

Н. Г. ДОМАН

## К ВОПРОСУ О ПРИРОДЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ФОТОСИНТЕЗА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 19 IV 1952)

Раскрытие химизма фиксации угольного ангидрида зелеными растениями и выяснение природы первых продуктов, образующихся при этой фиксации, является существенным моментом познания всего процесса фотосинтеза. За последнее десятилетие был установлен ряд новых фактов, однако выводы, делаемые из этих фактов различными исследователями, противоречивы и не всегда достоверны. Так например, в настоящее время существуют различные мнения о природе промежуточных продуктов фотосинтеза, образующихся за короткое время фиксации угольного ангидрида. В то время как авторы одних работ (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>) в качестве основного промежуточного продукта фотосинтеза выделяли соединения высокомолекулярного типа, другие (<sup>3</sup>) таким продуктом считают фосфоглицериновую кислоту, образующуюся в их опытах в наибольшем количестве. Согласно последним сообщениям (<sup>4</sup>), Гафрон, а также Фагер и Розенберг (<sup>5</sup>), которым не удавалось ранее выделить фосфоглицериновую кислоту, теперь получили ее как главную составную часть образовавшихся в их опытах продуктов.

Считая вероятным, что различие результатов, полученных в указанных выше работах, объясняется прежде всего различием объектов и условий исследований, мы считаем необходимым сделать несколько замечаний методического характера.

Рассматривая последовательность образования промежуточных продуктов фотосинтеза как функцию времени, исследователи, применявшие в своих работах метод меченых атомов, не добивались максимального сокращения времени фиксации угольного ангидрида, хотя известно (<sup>4</sup>), что уже за 5—10 сек. экспозиции в растениях может быть обнаружен целый ряд образовавшихся за это время веществ. Не всегда также в подобных опытах создавались для растений нормальные физиологические условия, к которым так чувствителен процесс фотосинтеза.

Настоящее исследование предпринято с целью выяснения природы промежуточных продуктов фотосинтеза у высших растений и проводилось на листьях двухнедельных проростков фасоли (*Phaseolus vulgaris*). Перед опытом растения в течение нескольких часов нормально фотосинтезировали на свету ламп накаливания 800 вт, находившихся от них на расстоянии 50—70 см. Еще за несколько секунд до начала опыта листья оставались на растениях, которые были на собственных корнях в песчаной почве. Отобранные листья помещались в воздушную камеру, содержащую 0,5% CO<sub>2</sub> с радиоактивным углеродом C<sup>14</sup>. Чтобы получить более четкую картину последовательности образования продуктов фотосинтеза, которая должна проявиться в зависимости от вре-

мени экспозиции, листья выдерживались в камере с  $C^{14}O_2$  лишь около 1 сек., после чего мгновенно переносились во вторую камеру, содержащую эквивалентную концентрацию немеченого  $CO_2$ , в которой продолжалась экспозиция в соответствии с планом опыта. В этих опытах не допускалось занесения меченого  $CO_2$  во вторую камеру, в которой листья находились более длительное время. Опыты проводились при температуре воздуха в камерах, равной 18—20°.

По истечении времени экспозиции листья быстро убивались погружением в кипящую воду и кипятились 2 мин. Листовой материал еще дважды экстрагировался водой, раствор отфильтровывался, экстрагировался эфиром и выпаривался в вакууме при 40° досуха. Вещество растворялось в небольшом количестве воды, и полученный опалесцирующий раствор доводился до определенного объема. Часть раствора отделялась для определения в ней радиоактивности. К оставшейся основной части раствора прибавлялся спирт с таким расчетом, чтобы концентрация его в растворе была доведена до 80%. При этом выпадал желтый хлопьевидный осадок (фракция А), который отделялся центрифугированием. Таким же образом из полученного раствора отделялась следующая фракция Б после осаждения ее спиртовым раствором  $BaCl_2$ . Полученный раствор снова выпаривался в вакууме досуха при температуре ниже 40°, затем остаток растворялся в воде с таким расчетом, чтобы получить первоначальную концентрацию оставшихся веществ в растворе. Имевшийся иногда небольшой избыток  $Ba^{++}$  осаждался продуванием через раствор углекислого газа. Дальнейшее разделение веществ на фракции производилось с помощью ионообменников, сначала на катионите, затем на анионите. Радиоактивность всех выделенных фракций измерялась на электронном счетчике и рассчитывалась в процентах по отношению к общей радиоактивности, измеренной в первоначальном растворе и в листовом материале после его извлечения водой. Были проведены опыты с различным временем экспозиции листьев — от 0,5 до 300 сек. Особое внимание обращалось на самые короткие экспозиции 0,5 и 1 сек., время в которых засчитывалось от начала экспозиции в атмосфере меченого  $C^{14}O_2$  до момента погружения листьев в кипящую воду. Результаты проведенных опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Продолжит. экспозиции на свету в сек.		Процент радиоактивности во фракциях									
в меченом $CO_2$	в немеченом $CO_2$	нерастворимо в воде	растворимо в воде	фракция А, осаждено 80% спиртом	растворено в 80% спирте	фракция Б, осаждено $BaCl_2$ в 80% спирте	растворено после осаж. фракции Б	на катионите	на анионите	нейтральных веществ в растворе	растворимо в эфире
до 0,5	0	0,1	99,0	94,3	8,2	4,2	6,0	1,2	4,8	0,0	0,0
1	0	0,3	99,7	91,4	11,7	2,9	10,2	2,0	8,0	0,2	0,0
1	1	1,2	98,8	85,3	16,0	2,1	15,4	4,0	8,1	3,3	0,0
1	2	1,0	99,0	74,4	34,4	5,4	25,2	8,5	9,5	7,2	0,0
1	3	1,7	98,3	85,4	21,3	1,9	19,5	6,8	9,1	3,6	0,0
1	4	1,4	98,6	70,1	29,7	4,2	27,4	8,3	13,6	5,5	0,0
1	9	2,4	97,6	64,7	38,2	10,8	31,0	13,1	11,8	6,1	0,0
1	14	4,8	95,2	65,5	43,5	3,2	39,9	13,4	17,0	9,5	0,0
1	19	5,2	94,8	60,8	37,9	5,8	30,6	9,3	15,1	6,2	0,0
1	29	6,0	94,0	63,4	35,0	7,4	33,1	14,0	10,5	8,6	0,0
1	59	9,6	90,4	50,2	44,1	2,7	40,7	10,6	17,1	13,0	0,4
1	299	23,5	76,5	38,0	45,6	3,0	43,0	12,7	11,6	18,6	1,0

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что весь меченый углерод при самых коротких экспозициях переходит в раствор, из которого

свыше 90% его осаждается спиртом во фракцию А. По мере удлинения экспозиции в нерадиоактивной углекислоте, первоначально фиксированный  $C^{14}$  переходит из фракции А в нерастворимые в воде соединения и в вещества, растворимые в 80% спирте.

Фракция Б не обнаруживает закономерных изменений со временем. Здесь следует подчеркнуть, что эта фракция по методу получения отличается от фракции Б, описываемой в работах (1, 6). Можно предположить, что вещества фракции Б указанных авторов могут попасть во фракцию А из-за коагуляции их при высушивании.

При 0,5-секундной экспозиции до 6% меченого углерода оказалось в фракции, не осаждаемой  $BaCl_2$  из 80% спиртового раствора. Удлинение времени экспозиции приводит к быстрому увеличению количества меченого углерода в этой фракции. Ее дальнейший анализ на ионообменниках показывает наличие радиоактивных веществ как катионной, так и анионной природы; количество последних явно преобладает в опытах с короткой экспозицией. Меченый углерод не обнаруживается в нейтральных веществах типа сахаров при короткой экспозиции до 1 сек.; с удлинением экспозиции его количество в этой фракции постепенно нарастает.

Чтобы выяснить роль света в процессе дальнейшего превращения продуктов фиксации  $CO_2$ , содержащихся во фракции А, была проведена серия темновых опытов, в которых листья после 1-секундной фиксации меченого  $CO_2$  при освещении перемещались в темную камеру с эквивалентной концентрацией немеченого  $CO_2$  и находились в ней различное время. В результате разделения на фракции были получены следующие данные (см. табл. 2).

Таблица 2

Продолжит. экспозиции в сек.		Процент радиоактивности во фракциях									
в меченом $CO_2$ , свет	в немеченом $CO_2$ , теплота	нерастворимо в воде	растворимо в воде	фракция А, осаждено 80% спиртом	растворимо в 80% спирте	фракция Б, осаждено $BaCl_2$ в 80% спирте	растворено после осаж. фракции Б	на катионите	на анионите	нейтральных веществ в растворе	растворимо в эфире
до 1	0	0,3	99,7	91,4	11,7	2,9	10,2	2,0	8,0	0,2	0,0
1	4	1,7	98,3	78,0	25,6	8,5	13,7	4,8	6,9	2,0	0,0
1	29	0,3	99,7	47,7	54,5	6,1	45,2	26,0	16,5	2,7	0,0
1	59	0,4	99,6	45,9	53,8	10,2	43,1	24,5	17,5	11,1	0,0
1	299	3,5	96,5	36,1	62,4	12,8	50,5	19,2	16,0	15,3	0,0

Как видно из табл. 2, картина распределения радиоактивного углерода в темновых опытах в общем очень напоминает распределение в световых опытах. Исключение составляет нерастворимая фракция, остающаяся в листьях. На свету эта фракция по мере удлинения экспозиции значительно увеличивается, а в темноте остается почти без изменений. В данном исследовании мы ограничивались групповым определением веществ по фракциям, не касаясь динамики индивидуальных веществ, которая может быть очень резко выражена в отдельных фракциях и особенно в различных сериях опытов с темновой и световой экспозицией. Однако столь близкое сходство в распределении радиоактивности в большинстве фракций световых и темновых опытов подтверждает наблюдение, сделанное Кальвином и Бенсоном (7) о том, что после предварительного освещения растений происходит не только усиление фиксации  $CO_2$  в темноте в течение некоторого времени, но и дальнейшее восстановление, вплоть до образования углеводов и многих других продуктов за счет восстановителей, образующихся на

свету и накапливающихся при определенных условиях. Различия, наблюдаемые нами в нерастворимой фракции световой и темновой серий опытов, свидетельствуют о том, что эта фракция может образоваться только при непосредственном освещении или что передатчики энергии, обуславливающие реакции синтеза веществ нерастворимой фракции, не могут накапливаться в заметных количествах.

Данные, полученные в настоящей работе, показывают, что фиксация  $\text{CO}_2$  осуществляется на веществах, не растворимых в 80% спирте, что противоречит предположениям о низкомолекулярном характере первых промежуточных продуктов фотосинтеза и хорошо согласуется с предположениями Рубена (1), Е. А. Бойченко (2), А. М. Кузина и Р. Я. Школьник (6) о роли высокомолекулярных веществ в процессе фотосинтеза.

Полученные нами фракции не являются однокомпонентными. Представляет особый интерес проследить движение фиксированного  $\text{C}^{14}$  в отдельных индивидуальных веществах, входящих в ту или иную фракцию; это исследование нами и проводится в настоящее время.

Пользуюсь случаем выразить глубокую благодарность проф. А. М. Кузину, под руководством которого выполнено это исследование.

Институт биохимии им. А. Н. Баха и  
Лаборатория биофизики изотопов и излучений  
Академии наук СССР

Поступило  
12 V 1951

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. Ruben, M. Kamen and Hassid, *J. Am. Soc.*, **62**, 3443 (1940). <sup>2</sup> A. H. Brown, E. W. Fager and H. Gaffron, *Biol. Bull.*, **95**, 284 (1948). <sup>3</sup> M. Calvin and A. A. Benson, *Science*, **109**, 140 (1949). <sup>4</sup> A. A. Benson and M. Calvin, *Ann. Rev. of Plant Phys.*, **1**, 25 (1950). <sup>5</sup> E. W. Fager and J. L. Rosenberg, *Science*, **112**, 617 (1950). <sup>6</sup> А. М. Кузин и Р. Я. Школьник, *ДАН*, **73**, 355 (1950). <sup>7</sup> M. Calvin and A. A. Benson, *Science*, **107**, 476 (1948). <sup>8</sup> Е. А. Бойченко, *ДАН*, **64**, 545 (1949).