

Н. Г. ДОМАН

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ФОТОСИНТЕЗА

(Представлено академиком А. Н. Терениным 4 IX 1953)

За последние годы рядом авторов (¹⁻³) высказывается утверждение, что первым устойчивым продуктом фотосинтеза является фосфоглицериновая кислота, в карбоксильной группе которой было обнаружено основное количество меченого углерода, поглощаемого зелеными растениями при кратковременной экспозиции в атмосфере, содержащей $C^{14}O_2$. Принимая фосфоглицериновую кислоту за первичный продукт фотосинтеза, многие авторы предлагали при этом упрощенные схемы реакций, в сущности представляющие фотосинтез как обратимый процесс дыхания.

В указанных работах фосфоглицериновая кислота была обнаружена наряду с другими веществами как преобладающее по радиоактивности вещество, образовавшееся в течение нескольких секунд (обычно не менее 5 сек. (^{1,2})). К тому же в этот промежуток времени, как правило, не включалось время между окончанием экспозиции и убиванием материала. Наоборот, в работе Аронова с листьями высших растений, касающейся методики опытов (⁴), указывается, например, что после окончания экспозиции до момента фиксации материала проходило не более 10 сек., что является сравнительно большим промежутком, а в работе Кальвина и др. (¹) по фотосинтезу водорослей сообщается, что после экспозиции материал убивался возможно скорее, без указания времени. Принимая во внимание изложенные обстоятельства, а также различие объектов исследования, обуславливающее возможное различие как в скорости реакций образования тех или иных веществ, так и в самом их характере, мы считаем сомнительным утверждение, что фосфоглицериновая кислота является первым устойчивым продуктом фотосинтеза, и скорее склонны рассматривать накопление в ней радиоактивности как результат ряда превращений, что согласуется и с нашими опытами по фотосинтезу, в которых также отмечалось появление радиоактивности в хроматографической зоне фосфоглицериновых кислот после нескольких секунд экспозиции, правда, не в преобладающем количестве.

Настоящее сообщение, в котором существенное место отводится методике выделения веществ, служит цели быстреего выяснения природы первичных продуктов фотосинтеза.

Ранее нами было описано (⁵) выделение фракции веществ, образовавшихся при нормальных физиологических условиях в листьях фасоли за период $\frac{1}{2}$ -секундной экспозиции в присутствии $C^{14}O_2$, содержащей свыше 95% поглощенного меченого углерода. В другом сообщении (⁶) приводились доказательства в пользу того, что указанная фракция веществ действительно содержала первичные устойчивые продукты фотосинтеза, поскольку было показано, что между поглощенным меченым CO_2 и образованием этих веществ обнаруживается лишь нестойкое связывание $C^{14}O_2$

и, следовательно, не имеет места образование других устойчивых веществ, предшествующих выделенным во фракции. Возникла задача выделения индивидуальных веществ из смеси, составляющей фракцию. Для лучшей предварительной очистки выделяемых веществ перед последующим хроматографическим разделением их листья фасоли после экспозиции в атмосфере в присутствии меченого CO_2 мгновенно убивались погружением в кипящий 96% спирт. После извлечения растворимых в горячем спирте веществ листья быстро высушивались в вакууме. При этом обычно около 90% образовавшихся радиоактивных веществ не извлекались горячим спиртом и оставались в листьях, из которых затем почти полностью извлекались водой при комнатной температуре путем встряхивания на трясушке. Полученные водный и спиртовый экстракты упаривались в вакууме при 25°, причем сиропообразный остаток спиртового экстракта после испарения спирта обрабатывался петролейным эфиром для удаления пигментов. Затем вещества обеих фракций водного и спиртового извлечения, содержащие практически весь поглощенный меченый углерод, подвергались многократному хроматографическому разделению на бумаге.

Для хроматографического разделения веществ обычно использовались три различные смеси растворителей: 1) бутанола 74 мл + уксусной кислоты 20 мл + воды 50 мл; 2) метанола 80 мл + раствора аммиака 12,5 мл (d 0,928) + воды 27 мл; 3) фенол + вода до насыщения.

Уже первоначальное хроматографическое разделение веществ показало, что в составе обеих фракций имеется в основном два радиоактивных вещества: первое более подвижное при хроматографировании и второе менее подвижное (см. рис. 1 *а, б*). Для последующего хроматографического разделения веществ проводилась элюция всей радиоактивной зоны первых хроматограмм фракций водного и спиртового извлечения, затем растворы обеих фракций элюированных веществ соединялись вместе и концентрировались в вакууме при комнатной температуре. С целью выделения большего количества веществ исходное пятно наносилось в виде полоски. Оказалось, что первое и второе радиоактивные вещества водорастворимой фракции идентичны соответствующим веществам спирторастворимой фракции и при дальнейшем хроматографировании с использованием указанных растворителей не разделяются (см. рис. 1 *в*).

Таким образом, оказалось, что почти весь меченый углерод при $\frac{1}{2}$ -секундной экспозиции листьев фасоли в атмосфере, содержащей C^{14}O_2 , в процессе фотосинтеза переходит в два вещества, которые удается выделить в виде индивидуальных веществ. Как показали хроматограммы, ни первое, ни второе вещество не является фосфоглицериновыми кислотами. Заметим, однако, что оба вещества при хроматографировании на бумаге с использованием растворителей типа бутанол — уксусная кислота — вода и водонасыщенного фенола обычно располагаются в зоне локализации пятен трудно разделяемых фосфорных эфиров, в частности фосфоглицериновых кислот, что при недостаточно критическом рассмотрении результатов опыта может служить источником заблуждения.

Чтобы установить, какое из двух выделенных индивидуальных веществ образуется в процессе фотосинтеза раньше и какова взаимосвязь между ними, необходимо сравнить распределение радиоактивности между этими веществами в зависимости от времени экспозиции. Изучение хроматограмм, соответствующих $\frac{1}{2}$ и 2 сек. экспозиции (см. рис. 1), показало, что в первом веществе содержится основная часть радиоактивности и что по мере сокращения времени экспозиции доля радиоактивности в нем увеличивается за счет уменьшения ее во втором веществе. Например, если при 2-секундной экспозиции в первом веществе определено 60% радиоактивности и во втором 28%, то при $\frac{1}{2}$ -секундной экспозиции в первом веществе содержание радиоактивности возросло до 85%, а во втором снизилось до 12%.

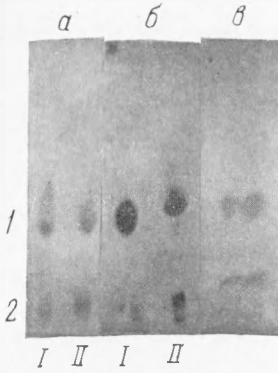


Рис. 1

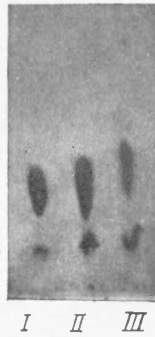


Рис. 2

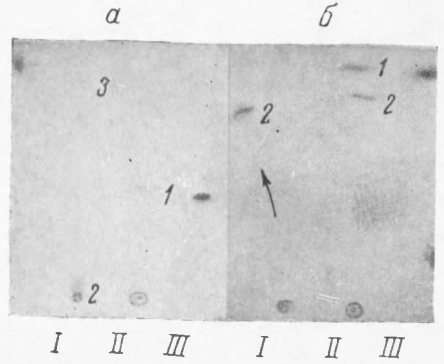


Рис. 3

Рис. 1. Радиоавтограмма первичного (а, б) и повторного (в) хроматографического разделения продуктов фотосинтеза. а — спирторастворимая фракция, б — водорастворимая фракция, в — смесь спирторастворимой и водорастворимой фракций. I — экспозиция 0,5 сек., II — экспозиция 2 сек., 1 — первое вещество, 2 — второе вещество

Рис. 2. Радиоавтограмма хроматографического разделения продуктов фотосинтеза, образовавшихся при разных температурах в течение 1 сек. I — 0°, II — 7–8°, III — 25°, I — первое вещество, 2 — второе вещество

Рис. 3. Радиоавтограмма хроматографического разделения продуктов гидролиза второго вещества в 1 N HCl при 100° 3 часа. а — растворитель бутанол, уксусная кислота, вода; б — растворитель метанол, аммиак, вода. I — второе вещество до гидролиза, II — второе вещество после гидролиза, III — первое вещество. 1 — первое вещество, 2 — второе вещество, 3 — неидентифицированный продукт гидролиза второго вещества

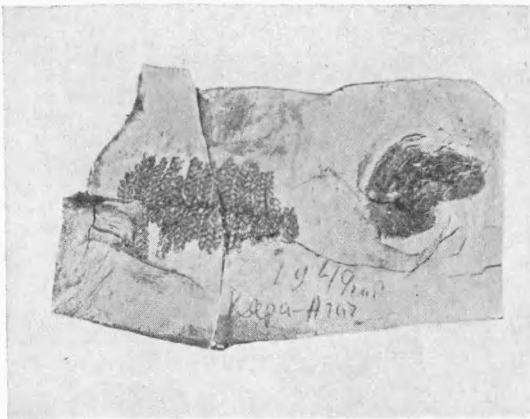


Рис. 1. *Azolla vera* Kryshn., урочище Карагач, образец 736, отпечаток; нат. вел.

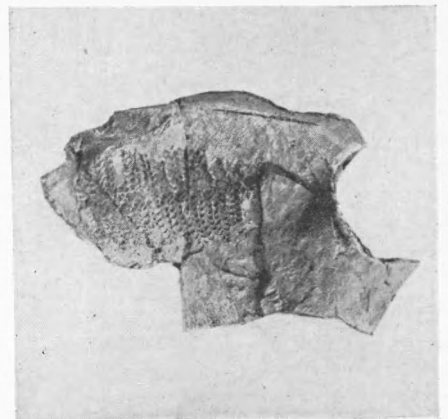


Рис. 2. *Azolla vera* Kryshn., урочище Карагач, образец 736, противоотпечаток; нат. вел.

Дальнейшее доказательство того, что первое вещество является первичным продуктом фотосинтеза, можно видеть в опытах с кратковременной экспозицией листьев в присутствии $C^{14}O_2$ при различной температуре. Результаты этих опытов, представленные на хроматограммах (рис. 2) и в табл. 1, показывают, что при 1-секундных экспозициях листьев фасоли основное количество радиоактивности содержится в двух выделенных нами веществах, условно называемых «первое» и «второе», и что понижение температуры замедляет процесс превращения первого вещества во второе.

То, что действительно здесь имеет место превращение первого вещества во второе, а не одновременное образование их с различной в зависимости от условий скоростью, показывает гидролиз второго вещества в 1 M HCl, в результате которого образуется вещество, идентичное с первым (см. рис. 3 а, б). Вместе с тем, как это заметно на хроматограммах рис. 3 а, в результате гидролиза второго вещества, кроме первого вещества, образуется также другое радиоактивное вещество.

Чтобы узнать, не потеряло ли данное вещество своей физиологической активности в процессе выделения, была произведена инфильтрация его в листья фасоли. Эти опыты показали, что физиологической активности выделенное вещество не потеряло, так как после инфильтрации его на листьях не было замечено никакого вредного влияния и оно быстро превращалось в другие вещества, причем это превращение происходило как на свету, так и в темноте.

Природа выделенного вещества нами в настоящее время исследуется. Показано, что оно имеет кислотный характер. В электрическом поле оно движется к аноду. Выделенное вещество, повидимому, состоит из двух близких форм, что обуславливает размытость пятна на хроматограмме. Фосфора оно не содержит.

Первое вещество легко ацетируется, что говорит о наличии в нем гидроксильных групп. Характерно выраженного спектра поглощения оно не дает. Указанное вещество проходит при диализе через различные полупроницаемые перепонки, что свидетельствует о том, что оно не является высокомолекулярным.

Необходимо отметить большую способность данного вещества адсорбироваться комплексом растительных соединений белковой природы, находящихся в растворах и в осадке. Такая связь первичных продуктов фотосинтеза с указанным комплексом, с протоплазмой, несомненно, имеется и в листьях. И если не иметь в виду индивидуально изолируемое стойкое вещество, то в этом смысле можно говорить о высокомолекулярном характере первичного продукта фотосинтеза.

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

Поступило
26 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Calvin, A. A. Benson, *Science*, **109**, 140 (1949). ² S. Aronoff, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **32**, 237 (1951). ³ E. W. Fager, J. L. Rosenberg, *ibid.*, **37**, 1 (1952). ⁴ S. Aronoff, L. Vernon, *ibid.*, **28**, 424 (1950). ⁵ Н. Г. Доман, *ДАН*, **84**, 1017 (1952). ⁶ Н. Г. Доман, *ДАН*, **85**, 607 (1952).

Таблица 1

Результаты опытов при экспозиции 1 сек.

Т-ра опыта в°	Общая радиоактивность в %	
	вещество 1	вещество 2
25	68	24
7—8	83	13
0	93	4