

М. А. Тер-Карпетян, чл.-корр. АН Армянской ССР, и М. Н. Малатян

Об особенностях поглощения кислорода при аэробной ассимиляции глюкозы и ксилозы размножающимися дрожжевыми организмами

(Представлено 24. IV. 1956)

Поглощение кислорода неклеточными системами, клетками в буферной или в неполноценной для оптимального роста среде является многократно изученным вопросом.

В противоположность этому значительно менее изучены динамика и количественные аспекты потребления кислорода микроорганизмами, размножающимися в полноценной среде, в частности на протяжении цикла роста культуры, т. е. от начала инкубации до истощения источников углерода. При этом, за исключением коэффициента дыхания, подробно не установлены соотношения —  $\frac{\text{потреблен-}}{\text{усвоенный источ-}}$

$\frac{\text{ный } O_2}{\text{ник углерода}}$ ,  $\frac{\text{потребленный } O_2}{\text{синтезированная биомасса}}$ , которые имеют важное значение для определения совокупности процессов ассимиляции и диссимиляции.

У размножающихся дрожжевых организмов соотношение между потребленным кислородом и усвоенным углеродистым субстратом было установлено главным образом при аэробной ассимиляции глюкозы, этилового спирта, уксусной и пировиноградной кислот (1, 2, 3). Случай же ассимиляции пентоз в качестве единственного источника углерода изучен в этом отношении весьма недостаточно.

В последние годы уделяется все больше и больше внимания изучению метаболизма пентоз как у животных и растений, так и у микроорганизмов.

Установлено, что пентозы являются обязательным этапом при аэробном распаде гексоз по „апотомическому“ пути, при котором происходит ступенчатое укорочение молекулы посредством окисления и декарбоксиляции (4, 5).

Менее изучен метаболизм пентоз как единственных источников углерода в аэробных условиях, в частности, когда основной путь пре-

вращения субстрата протекает в направлении синтеза биомассы или других ценных соединений (спирты, органические кислоты и т. п.).

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению потребления кислорода размножающимися дрожжевыми организмами из рода *Candida* в средах, содержащих глюкозу или ксилозу в качестве единственного источника углерода. Работа преследует цель—установление скорости поглощения кислорода, а также количественные соотношения между усвоенным субстратом и потребленным кислородом. Последние данные необходимы для формулировки суммарных уравнений, выражающих превращение субстратов и синтез основных продуктов при аэробной ассимиляции глюкозы и ксилозы.

*Методика исследования.* Были поставлены две серии опытов в аппарате Варбурга. В первой проводилось измерение потребленного кислорода при поглощении из атмосферы сосудиков выделенного  $\text{CO}_2$  (КОН во внутреннем цилиндрике). Условия этой серии были подобны условиям наших предыдущих опытов, где размножение микроорганизмов проводилось при медленном пропускании воздуха (10—20 мл в 1 минуту) непрерывно очищающего атмосферу сосуда от  $\text{CO}_2$  (6).

Во второй серии проводилось измерение как потребленного  $\text{O}_2$ , так и выделенного  $\text{CO}_2$  „прямым“ методом, т. е. при применении двух параллельных сосудиков, один с КОН, другой—без КОН.

Условия обеих серий опытов обеспечивали в полноценной питательной среде максимальный синтез биомассы, т. е. в процентах от усвоенного сахара около 48% для глюкозы и 57% для ксилозы (7). Это достигалось (в частности в случае глюкозы) путем смешения посевной культуры с субстратом после уравнения температуры, а также установлением скорости качания не менее 100—120 в минуту.

Объектом исследования служил штамм дрожжей из рода *Candida*, пассированный до опыта из музейной культуры на агаре с 1% ксилозой, в жидкой среде из нехмеленного сусла в течение 18—24 часов.

Размножение дрожжей проводилось в синтетической среде, содержащей источники азота, фосфора и других элементов в количествах, необходимых для максимального синтеза биомассы. Среда, компоненты которой были смешаны только перед опытом, имела следующий состав: глюкоза или ксилоза от 0,8 до 1 г,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ —0,314 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —0,083 г,  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,1 г, экстракт солодовых ростков (3 г в 100 мл кипящей воды)—3,3 мл, вода водопроводная—до 100 мл. рН этой среды равна  $5 \pm 0,5$ .

Исходя из вышеизложенных методических указаний, для каждого опыта бралось: раствора сахара—1,0 мл, раствора  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ —0,1 мл, раствора  $\text{Mg SO}_4$ —0,05 мл, экстракта ростков—0,05 мл, суспензии дрожжей в воде—1,0 мл. Общий объем жидкости в сосудиках—2,2 мл. В контрольном сосудике раствор сахара был заменен равным объемом воды.

Количество посевных дрожжей бралось около 20—50 млн. клеток в 1 мл среды. Такое количество усваивает при образовании трех

генераций около 50—80% сахара. При этом опыт продолжительностью 4—6 часов протекает целиком в логарифмической фазе роста культуры.

В начале и в конце опытов в среде были определены концентрация редуцирующих веществ (р. в.), методом феррицианида и количество дрожжей как нефелометрически, так и весовым методом после центрифугирования, промывания и сушки при 95°C дрожжевой массы.

1. *Динамика поглощения кислорода.* На рис. 1 изображена динамика поглощения кислорода (нижние кривые) размножающейся дрожжевой культурой в среде с глюкозой (кружки), с ксилозой (треугольники) и без сахара (квадраты), сопоставленная с динамикой усвоения обоих моносахаридов (верхние кривые).

Полученные результаты показывают, что динамика поглощения кислорода с начала же цикла роста культуры не имеет в абсолютных величинах особенного расхождения между средами с глюкозой и ксилозой.

Контрастирует с этим динамика усвоения исследуемых двух сахаров: ксилоза усваивается значительно медленнее, чем глюкоза. В данном случае, хотя по существу опыта нами определены только концентрации сахаров в начале и в конце опыта, но известные в литературе данные по постоянству на протяжении всей логарифмической фазы роста культуры соотношений  $\frac{\text{синтезированная биомасса}}{\text{усвоенная пища}}$ ;

$\frac{\text{выделенный CO}_2}{\text{усвоенная пища}}$ ;  $\frac{\text{поглощенный O}_2}{\text{усвоенная пища}}$  и т. п. дают нам достаточное

основание для установления кривой усвоения сахаров с ошибкой, не превышающей  $\pm 10\%$  (8, 9, 10, 11).

Кроме того, в конце опыта была проверена в среде природа остаточных сахаров методом хроматографии на бумаге.

2. *Количественные соотношения между усвоенным источником углерода, синтезированной биомассой и поглощенным кислородом в средах с глюкозой и ксилозой.* а) Опыты в отсутствии CO<sub>2</sub> в газовом пространстве сосуда (КОН во внутреннем цилиндре).

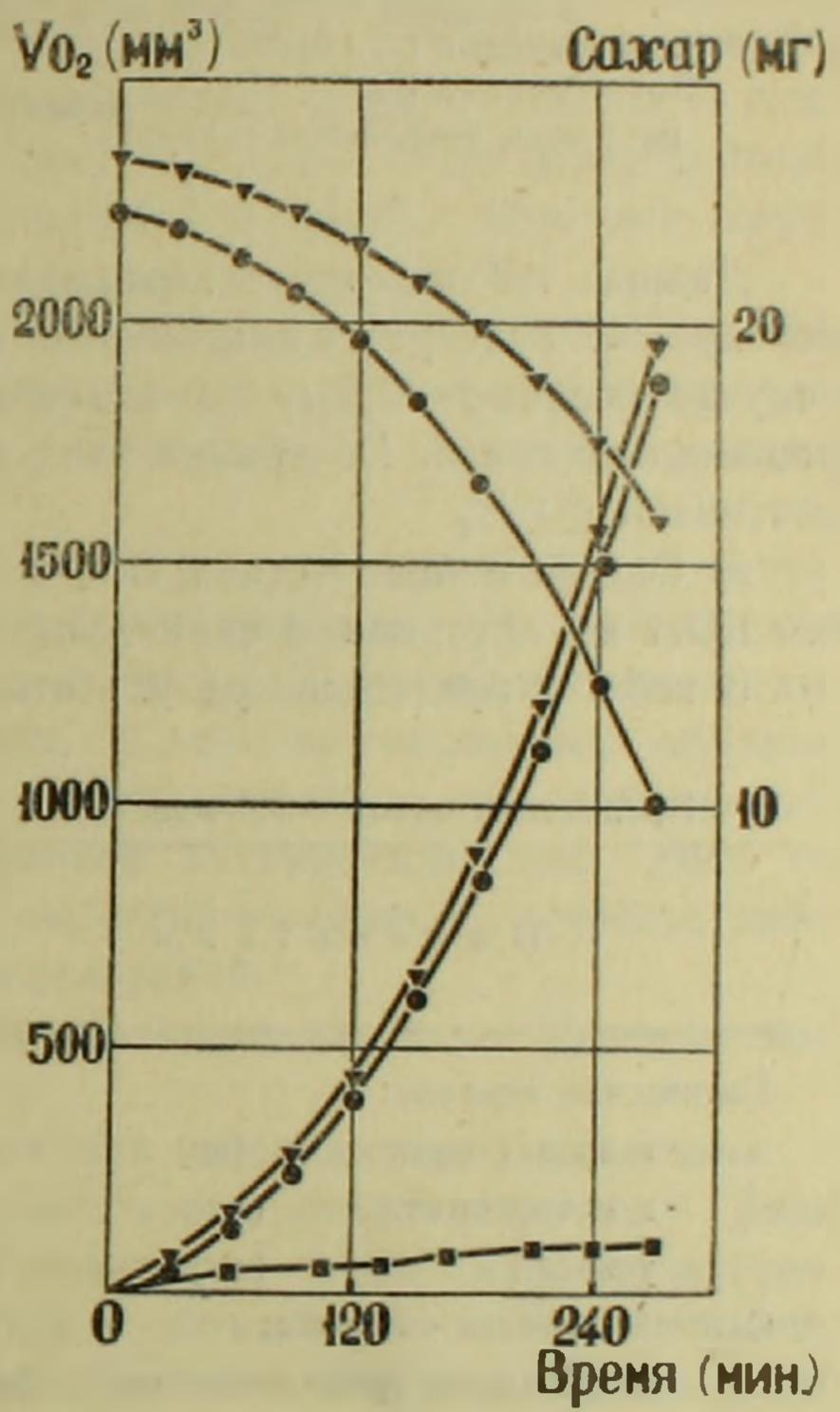


Рис. 1.

\* Источники углерода или азота.

В табл. 1 приведены результаты одного из опытов по установлению упомянутых количественных соотношений.

Таблица 1

Показатели	Источники углерода	
	глюкоза	ксилоза
Продолжит. опыта — 270 мин.      Температура $34 \pm 0,02^\circ\text{C}$		
Количество сахара:		
в начале опыта (мг)	22,2	23,3
в конце опыта (мг)	9,9	15,8
усвоенный сахар (мг)	12,3	7,5
Синтезированная биомасса:		
в абсолютно сухом веществе (мг)	5,3	4,95
в процентах от усвоенного сахара %	43,0	66,0
Потребленный $\text{O}_2$ (мг)	2,68	2,78
Потребленный $\text{O}_2$ (грамм-атом на 1 моль усвоенного сахара)	2,5	3,5

Данные таблицы четко показывают, что при аэробной ассимиляции исследуемых субстратов поглощается в случае глюкозы 2,5 грамм-атома, в случае ксилозы — 3,5 грамм-атома кислорода на один моль усвоенного моносахарида. Колебания этих величин в отдельных опытах не превышают  $\pm 10\%$ .

в) Опыты в присутствии  $\text{CO}_2$  в газовом пространстве сосуда (без КОН во внутреннем цилиндрике).

В табл. 2 приведены результаты одного из опытов с ксилозой.

Таблица 2

Показатели	Содержание внутри цилиндрика	
	без КОН	с КОН
Продолжит. опыта — 360 мин.      Температура — $34 \pm 0,02^\circ\text{C}$		
Количество ксилозы:		
в начале опыта (мг)	21,3	21,3
в конце опыта (мг)	14,04	13,8
усвоено (мг)	7,26	7,5
Синтезированная биомасса:		
в абсолютно сухом веществе (мг)	4,65	4,1
в процентах от усвоенной ксилозы (%)	64,0	54,5
Потребленный $\text{O}_2$ (мг)	—	2,8
Потребленный $\text{O}_2$ (грамм-атом на 1 моль усвоенного сахара)	—	3,5
Выделенный $\text{CO}_2$ (мг)	3,41	—
$\frac{V_{\text{CO}_2}}{V_{\text{O}_2}}$	1,03	—
Выделенный $\text{CO}_2$ (Усвоемая ксилоза (%))	47,0	—

Полученные данные показывают определенное сходство между результатами, полученными в отсутствии  $\text{CO}_2$  и при наличии  $\text{CO}_2$ , в

атмосфере сосуда что вполне оправдывает применение прямого метода измерения как потребленного  $O_2$ , так и выделенного  $CO_2$  в подобных исследованиях.

Однако в результате ассимиляции углекислоты дрожжами (<sup>12</sup>), при наличии  $CO_2$  в газовом пространстве сосуда отношение  $\frac{\text{синтезированная биомасса}}{\text{усвоенный сахар}}$  всегда выше, а отношение  $\frac{\text{выделенный } CO_2}{\text{усвоенный сахар}}$  всегда ниже, чем в случае поглощения  $CO_2$ .

При обсуждении приведенных результатов возникает вопрос — можно ли предположить существование единого пути окислительного распада глюкозы и ксилозы после апотомического отщепления карбоксильной группы глюкозы, согласно известной схеме: глюкоза  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат  $\rightarrow$  6-фосфоглюконовая кислота  $\rightarrow$   $CO_2$  + фосфопентоза.

Полученные данные по потреблению кислорода отвечают отрицательно на этот вопрос.

В случае единства между путями аэробного распада обоих моносахаридов расход кислорода должен был быть меньше при ксилозе на столько, сколько кислорода расходуется на окисление альдегидной группы глюкозы.

Факт этот, прибавляясь к ранее нами установленному, — о превосходстве выхода биомассы при усвоении ксилозы, по сравнению с глюкозой (<sup>7</sup>), указывает на то, что пути аэробного метаболизма глюкозы и ксилозы глубоко расходятся. Одним из вероятных объяснений такой особенности может быть разнозначность дихотомического и апотомического путей при аэробной ассимиляции этих двух сахаров. Последнее предположение выдвигается нами в качестве рабочей гипотезы для дальнейших исследований.

Вышеизложенные исследования приводят нас к следующим заключениям:

1. Доказано, что при размножении исследуемого организма в средах с глюкозой или ксилозой как продолжительность лаг фазы роста культуры, так и абсолютные количества потребленного кислорода в единицу времени не расходятся в обоих случаях. Тем не менее, ксилоза усваивается медленнее глюкозы и в результате этого отношение  $\frac{\text{потребленный } O_2}{\text{усвоенный сахар}}$  оказывается всегда выше при аэробном усвоении ксилозы по сравнению с глюкозой.

2. Установленное соотношение между потребленным кислородом и усвоенной глюкозой (2,5 грамм-атома кислорода на 1 моль глюкозы) ставит вопрос о пересмотре известных суммарных уравнений по аэробной ассимиляции глюкозы дрожжевыми организмами, где предлагается расход кислорода от 4 до 6 грамм-атомов кислорода на 1 моль усвоенной глюкозы.

3. Установленное соотношение между потребленным кислородом и усвоенной ксилозой — 3,5 грамм-атома кислорода на 1 моль пентозы, насколько нам известно, является новым и дает возможность устано-

вить новое суммарное уравнение аэробной ассимиляции ксилозы дрожжевыми организмами.

4. На основе представленных результатов, указывающих на глубокие расхождения между путями аэробной ассимиляции глюкозы и ксилозы, выдвигается рабочая гипотеза о значении путей дихотомического и апотомического распада в метаболизме исследуемого организма.

Институт животноводства Министерства  
сельского хозяйства Армянской ССР

Ս. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ. Ս. Ն. ՄԱԼՍԹՅԱՆ

**Բազմաօղ շաքարառնկերի կողմից գլյուկոզայի և քսիլոզայի  
ասիմիլյացիայի ընթացքում թթվածնի կլանման  
սուանձնահատկությունների մասին**

Ի՞նչ կողմից հետազոտվել են լիարժեք միջավայրում բազմաօղ *Candida* ցեղի շաքարառնկերի մոտ գլյուկոզայի և կամ քսիլոզայի աերոբ ասիմիլյացիայի ընթացքում շաքարների կլանման զինամիկան, ինչպես նաև  $\frac{\text{կլանված թթվածին}}{\text{յուրացված շաքար}}$  հարաբերությունը:

Հետազոտությունները, որոնք կատարվել են վարրուրդի մանուկետրիկ մեթոդով, հանդիս են հետևյալ եզրակացություններին:

1. Ապացուցված է, որ հետազոտված սրղանիզմը քսիլոզան յուրացնում է ավելի դանդաղորեն քան գլյուկոզան, բայց և այնպես երկու շաքարների ասիմիլյացիայի ժամանակ կլանված թթվածնի քանակների մեջ դժգոխ տարբերություններ չեն ցուցաբերվում:

2. Հաստատված է, որ գլյուկոզայի աերոբ ասիմիլյացիայի դեպքում 1 մոլ հեքսոզի դիմաց սպառվում է 2,5 դրամ-ատոմ թթվածին, իսկ քսիլոզայի դեպքում 1 մոլ պենտոզի դիմաց 3,5 դրամ-ատոմ թթվածին:

3. Ստացված արդյունքները հայտնաբերել են խորը տարբերություններ գլյուկոզայի և քսիլոզայի աերոբ ասիմիլյացիայի ճանապարհների միջև և հնարավորություն են ստեղծել հաստատելու հեքսոզների և պենտոզների աերոբ ասիմիլյացիայի երևույթները արտահայտող նոր գումարային հավասարումներ:

**ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ**

<sup>1</sup> М. Эффон, С. R. Acad. Sci. 184, 1302, 1927. <sup>2</sup> Г. Клаассен, Ztschr. d. Ver. Deutsch. Zückerind, 84, 713, 1934; Biochem. Z. 275, 350, 1934. <sup>3</sup> С. ван Ниль и А. Козм, J. Cell and Comp. Physiol., 20, 95, 1942; по Ann. Rev. Biochem. 15, 452, 1946. <sup>4</sup> В. А. Энгельгардт, Сессия АН СССР по мирному использованию атомной энергии (плев. засед.) стр. 80, Москва, 1955. <sup>5</sup> В. А. Энгельгардт и А. И. Баркаш, Биохимия, 3, 1500, 1938. <sup>6</sup> М. А. Тер-Карапетян, Изв. АН АрмССР (серия биол.) 8, 11, 33, 1955. <sup>7</sup> М. А. Тер-Карапетян, ДАН АрмССР, 22, 2, 59, 1956. <sup>8</sup> J. Monod, La Croissance de Cultures Bacteriennes, Paris, 1942. <sup>9</sup> М. А. Тер-Карапетян, Ш. А. Авакян, ДАН СССР 84, 4, 809, 1952. <sup>10</sup> А. Генричи, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 21, 343, 1923. <sup>11</sup> А. Херши, Дж. Бронфенбреннер Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 36, 556, 1937. <sup>12</sup> С. Рубен, М. Камен, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 26, 418, 1940.