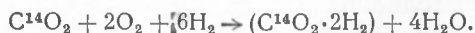


Член-корреспондент АН СССР А. П. ВИНОГРАДОВ,  
Е. А. БОЙЧЕНКО и В. И. БАРАНОВ

### ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ, МЕЧЕННОЙ $C^{14}$ , ХЛОРОПЛАСТАМИ ВНЕ КЛЕТКИ

Применение изотопов кислорода и углерода к изучению химизма фотосинтеза сделало возможным более детальное выяснение отдельных реакций этого важнейшего природного процесса. Так, А. П. Виноградов и Р. В. Тейс при исследовании изотопного состава кислорода разного происхождения показали, что в фотосинтезе кислород образуется дегидрогенизацией воды, а не выделением его из углекислоты непосредственно (1). В результате опытов по восстановлению растением углекислоты, содержащей радиоактивный изотоп углерода  $C^{11}$  или  $C^{14}$ , оказалось, что одновременно с усвоением радиоактивной углекислоты хлоропластами шло поглощение ее и другими системами клетки (2, 3). Избежать подобных осложнений можно было бы при выделении из растений хлоропластов, способных к внеклеточному восстановлению углекислоты. Такие препараты впервые были получены несколько лет назад в нашей лаборатории. С ними были изучены условия восстановления углекислоты вне клеток водородом, активируемым ферментом гидрогеназой (4).

В настоящих опытах разделение продуктов восстановления шло по ранее опубликованной схеме (4); различие в методике состояло в том, что в манометрические сосуды с хлоропластами белого клевера или примулы вводилась вместо обычной углекислота, помеченная радиоактивным углеродом  $C^{14}$ , из  $BaCO_3 + BaC^{14}O_3$ . Вместе с углекислотой в манометры вводилось около 2% кислорода по объему, так как при их одновременном восстановлении гидрогеназой образуются более стойкие продукты, как то было установлено в ряде работ с бактериями, а также в прежних опытах нашей лаборатории (5). Ферментативное восстановление, на основании анализа поглощаемых газов, шло по следующей, известной и для водорослей реакции:



После окончания реакции, длившейся обычно минут 30, непрореагировавшая углекислота поглощалась раствором едкого натра. Затем определялось распределение  $C^{14}$  между непрореагировавшей углекислотой и отдельными фракциями опытного материала. Все измерения радиоактивности проводились с высушенными препаратами. Толщина слоя препаратов составляла всегда около 10 мг вещества на 1 см<sup>2</sup>. Числа импульсов даны за вычетом фона. Принцип работы с радиоактивными индикаторами (мечеными атомами) считаем общеизвестным.

Существенного разделения изотопов углерода в рассматриваемом процессе быть не должно.

В контрольных опытах с хлоропластами, кипяченными с водой до начала опытов, ни сами хлоропласты, ни получаемые из них вытяжки не обнаруживали и следов радиоактивного индикатора. В опытах с неповрежденными хлоропластами, напротив, после поглощения углекислоты, кислорода и водорода по приведенному уравнению весь  $C^{14}$  обнаруживался в продуктах, переходящих в вытяжку, получаемую 2-минутным кипячением хлоропластов с водой.

Таблица 1  
Поглощение радиоактивного индикатора

В вытяжке из хлоропластов, в %	В непрореагировавшей углекислоте, в %	Общее число импульсов в мин.
Контрольные хлоропласты после кипячения с водой		
0	100	184
0	100	371
Неповрежденные хлоропласты		
100	0	116
100	0	265
100	0	98
99	1	145

т ех случаях, где адсорбция углекислоты хлоропластами не сопровождалась ее восстановлением водородом, вся радиоактивная углекислота выделялась обратно при кипячении.

При обработке вытяжки раствором хлористого бария в 80% этиловом спирте радиоактивный индикатор почти полностью оказывался в осаждаемом барием комплексе (см. табл. 2). Таким образом, имелись основания искать именно в нем продукты восстановления углекислоты.

Как было установлено и ранее (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>), этот комплекс не содержал азота. В нем было обнаружено 0,61% фосфора и состоял он в основном из веществ углеводного характера, дающих, например с нафторезорцином, яркую реакцию на уроновые кислоты. Количественное определение их производилось по восстановлению меди (<sup>6</sup>) с последующим расчетом восстановленной меди по таблицам для уроновых кислот. Одновременно производились определения карбоксильных групп со спиртовым раствором едкого натра (<sup>7</sup>) (см. табл. 3).

У хлоропластов, выделенных из листьев в солнечные дни, после интенсивного фотосинтеза около 75% комплекса состояло из уроновых кислот. Определения карбоксильных групп показывали, что, кроме уроновых кислот, здесь находились и другие карбоновые кислоты с большим содержанием карбоксильных групп. Это становилось особенно заметно при выделении хлоропластов из листьев, собранных в пасмурную погоду, когда процент таких веществ в комплексе возрастал по сравнению с процентом уроновых кислот. Представляется вероятным, что в условиях ослабленного фотосинтеза накапливаются карбоновые кислоты более простого строения, чем уроновые, неспособные к восстановлению меди и являющиеся предшественниками уроновых кислот. Общее же количество уроновых кислот хлоропластов

Таблица 2  
Распределение радиоактивного индикатора в вытяжке из хлоропластов

В бариевом комплексе, в %	В спиртовом растворе, в %	Общее число импульсов в мин.
95	5	238
83	13	218
80	20	73
96	4	121

У хлоропластов, выделенных из листьев в солнечные дни, после интенсивного фотосинтеза около 75% комплекса состояло из уроновых кислот. Определения карбоксильных групп показывали, что, кроме уроновых кислот, здесь находились и другие карбоновые кислоты с большим содержанием карбоксильных групп. Это становилось особенно заметно при выделении хлоропластов из листьев, собранных в пасмурную погоду, когда процент таких веществ в комплексе возрастал по сравнению с процентом уроновых кислот. Представляется вероятным, что в условиях ослабленного фотосинтеза накапливаются карбоновые кислоты более простого строения, чем уроновые, неспособные к восстановлению меди и являющиеся предшественниками уроновых кислот. Общее же количество уроновых кислот хлоропластов

при этом может не уменьшаться, так как одновременно происходит возрастание количества не связанных с комплексом уроновых кислот, остающихся в спиртовом растворе после осаждения барием комплекса, сопровождаемое уменьшением кетоз в хлоропластах (см. табл. 4).

В отличие от изложенных выше коротких опытов внеклеточного восстановления  $C^{14}O_2$ , после которых около 90% поглощенного  $C^{14}$  обнаруживалось в комплексе, в более длительных опытах до 70%  $C^{14}$  переходило в спиртовой раствор, содержащий кетозы. Таким образом, наблюдается как бы известная последовательность в образовании продуктов хлоропластами: карбоновые кислоты, не восстанавливающие меди, затем уроновые кислоты и, наконец, кетозы.

Значение уроновых кислот как промежуточных продуктов фотосинтеза, предшествующих образованию сахаров, было также обнаружено А. М. Кузиным и Р. Я. Школьник при работе с различными целыми растениями<sup>(8)</sup>. Ими было показано, что нафторезорциновая проба особенно ярко удавалась в условиях задержки фотосинтеза. Эти наблюдения находят подкрепление в данных табл. 4 настоящей работы.

Следует помнить, что все превращения радиоактивной углекислоты на поверхности хлоропластов происходили в связи с содержащей железо простетической группой фермента гидрогеназы.

Выводы. 1. Применение  $C^{14}$  позволило проследить вне клеток с хлоропластами, выделенными из листьев белого клевера и примулы, превращение углекислоты в сложные органические вещества. Это ферментативное восстановление происходило в атмосфере водорода.

2. При отделении от хлоропластов продуктов восстановления углекислоты с последующим осаждением хлористым барием около 90% всего поглощенного  $C^{14}$  оказалось в бариевом комплексе.

3. Анализ этого комплекса обнаружил в нем около 75% уроновых кислот, а также карбоновые кислоты с большим процентом карбоксильных групп, не восстанавливающие меди, и негидролизуемый остаток, не содержащий  $C^{14}$ .

Институт геохимии и аналитической химии  
им. В. И. Вернадского  
Академии наук СССР

Поступило  
19 III 1951

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. П. Виноградов и Р. В. Тейс, ДАН, **33**, 497 (1941); **56**, 57 (1947).  
<sup>2</sup> A. Benson and M. Calvin, Ann. Rev. Plant Physiol., **1**, 25 (1950). <sup>3</sup> E. Fager, J. Rosenberg and H. Gaffron, Federal Proc., **9**, 535 (1950). <sup>4</sup> Е. А. Бойченко, ДАН, **64**, 545 (1949); **70**, 1037 (1950). <sup>5</sup> Е. А. Бойченко, Восстановление углекислоты гидрогеназой хлоропластов, Автореферат докторской диссертации, М., 1950.  
<sup>6</sup> Д. И. Лисицын, Биохимия, **15**, 165 (1950). <sup>7</sup> Д. В. Нидерль, Микрометоды количественного органического анализа, М.—Л., 1949. <sup>8</sup> А. М. Кузин и Р. Я. Школьник, ДАН, **73**, 355 (1950).

Таблица 3

Определение уроновых кислот в комплексе

Даты выделения	В % к весу хлоропластов	
	уроновые кислоты	карбоксильные группы
7 VI	4,29	1,56
12 VII	5,07	1,56
11 IX	0,84	0,86
22 IX	0,93	1,22

Таблица 4

Определение уроновых кислот в спиртовом растворе

Даты выделения	В % к весу хлоропластов	
	уроновые кислоты	кетозы по методу Кольтгофа
7 VI	0,7	8,2
12 VII	0,5	8,9
11 IX	4,9	7,3
22 IX	3,8	5,6

не углекислоты в сложные органические вещества. Это ферментативное восстановление происходило в атмосфере водорода.