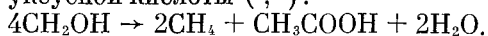


Е. С. ПАНЦХАВА

**ВЛИЯНИЕ ВИДИМОГО СВЕТА НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА
ИЗ МЕТИЛ-В₁₂ БЕСКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ
МЕТАНОВАЦИЛЛУС КУЗНЕСЕОВИИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 V 1972)

Термофильная культура *Mbac. kuznesoevii* сбраживает метанол с образованием метана и уксусной кислоты (^{1, 2}):



Бесклеточные экстракты этой культуры образуют метан и уксусную кислоту из метанола, формальдегида, CO₂, пировиноградной кислоты и метил-В₁₂. При изучении условий образования метана из СН₃-В₁₂ указанными препаратами было установлено стимулирующее влияние видимого света на этот процесс.

Культура *Mbac. kuznesoevii* выращивалась на среде Баркера (¹) при $T = 55^\circ$ на метаноле в темноте. Клетки отделялись центрифугированием, промывались калий-фосфатным буфером 0,05 *M* pH 7, центрифугировались вновь, и полученная биомасса разводилась в калий-фосфатном буфере в отношении 1 : 1,5. Калий-фосфатный буфер содержал 5 мМ MgCl₂ · 2H₂O, 0,6 мМ Na₂S · 9H₂O, 0,9 мМ пируват натрия. Клеточные суспензии в замороженном состоянии (-70°) подвергались разрушению на френч-прессе. Неразрушенные клетки и крупные осколки клеток отделялись сепарированием при 20 000 *g* в течение 30 мин. СН₃-В₁₂ синтезировали из СН₃J и CN-В₁₂ по методу Вейсбаха и др. (³). Все исследования проводились в пенициллиновых сосудах в атмосфере Н₂ или N₂ при комнатной температуре 20° и температуре 55° в аппарате Варбурга. Для освещения использовались лампы накаливания мощностью 60, 65 и 200 вт. Контрольные сосуды закрывались плотным черным материалом в несколько слоев. Образование СН₄ определялось на газовом хроматографе ЛХМ-8М с колонкой из силикагеля с использованием пламенно-ионизационного детектора, газ-носитель гелий, температура 100°.

В табл. 1 приведены данные по влиянию видимого света на образование СН₄ из СН₃-В₁₂ бесклеточными экстрактами *Mbac. kuznesoevii*. Опыт проводился с нативными и прогретыми при 100° в течение 5 мин. экстрактами. Все сосуды предварительно инкубировались в течение 60 мин. при 55 и 20° в темноте, а затем подвергались освещению в течение 40 мин. при температуре 55 и 20° 60-ваттной лампой накаливания. Был также поставлен контроль на инкубационную смесь, в которую вместо белка вводилось равное по объему количество калий-фосфатного буфера.

Как видно из табл. 1, видимый свет указанной мощности оказал влияние на образование метана из СН₃-В₁₂ в контрольном варианте, куда не был включен белок.

Видимый свет оказывает стимулирующее влияние на образование метана из метил-В₁₂ бесклеточными экстрактами *Mbac. kuznesoevii* как при 55°, так и при 20°. При этом термофильные условия в сочетании с освещением дают более высокий выход метана в атмосфере Н₂. В темноте образование метана наблюдалось только при 55°, т. е. температуре, оптимальной для данной культуры.

Таблица 1

Влияние видимого света на образование метана из метил-В₁₂ бесклеточными экстрактами *Mbас. kuznesoevii*

Вариант	Т-ра предын- кубирован- ия, °С	Т-ра ста- ции осве- щения, °С	Количество выделившегося СН ₄ , μмол.			
			Н ₂		N ₂	
			темнота	свет	темнота	свет
1. Экстракт	20	20	0	0	—	—
2. Экстракт прогретый при 100°	20	20	0	29	—	—
3. Нативный экстракт	55	55	41	120	2,7	44
4. Нативный экстракт	20	20	0	59	0	71

Примечание. Инкубационная смесь (1,3 мл) содержала 0,05 моля калий-фосфатного буфера pH 7, 5 ммол. MgCl₂·2H₂O, 0,6 ммоль Na₂S·9H₂O, 15,5 мг белка, 0,5 μ моля СН₃-В₁₂. Расстояние между осветителем и объектом 30 см.

Таблица 2

Влияние видимого света на образование СН₄ из СН₃-В₁₂ бесклеточными экстрактами *Mbас. kuznesoevii* при разных условиях инкубирования

Количество бесклеточного экстракта, мг белка	Количество Na ₂ S·9H ₂ O, ммол.	Образовано СН ₄ , μмол.	
		атмосфера Н ₂	атмосфера О ₂
—	—	5,3	0
23	—	63,0	0
—	0,6	17,0	0
23	0,6	63,0	1,9

Примечание. Инкубационная смесь (1,2 мл) содержала 0,05 моля калий-фосфатного буфера pH 7,5 ммол. MgCl₂·2H₂O, 0,24 моля СН₃-В₁₂, t = 20°, лампа 200 вт, расстояние между лампой и объектом 30 см, время инкубации 25 мин.

Таблица 3

Влияние света на образование СН₄ из СН₃-В₁₂ бесклеточными экстрактами *Mbас. kuznesoevii* без предварительного инкубирования в темноте

Вариант	Количество экстракта, мг белка	Образовано СН ₄ , μмол.	
		атмосфера Н ₂	атмосфера N ₂
1	—	5,7	5,0
2	30 прогретый	25,0	28,0
3	30	56,2	62,0

Примечание. Инкубационная смесь 1,3 мл содержала 0,05 моля калий-фосфатного буфера pH 7,5 ммол. MgCl₂·2H₂O, 0,6 ммоль Na₂S·9H₂O, 0,48 μмоля СН₃-В₁₂, время инкубации 40 мин., лампа накалывания 20 вт, расстояние осветителя до объекта 30 см, t = 55° в аппарате Варбурга

При инкубировании в атмосфере Н₂ свет оказывал более сильное воздействие на образование метана, чем в атмосфере N₂, хотя эффект света при инкубировании при комнатной температуре как в атмосфере Н₂, так и в атмосфере N₂ были почти одинаковы.

Особый интерес представляет образование метана под воздействием света при инкубировании прогретого экстракта. Если в темноте прогретый экстракт не образует метана, то на свету выход газа близок к количеству метана при инкубировании нативного экстракта в обычных условиях (55°, отсутствие освещения).

Воздух ингибирует образование метана при действии света (табл. 2). Небольшие количества метана, образующиеся в атмосфере кислорода в присутствии Na₂S в инкубационной смеси, видимо, объясняются действием последнего, как сильного восстановителя. В отличие от предыдущего опыта, в описываемом эксперименте использовалась более мощная лампа накалывания (200 вт), чем, видимо, и объясняется образование незначительных количеств метана в атмосфере Н₂ при отсутствии в инкубационной смеси бесклеточного экстракта, причем введение в среду Na₂S·9H₂O повышало абиогенный синтез метана. Возможно, что при воздействии света метил-В₁₂ образует метильный радикал с высокой реакционной способностью, который в присутствии такого восстановителя, как Na₂S, восстанавливается до метана. Введение в инкубационную смесь бесклеточного эк-

ракта резко увеличивает синтез метана, что подтверждает вышеприведенное предположение о необходимости участия каких-то соединений биологической природы для синтеза метана из $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ с воздействием света. Таким образом, фотообразование CH_4 — процесс анаэробный, и с увеличением мощности осветителя возможно незначительное абиогенное образование метана. Отсутствие разницы в количествах CH_4 во 2 и 4 вариантах объясняется тем, что сам бесклеточный экстракт был получен с буфером, содержащим Na_2S .

В табл. 3 приведены результаты эксперимента, в котором освещение объекта проводилось без предварительного инкубирования в темноте. Указанные условия эксперимента привели к тому, что выход метана как в атмосфере H_2 , так и в атмосфере N_2 был одинаков. Очевидно предварительная инкубация при 55° влияет на активность ферментов, участвующих в синтезе метана (см. табл. 1).

Так же как и во втором эксперименте, наблюдается абиогенное образование CH_4 независимо от атмосферы инкубации, что, очевидно, указывает на значительную роль в этом процессе сульфида натрия как восстановителя.

Прогретый экстракт значительно увеличивает образование метана независимо от газовой атмосферы. Это позволяет предположить наличие каких-то соединений биологической природы, которые под воздействием света, даже в отсутствие активных белков, способны стимулировать синтез метана. Выход метана повышается в 5 раз по сравнению с абиогенным синтезом. При инкубировании с нативным экстрактом выход метана увеличивается в 10 раз по сравнению с абиогенным синтезом и вдвое по сравнению с прогретым экстрактом. Последнее предполагает, что в фотообразовании метана из $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ необходимо участие нативных ферментативных систем.

Таким образом, можно предполагать, что бесклеточные экстракты *Mbас. kuznesoevii* обнаруживают фотоэффект при синтезе CH_4 из $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$. Интенсивность синтеза зависит от целого ряда условий инкубации и освещения.

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

Поступило
17 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. С. Панцхава, В. В. Пчелкина, ДАН, **182**, 457 (1968). ² Е. С. Панцхава, В. В. Пчелкина, Прикл. биохим. и микробиол., **5**, 416 (1969). ³ Н. Weissbach, A. L. Peterkofsky et al., J. Biol. Chem., **238**, 3318 (1963).