

БИОХИМИЯ

А. М. КУЗИН и Р. Я. ШКОЛЬНИК

**ОБ УЧАСТИИ АЛЬДУРОНОВЫХ КИСЛОТ В ПРОЦЕССЕ  
ФОТОСИНТЕЗА**

(Представлено академиком А. И. Опарином 4 V 1950)

В предыдущих сообщениях (<sup>1</sup>) нами было показано, что в зеленом листе растения присутствуют непрочные соединения, обнаруживаемые по реакции с гидроксиламином. Образующиеся в присутствии гидроксиламина гидроксамовые кислоты были изолированы, причем положительная реакция Молиша на углеводы и реакция с нафтогорезорцином говорили об углеводной природе выделяемых веществ. Дальнейшее исследование показало, что при нагревании со щелочью изолированная гидроксамовая кислота разлагается с выделением аммиака, а оставшаяся углеводная часть дает реакцию с нафтогорезорцином в солянокислой среде, причем образующееся окрашенное вещество извлекалось эфиром и бензолом (красно-фиолетовое окрашивание), что характерно для альдуроновых кислот (<sup>3</sup>). Это наблюдение побудило нас ближе исследовать роль альдуроновых кислот в процессе фотосинтеза.

Согласно работам Рубен с сотрудниками (<sup>2</sup>), при фиксации на свету угольного ангидрида с меченным углеродом он обнаруживается в водной вытяжке, не адсорбируется тальком, не извлекается эфиром и амиловым спиртом и полностью осаждается из 80% спиртового раствора хлористым барием. Исходя из вышеприведенных соображений, нам казалось интересным исследовать фракцию, содержащую, по Рубену, меченный углерод, на наличие в ней альдуроновых кислот. Применялся следующий метод: 10 г листьев опускались в 100 мл кипящей воды. После 2-минутного кипячения листья растирались в той же воде и отжимался сок. В полученном соке взмучивали 4 г талька, после чего фильтровали под давлением.

Прозрачный фильтрат 3 раза извлекался эфиром (по 25 мл) и 3 раза изоамиловым спиртом (по 20 мл). Водный раствор сгущался в вакууме до 5 мл, отфуговывался от небольшого осадка и осаждался 25 мл 96% этилового спирта. Выпавший нерастворимый в образовавшемся 80% спирте осадок (фракция А) удален, а фильтрат осаждался насыщенным раствором хлористого бария в 80% спирте.

Получаемый осадок (фракция Б) отфуговывался, промывался 96% спиртом, затем эфиром и высушивался. Осадок Б исследовался на присутствие уроновых кислот реакцией с нафтогорезорцином с последующим извлечением бензолом (<sup>3</sup>). Были исследованы листья примулы, пшеницы, белого клевера, рдеста. Всюду изолируемая фракция Б давала характерную реакцию на уроновые кислоты: красно-фиолетовое окрашивание бензольного раствора в реакции с нафтогорезорцином.

Реакции на пировиноградную кислоту, с салициловым альдегидом и на глиоксалевую кислоту по Фоссе (<sup>7</sup>) были отрицательны. По данным Гаффрана и др. (<sup>4</sup>), фракция, содержащая меченный углерод при его фиксации на свету, не подвергается изменениям в темноте и в то же время легко изменяется при освещении. Е. А. Бойченко (<sup>9</sup>) была пока-

зана возможность восстановления фиксированной хлоропластами углеводородом.

Учитывая эти работы и исходя из предположения, что наблюдаемые альдуроновые кислоты образуются в результате фиксации  $\text{CO}_2$ , были поставлены следующие опыты: зеленые листья нормально ассимилирующего растения были разделены на две части по 10 г в каждой. Первая помещалась в атмосферу воздуха, содержащего 10% угольного ангидрида, где она сохранялась в полной темноте. Вторая половина помещалась в атмосферу воздуха, не содержащего  $\text{CO}_2$ , или в атмосферу водорода, постоянно сменяемого для удаления следов  $\text{CO}_2$ , образующихся за счет дыхания, и находилась в условиях интенсивного освещения (500 свечей на расстоянии 20 см, водяное охлаждение). Температура обоих опытов 18–20°. По прошествии некоторого времени листья из обоих опытов быстро переносились в 100 мл кипящей дестиллированной воды.

Через 2 мин. кипение прекращалось и получалась фракция Б по описанному выше методу. Фракция Б растворялась в 2 мл воды, подкисленной  $\text{HCl}$ , и 0,5 мл полученного раствора исследовались на содержание альдуроновых кислот реакцией с нафтрезорцином с последующим извлечением бензолом. Были получены результаты, представленные в табл. 1. В отдельных опытах бензольные вытяжки сравнивались в ступенчатом фотометре, и в таблице приведены экстинкции при измерении в кювете толщиной в 0,25 см со светофильтром S-53.

Таблица 1

№ опыта	Испытуемое растение	Атмосфера, в которой освещались листья	Время экспозиции	Окраска бензола в реакции на альдуроновые к-ты с фр. Б	
				световые	темновые
1	Примула	Воздух без $\text{CO}_2$	1 ч.	Не окрашен	Красно-фиолет.
2		То же	1 ч.	Не окрашен, 0,00	Красно-фиолет., 0,18
3	Белый клевер	Водород	1 ч.	Окрашивание, в следах 0,00	Интенсивн. красно-фиолет., 0,15
4	Белый клевер	"	1 ч. 30 м.	Слаб. красно-фиолет.	Интенсивн. красно-фиолет.
5	Рдест	Прокипяч. вода, ток водорода	2 ч.	Желтое, окрашивание слаб.	Интенсивн. красно-фиолет.

Как видно, альдуроновые кислоты, всегда присутствующие во фракции Б, не изменяются при хранении листа в темноте, но исчезают полностью или частично при освещении листа в отсутствие  $\text{CO}_2$ , т. е. в условиях, благоприятных для восстановления карбоксильной группы.

Дальнейшие опыты были проведены с ростками пшеницы. После прорастания в полной темноте ростки разделялись на две порции: одна продолжала расти в темноте, в то время как другая выставлялась на дневной свет. После того как ростки на свету полностью позеленели, т. е. в них начался фотосинтез, темновые и световые ростки фиксировались опусканием в кипящую воду. После 2-минутного кипячения ростки удалялись, а полученная прозрачная слабо окрашенная водная вытяжка сгущалась в вакууме и из нее получалась фракция Б. В некоторых опытах полученные водные вытяжки осаждались нейтральным уксуснокислым свинцом для удаления окрашенных веществ, осадок отфильтровывался, свинец удалялся сероводородом и после удаления сероводорода из раствора выделялась фракция Б. Были получены следующие результаты (см. табл. 2).

Реакция на альдуроновые кислоты с тиогликоловой кислотой<sup>(6)</sup> (опыт 5) дала положительный результат с фракцией Б в световом опыте и отрицательный в темновом.

Таблица 2

№ опыта	День прорастания	Характер обработки	Получено фракции Б в мг		Окраска бензола в реакции на альдуроновые к-ты с фр. Б	
			свет	темнота	свет	темнота
1	10	Фракционирование водной вытяжки	27,5	26,5	Интенсивн. красно-фиолет.	Не окрашен
2	8	После осаждения свинцом . . .	12,0	5,6	То же	Следы
3	8	То же . . . . .	10,8	6,0	"	"
4	7	Фракционирование водной вытяжки	24,8	12,0	Красно-фиолет., 0,59	Желтое слабое
5	10	То же . . . . .	45,6	26,4	Интенсивн. красно-фиолет., 0,27	Желто-буровое
						0,45

Как видно из приводимых данных, в молодых проростках, еще не осуществлявших фотосинтез, во фракции Б почти полностью отсутствуют альдуроновые кислоты. Они появляются при освещении проростков после их позеленения, т. е. в условиях начавшегося фотосинтеза. Эти эксперименты указывают на наличие связи между фотосинтезом и альдуроновыми кислотами фракции Б.

Учитывая работы Е. А. Бойченко (5) о возможности осуществления первых реакций фотосинтеза с хлоропластами, нам представлялось интересным проследить наличие альдуроновых кислот во фракции Б, полученной из изолированных хлоропластов. Неповрежденные хлоропласти получались по методу Бойченко в виде пленок на фильтровальной бумаге. Взятая в опыт бумага предварительно трижды извлекалась дистиллированной водой при 100°. Пленки хлоропластов опускались в кипящую воду на 2 мин. Из профильтрованных вытяжек получалась фракция Б. Ее исследование дало следующие результаты (см. табл. 3).

Таблица 3

№ опыта	Растение для изолирования хлоропластов	Условия экспозиции хлоропластов	Выделение фракции Б	Окраска бензола в реакции на альдуроновые к-ты с фр. Б
1	Примула, 30 г	Свежевыделенные хлоропласти	Небольшой осадок. Не взвешивали	Красно-фиолет.
2	Белый клевер, 100 г	То же	3,6 мг	Слаб. красно-фиолет.
	Контроль с фильтровальной бумагой	"	Следы	Окрашивания нет
3	Табак, 55 г	"	Небольшой осадок	Слаб. красно-фиолет.
4	Белый клевер, 100 г Выделенные хлоропласти разделены на 2 опыта поровну и в течение 1 ч. 30 м. выдерживаны	1) В темноте в атмосфере воздуха с 10% CO <sub>2</sub> 2) В атмосфере водорода при освещении 500 свечей	Осадки Б не взвешивались	Красно-фиолет. Окрашивания нет

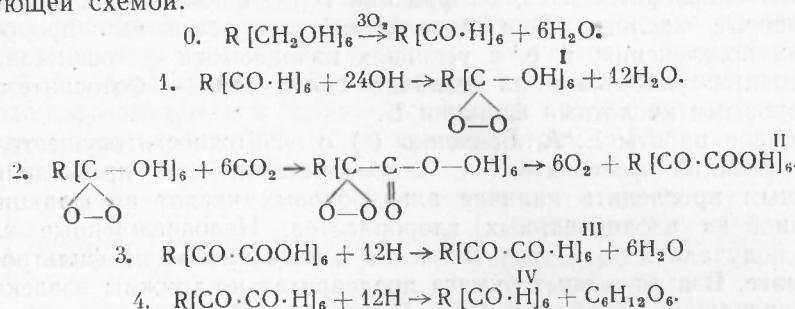
Суммируя результаты, полученные в настоящей работе, мы видим, что альдуроновые кислоты обнаруживаются в той фракции, которая содержит, по литературным данным, первые продукты ассимиляции CO<sub>2</sub> при фотосинтезе. Эти кислоты сохраняются в темноте и их количество

заметно снижается в этой фракции при освещении без доступа  $\text{CO}_2$ . Эти же отношения найдены и при исследовании изолированных хлоропластов.

Для образования во фракции Б альдуроновых кислот в проростках пшеницы необходим свет.

Сопоставляя полученные результаты с нашими прежними наблюдениями о наличии в зеленом листе нестойких соединений, обладающих свойствами перекиси и образующих с гидроксиламином гидроксамовые кислоты, при щелочном гидролизе которых образуется альдуроновая кислота, нам кажется вероятным предположение об участии этих кислот в процессе фотосинтеза.

Если принять во внимание характерный для растения процесс окисления полисахаридов в полиуроновые кислоты и предположить, что это окисление идет с промежуточным образованием перекисей, то весьма вероятно, что именно непрочные связи в перекисях обуславливают фиксацию  $\text{CO}_2$  в процессе фотосинтеза. В качестве рабочей гипотезы участие альдуроновых кислот в фотосинтезе может быть представлено следующей схемой:



Здесь R — остаток сложного углевода, быть может, соединенного и с неуглеводными веществами.

Образование I объясняет реакции с гидроксиламином неповрежденного листа. Фракция Б содержит II, дающее реакцию альдуроновых кислот. Наблюданное нами исчезновение уроновых кислот во фракции Б в условиях светового восстановления объясняется реакцией 3. Полупродукт III будет обуславливать реакции восстановления, описанные Е. А. Бойченко при фиксации  $\text{CO}_2$  хлоропластами в атмосфере водорода.

Предположение, что молекула простого сахара создается как бы на «станке» углеводной природы, позволяет понять, почему среди разнообразия всевозможных стереоизомеров синтезируются только строго определенные.

Пространственная конфигурация «станка» обуславливает определенную пространственную конфигурацию синтезируемых при фотосинтезе углеводов. В процессе синтеза углеводный «станок» IV все время регенерируется и вновь вступает в реакцию. Реакция нулевая необходима только для начала фотосинтеза и требует наличия кислорода. Затрудненность реакций 1 и 2 в отсутствие света стоит в соответствии со сделанными нами наблюдениями о меньшем количестве перекисей и почти полном отсутствии альдуроновых кислот во фракции Б в проростках, не подвергавшихся освещению.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР

Поступило  
10 IV 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. М. Кузин и Р. Я. Школьник, ДАН, **59**, 941 (1948); **65**, 527 и 719 (1949).
- <sup>2</sup> S. Ruben, M. Kamen and W. Hassid, Journ. Am. Chem. Soc., **62**, 3443 (1940).
- <sup>3</sup> C. Neuberg, Biochem. Zs., **36**, 56 (1911). <sup>4</sup> A. Bloch, E. Tager and H. Gaffron, Arch. Biochem., **19**, 447 (1948). <sup>5</sup> Е. А. Бойченко, ДАН, **38**, 200 (1943); **64**, 545 (1948). <sup>6</sup> Z. Dische, Journ. Biol. Chem., **171**, 725 (1947). <sup>7</sup> R. Fosse et H. Heili, C. R., **179**, 637 (1924).