

Е. А. БОЙЧЕНКО

**ПРОДУКТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ ГИДРОГЕНАЗОЙ
ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 XII 1948)

Гидрогеназа хлоропластов — фермент, при помощи которого зеленые растения восстанавливают углекислоту окислением молекулярного водорода. До сих пор он является единственным среди выделенных из растений ферментов, способным осуществлять восстановление углекислоты.

Гидрогеназа обнаружена автором в хлоропластах различных зеленых растений: *Trifolium repens*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Primula obconica*, *Pelargonium grandiflorum*, *Begonia Rex*, *Beta vulgaris*, *Aspidistra elatior*, *Dryopteris filix mas*, *Hypnum Schreberi* и др. Условия ее активности вне растения были исследованы раньше (1). В настоящей работе проводились выделения продуктов восстановления ее углекислоты.

В анаэробной среде реакция $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightleftharpoons \text{HCOOH}$ проходила при постоянном отношении $\text{H}_2 / \text{CO}_2 = 1$. Но продукт восстановления оставался на поверхности препарата и в раствор не смывался. Это затрудняло учет его количества, проводившийся по восстановлению хлорной ртути в хлористую. При испытании различных способов отделения оказалось, что при кипячении препарата после реакции в воде в течение 2 мин. продукт восстановления переходит в раствор.

Таблица 1
Отделение продукта
восстановления от хлоропластов

Поглощено $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ в мл в манометре Баркрофта	Образовалось HgCl_2 в мг	
	с хлоропластов прямо	после 2 мин. кипя- чения их в водной вытяжке
928	5,6	5,4
608	4,0	3,0
2160	13,2	12,4
1392	8,8	7,4
1184	7,0	6,0
800	5,2	4,4
1920	12,0	10,6

Из полученного раствора производились пробные отгонки с паром для испытания на муравьиную кислоту. Однако в отгонах не было

обнаружено даже следов ни муравьиной, ни какой-либо другой кислоты.

Выделить продукт восстановления удалось только осаждением водной вытяжки 2% раствором хлористого бария в 80% этиловом спирте. Испытания осажденного комплекса показали, что восстанавливающая способность исходного раствора перешла в него на 90%. Более полное осаждение получается при употреблении небольших количеств спирта, так как иначе происходит частичное растворение осадка.

Осажденный барием комплекс — аморфное вещество желтоватого цвета. В воде на холоду мало растворимо, при кипячении же образует желтоватый раствор. В эфире нерастворимо; в спирте растворимо очень слабо, выпадает из раствора при стоянии. При нагревании до 250° не плавится. Выше 250° начинается разложение.

Таким образом, продукт восстановления углекислоты гидрогеназой получается не в свободном состоянии, а входящим в состав комплекса.

По своим свойствам он похож на комплекс, описанный в результате работ с изотопами как продукт восстановления углекислоты зелеными растениями (2, 3).

В связи с этим интересно было попытаться выделить его прямо из зеленых листьев и сравнить с продуктом восстановления гидрогеназой. Для этого выделения хлоропластов из растений проводились при температурах ниже 15°. Тогда контрольные препараты и без восстановления углекислоты *in vitro* обнаруживали способность восстанавливать хлорную ртуть, так как при низкой температуре подавлялось обратимое действие гидрогеназы и предотвращался распад продукта во время выделения. Дальнейшее отделение шло, как и после ферментативного восстановления вне растения. Оказалось, что комплекс, полученный непосредственно из листьев, обладал всеми свойствами вышеописанного продукта восстановления *in vitro* — по характеру осадка, отношению к растворителям, температуре разложения. И он также оказался способным восстанавливать хлорную ртуть.

Таблица 2

Получение комплекса из разных растений

Растение	% комплекса к весу хлоропластов	Образование HgCl в мг на 10 мг комплекса
<i>Trifolium repens</i>	9,4	11,5
<i>Beta vulgaris</i>	5,5	7,0
<i>Nicotiana tabacum</i>	10,5	12,0
<i>Primula obconica</i>	10,0	7,4
<i>Helianthus annuus</i>	11,7	8,4

Количество комплекса большей частью составляло около 10% от веса хлоропластов. В случае повреждения при выделении, как, например, с листьями свеклы, хранившимися несколько часов срезанными до обработки, комплекса получается значительно меньше. По восстановлению им хлорной ртути можно рассчитать, что в хлоропластах после обычного фотосинтеза не более 1% HCOOH. После же восстановления углекислоты вне растения количество HCOOH может достигать 6—7% веса хлоропластов. Дальнейшее увеличение невозможно, так как начинается обращение восстановления.

На основании изложенного представляется вероятным, что начальное восстановление углекислоты происходит в обоих случаях одинаково, по типу восстановительного карбоксилирования. В дальнейшем, однако, принимают участие и другие окислительно-восстановительные системы; отсутствие их в опытах *in vitro* ведет к перегрузке хлоропластов первичным продуктом и вызывает обращение восстановления.

Какова же природа комплекса, с участием которого связано образование первичного продукта?

Таблица 3

Различия в составе комплекса

Растение	Золы, %	C, %	H, %	N, %	Образовалось HgCl в мг на 10 мг комплекса
<i>Helianthus annuus</i>	45,6	20,43	3,53	—	8,4
<i>Primula obconica</i>	43,5	17,55	3,78	—	7,4

Прежде всего обращает внимание большое количество золы, образовавшейся почти полностью из окиси бария. Сравнение с восстановлением хлорной ртути показывает, что прямой связи между процентом бария и восстановительными свойствами нет. Большой интерес представляет отсутствие азота, что исключает белковую природу комплекса. Так как к нему присоединяется первичный продукт восстановления, можно было предположить, что комплекс — это простетическая группа фермента гидрогеназы. Обнаружение железа в комплексах из разных растений является подтверждением этого предположения*.

Таблица 4

Обнаружение железа в комплексе

Растение	Fe	
	общий, %	в % к беззольной части
<i>Trifolium repens</i> , хлоропласты	0,027	0,028
<i>Tr. repens</i> , комплекс	0,093	0,170
<i>Helianthus annuus</i> , комплекс	0,196	0,360
BaCl ₂ , соль	0,0007	—

Процент содержания железа в комплексе в несколько раз выше, чем в хлоропластах, в него переходит около одной трети всего железа пластиды. Другим подтверждением высказанного предположения о природе комплекса как части фермента гидрогеназы, являются опыты с подавлением ферментативного восстановления углекислоты цианистым калием 10^{-2} М. Эта же концентрация подавляет обычно фотосинтез, вероятно, именно через инактивирование гидрогеназы.

Общее количество углекислоты, поглощаемой обратимо в темноте разными растениями, колеблется, по данным ряда авторов, от 0,08 до 0,4% от сухого веса листьев. Согласно новейшим данным, эта

* Определения проводились микроколориметрическим методом с роданистым аммонием Н. В. Блюер, за что автор пользуется случаем выразить ей благодарность

темновая фиксация углекислоты зелеными растениями является началом всего ассимиляционного процесса. Интересно сравнить, что при восстановительном карбоксилировании гидрогеназой хлоропластов углекислоты поглощается от 0,1 до 0,6% при расчете на сухой вес листьев, т. е. как раз то же количество, что и при всей темновой фиксации. Локализация ее в хлоропластах еще раз подтверждает, **каким** мощным „депо биокатализаторов“ являются пластиды (4).

Институт геохимии и аналитической химии
им. В. И. Вернадского и
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
2 XII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Е. Бойченко, Биохимия, 13, в. 3, 219 (1948). ² S. Ruben, M. Kamen and W. Hassid, J. Am. Chem. Soc., 62, No. 12, 3443 (1940). ³ M. Allen, H. Gest and M. Kamen, Arch. Biochem., 14, No. 3, 335 (1947). ⁴ Н. Сисакян и А. Кобякова, Биохимия, 13, в. 1, 88 (1948).