рулянд утверждал, что при прорастании корневища ревеня происходит распад аминокислот и массовое появление (в экви-молекулярном соотношении) органических кислот (1-яблочной) и NH_3 . Авторы за 15 суток прорастания не обнаружили сколько-нибудь существенных изменений в содержании кислот и аммиака (содержание кислот в мг-эквивалентах поднялось лишь с 41,1 до 45, а содержание аммиачного азота понизилось с 4,9 до 2,04). Далее авторами было прослежено за время вегетации общее содержание малатов как в целом растении, так и по органам. В корневище оно при прорастании убывает, к осени сильно увеличивается. В листьях и побегах, наоборот, весной возрастает, а к осени резко снижается. В целом растении общее содержание малатов сначала довольно долго стоит на одном уровне. Это означает, что в течение этого времени происходит только переноса малатов из корневища в побеги. Однако в разгар фотосинтетической деятельности происходит сильное возрастание общего содержания малатов. Такие соотношения, вопреки Рулянду, говорят за то, что образование яблочной кислоты в ревете идет за счет углеводов, а не аминокислот. Процент малатов на сырой вес, несмотря на их общее увеличение, в течение лета непрерывно, хотя и медленно, понижается. Отсюда Рулянд сделал вывод, что малаты летом (при фотосинтезе) не образуются, но он не учел их общего возрастания во всем растении в целом. Молярное соотношение $\frac{\text{NH}_3}{\text{яблочная кислота}}$ всегда незначительно (обычно около 0,1), что стоит в полном противоречии с утверждениями и выводами Рулянда.

В недавней работе Файфу и Фрэмptonу (1935) удалось вызвать в свекле усиленный распад амидов, выдерживая ее в атмосфере CO_2 (20—60%). Отщепляемый при этом аммиак пошел на связывание органических кислот и вызвал уже в течение первого часа заметное понижение кислотности, однако никакого новобразования кислот при этом не наблюдалось. Кислотность, правда, повысилась при выдерживании свеклы в атмосфере 80% углекислоты, но в этих условиях происходил распад не только азотных веществ, но и углеводов.

Эти данные опять-таки не соответствуют концепции Рулянда.

Что касается лимонной кислоты, стоящей в генетической связи с яблочной, то Вейг (1930) на основании своих опытов с плесневыми грибами приходит к выводу, что образование у них лимонной кислоты не стоит ни в какой связи с процессом дезаминирования.

Таким образом к обеим азотистым теориям приходится относиться в настоящее время с большим скептицизмом. А поскольку

по отношению к суккулентам самими авторами лейпцигской школы было признано, что здесь образование яблочной кислоты несомненно идет за счет углеводов, а не аминокислот, принятие азотистой гипотезы по отношению к другим растениям (а также и по отношению к такой генетически близкой к яблочной кислоте, как лимонная) должно было бы привести к совершенно непонятному и мало правдоподобному дуализму.

Поэтому все остальные гипотезы, принадлежащие ко 2-й и 3-й группам, исходят из углеводов как основного источника для построения органических кислот в растениях. Не следует, однако, заранее отвергать возможности того, что в процессе превращений азотистых веществ внутри растения могут возникать факторы, способные воздействовать и на углеводный обмен, направляя его по тому или другому руслу. Углеводный и азотистый обмен мы не можем мыслить в едином организме совершенно обособленными друг от друга. Те или иные точки перекреста между ними должны существовать, почему и неудивительно, что различные вариации в условиях азотистого режима оказываются, как показывает опыт, далеко не безразличными для процесса накопления органических кислот в растениях. Но с этой точки зрения связь между органическими кислотами и азотистыми веществами не может пониматься так элементарно, в форме таких простых стехиометрических соотношений, как это постулируется в теориях Рулянда и Костычева.

Как мало нам еще известно о взаимодействии внутренних факторов, способных влиять на образование кислот,—об этом, в качестве хорошей иллюстрации, свидетельствует любопытное наблюдение Сотникова (1934 и 1935), который нашел, что образованию лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* особенно благоприятствует дача азота в виде магнезиальной соли— $Mg(NO_3)_2$.

Хотя вопрос о механизме такого специфического действия магния на кислотообразование пока остается совершенно неисследованным, но все же это наблюдение заставляет вспомнить о недавнем и совершенно неожиданном открытии, что Mg является необходимым компонентом коферментной системы и принимает, таким образом, существенное участие в бродильных процессах. При таком понимании роли магния это наблюдение Сотникова говорило бы в пользу бродильной теории образования лимонной кислоты.

Ко второй группе мы относим все „бродильные“ теории. Их имеется несколько. Мы остановимся прежде всего на важнейшей из них, получившей наиболее широкое распространение и берущей за основу бродильные реакции Нейберга в их классической форме. Эта теория была разработана Хжоншчем и Бернгауэром. Она достаточно подробно во всех своих вариантах, принципиально не отличающихся друг от друга, изложена в тексте. Одно время она заняла почти господствующее положение среди других теорий. Внешним показателем того авторитета, который она приобрела среди специалистов, может служить тот характерный факт, что она догматически, как наи-

более сильно обоснованная теория, была внесена редактором в текст второго (посмертного) издания известного учебника С. П. Костычева по физиологии растений.¹ Беннет-Кларк, хотя его точка зрения на процесс образования органических кислот, как увидим дальше, колеблется между двумя теориями, вполне определенно высказывается также в пользу „нейберговской“ концепции. Однако за последнее время, на основе новых экспериментальных исследований, был выдвинут против этой теории целый ряд серьезных возражений, которые значительно поколебали ее устойчивость. Из них в качестве важнейших необходимо отметить в первую очередь следующие.

1) По нейберговскому варианту только 4 атома углерода в молекуле глюкозы могут быть использованы на построение органических кислот, остальные два улетучиваются в форме CO_2 . Поэтому максимальный выход лимонной кислоты не может превышать 71,1% от израсходованного сахара. Беннет-Кларку было известно, что Буткевич еще в старой работе получил значительно более высокий выход (85,5%), что противоречит теории и указывает на более полное использование углерода сахарной молекулы. Отмечая эту высокую цифру в своей сводной таблице (на стр. 92), Беннет-Кларк выделяет ее, как единственную среди других более низких цифр, а относительно последних высказывается, что они удивительно совпадают с требованиями теории. Однако в новейших работах эти высокие цифры, не согласующиеся с бродильной теорией по Нейбергу, неуклонно повторяются. Гудлет (1935) в 5 опытах из 13 получил выходы лимонной кислоты (от 71,4 до 85,0), превышающие теоретическую норму. В новейшей американской работе трех авторов (Wells, Mouyer и May, 1936), проведенной с грибом *Aspergillus niger*, в 24 опытах получены выходы лимонной кислоты от 72,8% (низшая цифра) до 90,7% (высшая). Не получено ни одной цифры, отвечающей нейберговскому варианту! Наконец, Буткевич и Гаевская получили в недавней работе (1935) наиболее высокие выходы, какие вообще удавалось до сих пор получать, достигавшие у них на сахарозе до 98,2%, т. е. указывающие на возможность полного использования сахарной молекулы на построение кислоты. Цифры эти на первый взгляд являются совершенно убийственными для нейберговского варианта. Однако к ним пока следует относиться с большой осторожностью, поскольку сам Буткевич в ряде новейших работ (см. дальше) указывает на возможность использования редуцирующих веществ мицелия для построения кислоты, что должно было бы привести к чисто арифметическому повышению процента выхода кислот от внесенного извне сахара.

2) Второй аргумент связан с первым и касается соотношения между выходом кислоты и CO_2 . По нейберговскому варианту на 2 молекулы лимонной кислоты должно одновременно за счет использованной глюкозы выделяться 6 молеку-

¹ С. П. Костычев, Физиология растений, часть первая, стр. 388—391, 1933

CO_2 , что дает соотношение между весовыми количествами лимонной кислоты и CO_2 1,45:1. Гудлет в той же работе в 8 опытах из 13 поставленных получил для этого соотношения значительно более высокие цифры — от 1,96 до 2,66. В цитированной выше американской работе в 12 опытах получены цифры от 2,40 до 4,00 — опять ни одной соответствующей теоретической норме.

О том же несоответствии с бродильной теорией по Нейбергу, но уже по отношению к щавелевой кислоте, говорит работа Чеснокова (1932), оставшаяся неизвестной Беннет-Кларку. Молекулярное соотношение между образующейся щавелевой кислотой и выделяющейся CO_2 должно было бы быть, по нейберговскому варианту, равно 1, между тем по определениям Чеснокова оно значительно выше, из чего он заключает, что весь углерод глюкозы целиком используется на построение щавелевой кислоты.

3) Третий аргумент выдвинут за последнее время Буткевичем (см. в списке перечень новейших работ Буткевича и его сотрудников за 1934—1936 гг.) и касается тех основных фактических данных, на которых построена теория Жоншча и Бернгауэра. Как известно, эти авторы в ряде работ показали, что лимонная кислота, в согласии с их теорией, может образовываться за счет тех простейших веществ, которые возникают в качестве промежуточных продуктов или их производных при бродильном распаде сахара (спирт, уксусная кислота и др.). Эти данные представляют собой наиболее солидную основу для их теории и сильно подняли ее авторитет. В отмеченных выше новейших работах Буткевича с сотрудниками ими обнаружено, что лимонная, янтарная и щавелевая кислоты, хотя действительно и образуются при внесении под грибную пленку ацетатов в качестве единственного источника углерода, но не за счет уксусной кислоты, как предполагалось раньше, а за счет веществ самого мицелия. Эти вещества — редуцирующего характера (восстанавливают фелингову жидкость). Если пленка их не содержит или бедна ими (например, если она предварительно выращивалась на растворе сахарозы низкой концентрации), то она неспособна продуцировать кислоты на ацетатах. Количество образующихся кислот тем выше, чем больше редуцирующих веществ содержится в пленке. Сухой вес мицелия при этом убывает. Ацетаты играют лишь защитную роль по отношению к образующейся кислоте, предохраняя ее от дальнейшего распада; эти обстоятельством и симулируется их предполагавшаяся ранее роль как материальных источников для образования кислот. Ацетаты из раствора постепенно исчезают, но не на построение кислоты, а усваиваются голодающим мицелием.

Автор усматривает в этих результатах своих работ серьезную угрозу для бродильной теории и справедливо настаивает на необходимости пересмотреть заново весь вопрос о способности плесневых грибов перерабатывать продукты анаэробного распада сахаров на органические кислоты.

Хжоншч и Закоморный (1935 и 1936) выступили с возражениями против этих работ Буткевича. На основании вновь поставленных опытов с учетом веса мицелия они показывают, что образование шавелевой кислоты при даче в качестве единственного источника углерода формиатов и образование лимонной кислоты при даче ацетатов наблюдается и тогда, когда вес мицелия не только не убывает, а наоборот, увеличивается. Поэтому они решительно отвергают возражения Буткевича и считают, что своими опытами они безупречно доказали образование кислот за счет простейших веществ, получаемых при распаде сахаров. С таким утверждением авторов, однако, нельзя согласиться. В своих опытах они пользовались полным питательным раствором (за исключением сахара) и заседали его спорным порошком. В таких условиях мицелий у них разрастался, используя углерод формиата или ацетата. Остается совершенно неизвестным, возникала ли у них органическая кислота за счет непосредственно этих веществ или же за счет тех сложных продуктов (углеводов?), которые гриб предварительно вырабатывал в процессе своего развития. Поскольку мицелий в их опытных культурах все время увеличивался в весе, такое предположение нельзя считать исключенным.

Более серьезные контрвозражения против критики Буткевича выдвинуты в работе Бернгауэра (Bernhauser и Slanina, 1934). Прежде всего они приводят следующую табличку, составленную ими на основании опытных данных самого Буткевича (грибная пленка весом 1,28 г, содержащая в себе 0,055 г лимонной кислоты, перенесена на раствор Na-ацетата с содержанием аниона уксусной кислоты, равным 2,5 г).

	Через 1½ суток	Через 2½ суток	Через 4½ суток
Лимонной кислоты (г)	0,10	0,14	0,38
Уксусной кислоты осталось (г)	2,38	2,19	1,51
Вес мицелия (г)	0,88	0,89	0,86

За первые 36 часов вес мицелия уменьшился весьма значительно—с 1,28 г до 0,88 г, между тем лимонной кислоты образовалось лишь ничтожное количество (0,1 г). В дальнейшем продукция лимонной кислоты заметно возрастает при практически стационарном весе мицелия. Авторы поэтому, вопреки Буткевичу, утверждают, что его собственные опыты свидетельствуют об образовании лимонной кислоты не за счет веществ мицелия, а за счет уксусной кислоты, количество которой все время убывает.

Что касается щавелевой кислоты, то, по собственным опытам авторов, она на различных кислотах может образовываться в количествах, в несколько раз превышающих вес мицелия, почему ее образование, по мнению авторов и опять-таки вопреки Буткевичу, нельзя связывать с веществами, содержащимися в грибной пленке.

Так, с одним штаммом ими было получено:

На уксусной	кислоте	— 0,97 г	щавелевой	кислоты	при	весе	мицелия	— 0,30 г
„	янтарной	„	-- 0,79 „	„	„	„	„	„ = 0,34 „
„	фумаровой	„	— 0,69 „	„	„	„	„	„ = 0,31 „
„	гликолевой	„	— 0,76 „	„	„	„	„	„ = 0,24 „

Выходы щавелевой кислоты в процентах от веса мицелия в различных опытах составляли: на уксусной кислоте 115—323%; на янтарной 113—250%; на фумаровой 103—280%; на гликолевой—98—341%. Здесь особенно обращает на себя внимание образование щавелевой кислоты на гликолевой, что раньше оспаривалось (см. в тексте у Беннет-Кларка).

Невзирая на все эти контрвозражения, направленные против новейших работ Буткевича, последние, однако, сохраняют значение в своем основном принципиальном пункте: они внушают мысль, что даваемые извне органические вещества не прямо перерабатываются на органические кислоты, но предварительно ассимилируются грибом, образуя вещества его мицелия, и уже за счет этих вновь синтезированных ассимилятов формируются те или иные органические кислоты. Поэтому нельзя не согласиться с Буткевичем, что вопрос об образовании органических кислот за счет таких простейших веществ, как уксусная кислота или спирт, требует переисследования. Если указанная кислота предварительно тем или иным путем превращается в углеводы, то факт образования лимонной кислоты на ацетатах не может уже рассматриваться как аргумент в пользу бродильной теории.

Таковы итоги основной бродильной теории. Как видим, она сильно поколеблена новейшими исследованиями, хотя последнего слова по поводу нее еще не сказано. Авторы продолжают упорно отстаивать ее и в настоящее время. Какова бы ни была судьба этой теории в дальнейшем, необходимо отметить, что она вызвала огромное количество экспериментальных исследований, давших много весьма ценного фактического материала, подняла изучение проблемы генезиса органических кислот на большую научную высоту по сравнению с прошлым периодом и в этом отношении сыграла (и продолжает играть) крупную положительную роль в науке.

Вторая бродильная теория принадлежит лейпцигской школе и выводит яблочную кислоту из пировиноградной через дикетoadипиновую. Она подробно изложена в тексте. Новых литературных данных по поводу нее не имеется.

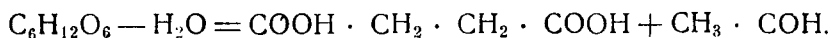
Следует отметить лишь работу (чисто химическую) Кпоор и Martius (1936), которые попытались чисто химически (in vitro) синтезировать лимонную кислоту из более простых кислот, имеющих то или иное отношение к бродильному процессу. Получить лимонную из смеси щавелево-уксусной и уксусной им не удалось. Но при замене уксусной кислоты пировиноградной, т. е. из смеси щавелево-уксусной и пировиноградной в щелочном (на соде) растворе в присутствии перекиси водорода как окислителя образовывалась лимонная кислота, которую удалось изолировать в виде кальциевой соли в количестве 35% спустя 20—30 часов от начала обработки.

Таким образом здесь материалом для образования лимонной кислоты служила нерасщепленная пировиноградная кислота, как это требуется по второй бродильной теории.

Необходимо остановиться на третьей бродильной теории, связанной с работами Виртанена (Virtanen, см. перечень его работ в списке), а также с работой Фут, Фреда и Петерсона (Foot, Fred и Peterson, 1930). Их исследования над химизмом пропионово-кислого брожения, вызываемого специфическими бактериями, а также брожения, вызываемого кишечной палочкой, привели их к раскрытию совершенно новой формы брожения, резко и принципиально отличающейся от брожения „по Нейбергу“, которое до сих пор принималось как единственный и универсальный тип брожения. При спиртовом брожении молекула гексозы разрывается как раз посередине, давая две триозы.

В данном же случае Виртанену удалось показать, что молекула гексозы распадается здесь не посередине, а ближе к одному концу, вызывая образование двух разнородных соединений, содержащих: одно — четыре, а другое — два атома углерода.

В стабилизированных продуктах такого распада удалось обнаружить янтарную кислоту и уксусный альдегид, что позволяет выразить процесс в форме уравнения:



Такой путь распада сахара открывает новые теоретические возможности для понимания динамики тех процессов, которые не укладываются в классическую схему брожения. В частности, исходя из этой реакции, не трудно было бы объяснить и образование яблочной и лимонной кислот, поскольку и в прежних бродильных схемах в качестве промежуточных веществ фигурируют янтарная кислота и уксусная, получаемая путем окисления уксусного альдегида. В данном случае янтарная кислота должна была окислиться в щавелево-уксусную и путем альдольной конденсации с молекулой уксусной кислоты превратиться в лимонную.



Относительно этой схемы важно отметить и подчеркнуть два пункта.

1) Процесс начинается с распада молекулы глюкозы на две, хотя и не одинаковые, части. Мы не знаем самых первичных, очевидно крайне нестойких, продуктов этого распада, но несомненно процесс начинается с бродильного акта, за которым уже далее следуют реакции окисления и преобразования. Мы знаем из бродильной химии, что к перебраживанию способны исключительно сахара с исходной ничем не модифицированной молекулой. Поэтому появление карбоксильных групп (янтарной кислоты) представляет собой вторичную реакцию, а не первичную. Но поэтому схему, связанную с реакциями Виртанена, нельзя относить к схемам прямого окисления, как это делает Гудлет (1935). Ее необходимо включить в группу бродильных схем, т. е. признать, что в образовании органических кислот по этой схеме должен принимать участие бродильный аппарат (для схем прямого окисления он совершенно не требуется, в этом их принципиальное отличие от бродильных теорий). В своей второй работе (1936) это обстоятельство повидимому учитывает и Гудлет, хотя и в неясной форме, поскольку он отмечает, что схема по Виртанену „дает некоторые наводящие указания на своеобразную анаэробность бродильной среды“, хотя слово „бродильной“ у него взято в кавычки, как выражение некоторой неуверенности.

2) Самое важное в схеме, почему она и привлекает к себе внимание, несмотря на свою неразработанность, это возможность мыслить образование кислот из сахара без всякой потери углерода на CO_2 . Таким путем легко было бы, оставаясь в рамках бродильной теории, объяснить те высокие выходы, которые были отмечены для лимонной и щавелевой кислот.

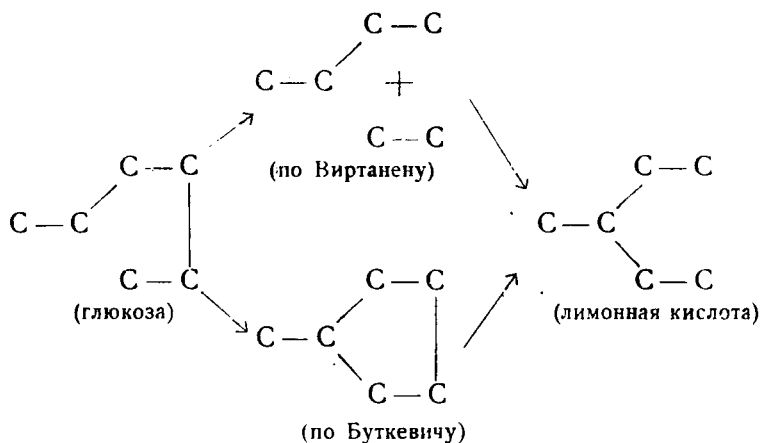
Нужно, однако, признать, что вопрос о приложимости виртаненовских реакций к процессу образования важнейших кислот до сих пор остается совершенно не изученным.

К третьей группе теорий относятся схемы прямого окисления. Наиболее авторитетным представителем этой точки зрения является Буткевич. Его схема (в приложении к лимонной кислоте) приведена в тексте: Прямых экспериментальных дока-

зательств в ее пользу не имеется, но все же она, как и другие аналогичные ей схемы третьей группы, сохраняет до сих пор свое принципиальное значение, поскольку кризис, переживаемый бродильными теориями, заставляет считать вопрос о происхождении органических кислот все еще открытым. В одной из последних работ (Буткевич и Гаевская, 1935) Буткевич пытается сопоставить свою схему со схемой Виртанена, усматривая между ними далеко идущую аналогию и утверждая, что все различие между ними лишь в последовательности реакций. По схеме Буткевича — сначала альдольная конденсация внутри молекулы сахара, а затем разрыв кольца, сопровождающийся окислением.

По схеме Виртанена, наоборот, сначала расщепление частицы сахара, сопровождающееся окислением, а затем альдольная конденсация щавелево-уксусной и уксусной кислоты в лимонную.

Близость обеих схем Буткевич иллюстрирует следующим построением:



В этих схематических построениях оба пути преобразования молекулы глюкозы в молекулу лимонной кислоты на первый взгляд действительно оказываются чрезвычайно сходными, но Буткевич упускает из виду, что между ними, как уже выше было упомянуто, имеется глубокое и принципиальное различие: первый путь (по Виртанену) предполагает участие в процессе бродильного аппарата, а второй путь (по Буткевичу) — его исключает.

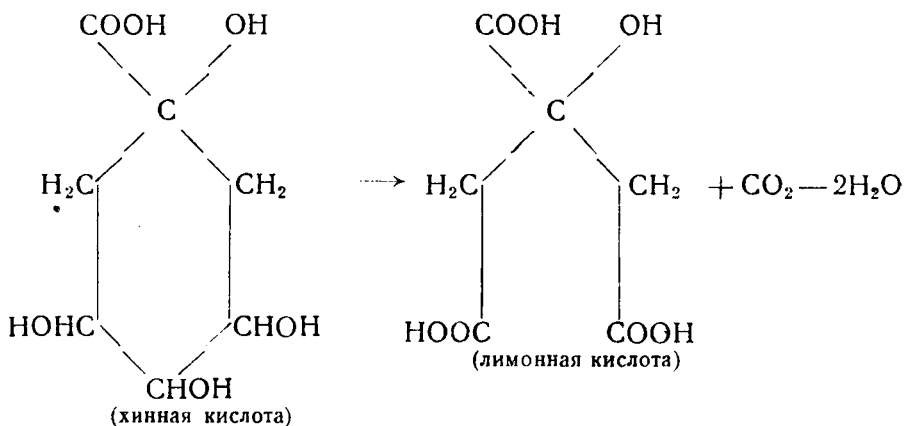
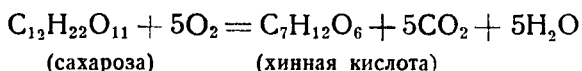
Другая гипотеза прямого окисления пытается вывести лимонную кислоту через глюконовую, сахарную и дикетоадипиновую. Она изложена в сводке (см. третью часть, раздел „Гипотеза Францена и Шмитта об образовании лимонной кислоты“, стр. 80). Основным экспериментальным аргументом в ее пользу является старая работа Моляра, показавшего (правда, в одном опыте), что в культуре *Aspergillus niger* происходит последовательная

смена в накоплении трех кислот (сначала глюконовой, затем лимонной и под конец — щавелевой). Диаграмма этого опыта действительно весьма характерна и дана в сводке на стр. 79. К сожалению, этот интересный опыт в такой форме больше никем не повторялся, и трудно сказать, в какой мере закономерной является такая последовательность в смене трех кислот.

Беннет-Кларк очень сочувственно относится к этой гипотезе и пытается оспаривать аргументы, выдвинутые против этой теории (см. в тексте), хотя в другом месте вполне определенно присоединяется в бродильной теории по Нейбергу.

Новых данных по поводу этой теории в литературе не имеется.

Опираясь на наблюдения Буткевича (1924), что способность к переработке хинной кислоты свойственна лишь тем грибам, которые в состоянии образовывать лимонную кислоту, Эмде (Emde, 1935) недавно высказал предположение, что лимонная кислота образуется из сахарозы через хинную кислоту:



Гипотеза эта, отличаясь сложностью в химическом отношении, экспериментально ничем не обоснована.

В цитированной выше американской работе трех авторов (Wells, Moug и May, 1936) эта гипотеза решительно отвергается, поскольку найденные ими выходы лимонной кислоты и CO_2 совершенно не согласуются с уравнением Эмде.

Согласно этому уравнению, выход лимонной кислоты должен был бы составить 56% от потребленной сахарозы, между тем как в опытах американцев он был всегда значительно выше этой цифры, колеблясь в пределах от 72,8 (минимальная цифра) до 90,7%.

В одной из последних работ Бих (1936) сообщает, что при действии платиновой черни на щелочные растворы глюкозы при

обыкновенной температуре в отсутствие кислорода выделяется водород и образуется (примерно в эквимолекулярных соотношениях) глюконовая кислота и сорбит. Автор полагает, что первым этапом распада глюкозы является здесь окислительно-восстановительная реакция по Канницаро. Как ни любопытно само по себе это наблюдение, оно вряд ли может иметь какое-нибудь отношение к биологическому образованию глюконовой кислоты, так как в литературе имеются данные о 100% выходе глюконовой кислоты за счет затраченной глюкозы.

Наиболее серьезный фактический аргумент в пользу теории прямого окисления (в отношении лимонной кислоты) был выдвинут в последней работе Бариновой и Буткевичем (1936). Они уверяют, что им удалось при помощи моноиодуксусной кислоты полностью остановить под пленками *Aspergillus niger* бродильные процессы (спиртовое брожение), не нарушая в то же время процесса образования лимонной кислоты. Работа заслуживает большого внимания, поскольку она представляет собой первую в литературе попытку экспериментальной проверки теории прямого окисления. Работу необходимо продолжить дальше с тем же и аналогичными методами, прежде чем делать окончательные выводы.

За последнее время появился ряд работ крупного принципиального значения, освещающих с совершенно новой точки зрения роль органических кислот в процессах окислительного распада углеводов (т. е. дыхания) в животном организме. Как известно, в процессах анаэробного распада углеводов (брожения) центральное положение занимает пировиноградная кислота, подвергающаяся в мышцах восстановлению до молочной кислоты, вызывая одновременно окисление глицеринового альдегида (или глицерина) до глицериновой кислоты. В аэробных условиях (при дыхании) один из промежуточных продуктов этого бродильного распада подвергается окислению за счет активированного кислорода воздуха. До последнего времени оставалось совершенно неизвестным, путем каких именно последовательных реакций осуществляется этот несомненно чрезвычайно сложный процесс окисления. Szent-Györgyi со своими сотрудниками показал, что в этом процессе весьма своеобразную каталитическую роль играют такие биологически важные органические кислоты, как янтарная, фумаровая и щавелево-уксусная (Szent-Györgyi с сотрудниками, 1934—1937; см. также Stare, Baumann, 1936). Прибавленные в незначительном количестве к мышечному экстракту, эти кислоты вызывают резко выраженную стимуляцию дыхания. Совсем недавно Krebs и Johnson (1937) показали, что такой же эффект вызывается и лимонной кислотой и ее солями. Эффект возрастает в присутствии гликогена, гексозодифосфата и глицерофосфата, что заставляет полагать, что вещество, окисление которого катализируется цитратами, — углеводного характера. Есть все основания полагать, что однородный эффект, свойственный янтарной, фумаровой, щавелево-уксусной и лимонной кислотам, обусловлен тем, что эти кислоты взаимно перехо-

дят одна в другую и действуют как единая система. Опираясь на исследования Кноор'a и Martius'a (1936—1937), а также на результаты собственных опытов, Krebs и Johnson дают такую схему для окислительного распада углеводов в мышечной ткани: какая-то ближе не установленная триоза, как один из промежуточных продуктов бродильного распада углеводов (типа пировиноградной кислоты) реагирует с щавелево-уксусной кислотой (по реакции Кноор'a и Martius'a) и образует лимонную кислоту; лимонная кислота через изо-лимонную, оксало-янтарную и α -кетоглутаровую преобразуется в янтарную кислоту (согласно опытным данным Кноор'a и Martius'a, а также Krebs'a и Johnson'a); янтарная кислота обычным порядком, через фумаровую и l-яблочную, окисляется в щавелево-уксусную, а последняя снова вступает в дело, реагируя с новой молекулой триозы. Таким образом углеводы в процессе своего окислительного распада непрерывно проходят через стадию лимонной и далее щавелево-уксусной кислоты, поглощая в соответствующие моменты кислород и выделяя CO_2 . Если в анаэробном распаде углеводов центральное положение занимает пировиноградная кислота, то в окислительном распаде (при дыхании) на первое место выступает щавелево-уксусная, которую можно рассматривать как производную пировиноградной (α -карбоксилированная пировиноградная кислота).

С точки зрения метаболизма органических кислот эти новейшие работы имеют крупное принципиальное значение, поскольку они связывают образование лимонной кислоты с бродильным процессом и дают, таким образом, новые сильные аргументы в пользу бродильной теории. Вместе с тем они дают унитарную теорию для объяснения образования органических кислот как 6-С ряда, так и 4-С ряда (лимонной и яблочной) и таким образом устраняют непонятный дуализм, вытекающий из теорий прямого окисления.

Что касается последней вышеупомянутой работы Бариновой и Буткевича (с моноиодуксусной кислотой), содержащей в себе наиболее сильные аргументы в пользу теории прямого окисления, то она несомненно нуждается еще в дальнейшем развитии и уточнении. Новейшая работа с аналогом моноиодуксусной кислоты — фтористым натрием (находящаяся в печати работа Львова и Тупицыной) — показала, что подведенный под пленку плесневого гриба раствор фтористого натрия прекращает образование лимонной кислоты в таких концентрациях, при которых он еще совершенно не действует на образование глюконовой кислоты. Лимонная и глюконовая кислоты ведут себя совершенно различным образом, что указывает на различные пути их образования.

Еще пожалуй важнее результаты, полученные Львовым и Лимберг (работа в печати) при исследовании влияния фосфатов, введенных под пленку, на продукцию лимонной и глюконовой кислоты. Фосфаты — один из важнейших бродильных факторов — оказали сильное (особенно в течение первых суток опыта)

стимулирующее действие на продукцию лимонной кислоты и никакого — на продукцию глюконовой кислоты. Опять обнаружилось резкое несоответствие между этими двумя кислотами. Глюконовая кислота образуется, несомненно, путем прямого окисления глюкозы и не нуждается в содействии бродильных факторов (в данном случае — фосфатов). В образовании лимонной кислоты они, очевидно, принимают прямое участие, что представляет собой серьезный аргумент в пользу бродильной теории.

О том же говорит и упомянутое выше наблюдение Сотникова, показавшего, что образование лимонной кислоты стимулируется ионом магния, который входит в состав коферментной системы брожения.

Огромная работа, проведенная в течение последнего десятилетия в целом ряде лабораторий почти всех стран по изучению проблемы генезиса органических кислот в растении, не привела пока, как мы видели, к построению общепризнанной теории. Работа продолжается. Но если она и не подошла к концу, то сделано за это десятилетие чрезвычайно много. Эта сложнейшая проблема, еще недавно находившаяся в младенческом состоянии, вышла за эти годы на столбовую дорожку строгого эксперимента, который обеспечивает возможность немедленно отсекаать беспочвенные спекуляции и создает уверенность в завтрашнем дне.

ЛИТЕРАТУРА К СТАТЬЕ С. Д. ЛЬВОВА

- Баринова и Буткевич. Микробиология, 5, 768, 1936.
- Бах А. Н. Биохимия, 1, 75, 1936. Сборник избранных трудов, 1937, стр. 165.
- Behr. Archiv f. Microbiologie, I, 418, 1930.
- Bennet-Clark a. Woodruff. Seasonal changes in acidity of the *Rhubarb (Rheum hybridum)*. New Phytolog., 34, 77, 1935.
- Bennet-Clark a. La Touche. The utilisation of organic acids by *Aspergillus niger*. New Phytolog., 34, 211, 1935.
- Bernhauer u. Slanina. Die Oxalsäurebildung aus Ameisensäure, Glycolsäure, Bernsteinsäure und anderen Säuren durch *Aspergillus niger*. Biochem. Zeitschr., 277, 97, 1934.
- Буткевич В. Über die Citronensäuregärung. Biochem. Zeitschr., 142, 195, 1923.
- Буткевич В. Biochem. Zeitschr., 145, 442, 1924.
- Буткевич В. Über d. Chinasäure verwertenden Pilze u. Bakterien. Bioch. Zeitschr., 159, 395, 1925.
- Буткевич, Менжинская и Трофимова. К биохимическому происхождению лимонной и шавелевой кислот. Сообщение 1-е. Микроб., 3, вып. 3, 319, 1934.
- Буткевич, Менжинская и Трофимова. Сообщение 2-е. Там же, 3, вып. 4, 556, 1934.
- Буткевич В. С. Сообщение 3-е. Там же, 3, вып. 4, 567, 1934.
- Буткевич и Гаевская. Выходы лимонной кислоты из сахара как основание для оценки схем ее образования из последнего. ДАН, 1935, т. III (VIII), № 9 (69), стр. 405.
- Буткевич и Осницкая. Влияние ацетата на потребление грибами пленками янтарной кислоты. ДАН, 1935, т. 4, № 8—9, 329.
- Буткевич и Осницкая. Роль муравьиной кислоты в биохимическом образовании шавелевой кислоты. ДАН, 1936, т. I (10), № 9 (86), 361.
- Chrzaszcz u. Zakomorny. Über d. Mechanismus d. Umbildung von Ameisensäure zu Oxalsäure u. Kohlensäure durch verschiedene Schimmelpilze. Biochem. Zeitschr., 279, 64, 1935.

- Chrzaszcz u. Zakomorny. Über d. Bedeutung d. Umbildung d. Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze. Там же, 285, 348, 1936.
- Chrzaszcz u. Zakomorny. Die Bedingungen der biochemischen Umbildung des Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze. Там же, 285 340, 1936.
- Emde H. Biochem. Zeitschr., 275, 373, 1935.
- Fife a. Frampton. J. Biolog. Chemistry, 109, 643, 1935.
- Foot, Fred a. Peterson. The Fermentation of pentoses by certain propionic acid Bacteria. Cbltt. Bakt. II Abt., 82, 379, 1930.
- Гудлет М. А. Труды Научно-исследовательского инст. пищевой пром. СССР. 1, 45, 1935.
- Гудлет М. А. Успехи биологической химии, вып. 12, 128, 1936.
- Кноор u. Martius. Zeitschrift f. physiol. Chemie 242, 1, 1936; 246, 1 1937 247, 104, 1937.
- Krebs u. Johnson. Enzymologie, 4, 148, 1937.
- Müller. Ergebn. d. Enzymforschungen, 5, 259, 1935.
- Сотников Е. Доклады Академии Наук, 3, 273, 279, 1934.
- Сотников Е. и Палей Т. Доклады Академии Наук, 4, 1935.
- Stare, Baumann. Proc. royal Soc., ser. B, 121, 338, 1936.
- Szent-Györgyi u. Mitarb. Biochem. Zeitschr., 162, 399, 1925; Zeitschr. f. physiol. Chemie, 224, 1, 1934; 236, 1, 1935; 244, 105, 1936; 247, 1, 1937.
- Чесноков В. Микробиология, 1, 1932.
- Virtanen. Chem. Zbl. I, 215, 1928.
- Virtanen u. Simola. Zeitschr. f. physiol. Chem., 163, 284, 1927.
- Virtanen u. Karstrom. Ann. Chim. Fenn., 7, 17, 1931.
- Virtanen u. Pullki. Ann. Acad. Sc. Fenn., Ser. A., 33, 1930; 36, 1933.
- Virtanen u. Tornanen. Biochem. Zeitschr., 250, 198, 1932.
- Virtanen. Biochemie d. Bakterien. Ann. Acad. Sc. Fenn. A, 36, Nr. 11, 1933.
- Wells, Moyer a. May. The Chemistry of the citric acid fermentation. Journal of the Amer. Chem. Soc., 58, Nr. 4, 555, 1936.
- Шмук. Использование махорки в качестве технического сырья. Брошюра. Изд. ВАСХНИЛ'а, 1936.
- Он же. Табачный и махорочный материал для получения лимонной кислоты. Всес. инст. табачн. промышл., вып. 102, 1933.
-

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть первая

	Стр.
Формы кислотности и соотношения между ними	5
Распределение среди растений важнейших органических кислот	11
Методы качественного и количественного определения органических кислот	13
Химические свойства органических кислот растений, послужившие основой для построения биологических гипотез	19
а) Щавелевая кислота	—
б) Яблочная и родственные ей кислоты	22
в) Лимонная кислота	26
Факторы, влияющие на содержание кислот в растительных тканях	28
Заключение	38
Литература к первой части	39

Часть вторая

Метаболизм суккулентных растений

Введение	41
Гипотезы, не основанные на реакциях Нейберга	43
Гипотезы, основанные на реакциях Нейберга	48
а) Общая характеристика взглядов лейпцигской школы	—
б) Периодические вариации в активности карбоксилазы у суккулентных растений	52
в) Содержание уксусного альдегида в листьях суккулентов	53
г) Соотношение между количествами потребленного сахара и образованной яблочной кислотой	54
д) Исчезновение яблочной кислоты в темноте. Лейпцигская гипотеза	58
е) Исчезновение яблочной кислоты на свету	60
ж) Итоги лейпцигской гипотезы	61
з) Гипотеза восстановления кислоты	—
и) Влияние длительного голодания на листья <i>Crassulaceae</i>	62
к) Значение дыхательного коэффициента	66
л) Влияние изменения температуры	68
м) Заключительные выводы, связанные с гипотезой восстановления	71
н) Гипотеза фотосинтеза Либиха-Баура	72
Заключение	73
Литература ко второй части	74

Часть третья

Кислотный метаболизм у плесневых грибов	76
а) Введение	—
б) Гипотеза Францена—Шмитта об образовании лимонной кислоты	80
в) Влияние азотистых веществ на образование глюконовой кислоты	82
г) Превращение 2-С соединений в 4-С и 6-С соединения	85
д) Превращение 2-С соединений в щавелевую кислоту	90
е) Максимальные выходы кислот, полученные в культурах грибов, и их значение для оценки различных теорий	92
ж) Судьба органических кислот в культурах грибов	93
з) Заключительные соображения по разделу	101
Образование растительных кислот в ходе белкового метаболизма	103
Общее заключение и выводы	107
Литература к третьей части	109
Приложение	
С. Д. Львов. Новейшие данные по химизму образования органических кислот в растений	111
Литература к статье С. Д. Львова	130

О П Е Ч А Т К И

<i>Страница</i>	<i>Строка</i>	<i>Напечатано</i>	<i>Следует</i>	<i>По чьей вине</i>
36	30 снизу	— 45	+ 45	корректора
53	6 снизу	N/2 '	2 N	„
67	15 „	N/2	2 N	„
80	12 снизу	сахарная ки- слота →	сахарная кис- лота → лимон- ная кислота → ацетондикарбо- новая	редактора