

В. В. СААХОВ, И. Х. ЛЕМБЕРГ, Г. Д. НАЗАРОВА, А. Б. ГИРШИН,  
Г. М. ГУСИНСКИЙ, Э. В. МЫЛЬНИКОВА

## О КИСЛОРОДНОМ ОБМЕНЕ МЕЖДУ ВОДОЙ И КСАНТОФИЛЛАМИ

(Представлено академиком М. Х. Чайлаляном 14 VIII 1969)

В процессе фотоокисления воды кислород гидроксильных групп вовлекается в реакции обмена с кислородным фондом молекул ксантофиллов (1-7). В то же время однозначно не решен вопрос о том, какие кислородсодержащие группы ксантофиллов принимают участие в реакциях обмена (3-5).

В настоящей работе делается попытка оценить действие света на включение кислорода в молекулы антраксантина и зеаксантина, выделенных из эвглени.

При проведении новых опытов, связанных с изучением обмена кислорода в молекулах каротиноидов на основе детектирования изотопа —  $O^{18}$ , мы старались усовершенствовать физическую и биохимическую методики постановки эксперимента и избавиться от погрешностей предыдущих исследований (3-6).

Отцентрифугированный осадок эвглени ресуспендировали в воде, обогащенной по кислороду (обогащение по  $O^{18}$  60%). Часть суспензии эвглени выставляли в течение 30 мин. на сильный свет (40 тыс. лк), вторая порция водорослей находилась в темноте. В период экспозиции на  $H_2O^{18}$  суспензию водорослей постоянно перемешивали. По окончании экспозиции водоросли центрифугировали, осадок фиксировали ацетоном. Экстракт пигментов омыливали 30% КОН в метаноле, каротиноиды переводили в смесь петролейного и диэтилового эфиров (1 : 1). Эфирную вытяжку каротиноидов пропускали первоначально через колонку с  $Al_2O_3$ . Фракции каротиноидов вымывали с колонки растворителем с возрастающим градиентом полярности. Выделенные после колонки каротиноиды поступали на дальнейшую очистку. В отдельных случаях вместо хроматографирования на колонке смесь каротиноидов на первом этапе разгоняли в чистом петролейном эфире и выделяли фракцию каротина. В процессе хроматографирования каротиноидов на колонке или на бумаге с петролейным эфиром в значительной мере удаляются бесцветные кислородсодержащие соединения, способные быть источником ошибок при детектировании изотопа  $O^{18}$  в ксантофиллах. Второе хроматографирование фракций каротиноидов или суммы ксантофиллов проводилось на бумаге в смеси петролейного эфира и ацетона (6 : 1).

В результате хроматографирования в этой смеси растворителей выделялись основные зоны ксантофиллов: неоксантин, зеаксантин и антраксантин. Каждую фракцию пигментов, взятую в опыт, подвергали 4-6-кратной очистке в различных системах растворителей (8-11). Растворители подбирали таким образом, чтобы при последовательных актах хроматографирования возможно сильнее изменялось место расположения пигмента на хроматограмме.

Проведенные нами специальные исследования по оценке изменения удельной активности (у.а.) меченных по углероду антраксантина и зеаксантина показывают, что уже при третьем-четвертом последовательном хроматографировании кривая изменения у.а. препаратов выходит на плато. Похожие данные получены также для каротина.

Выделенные после 5-6 хроматографирования фракции каротиноидов

наносили в центры никелевых подложек, в круге диаметром 10 мм. Предварительными опытами было установлено, что точность нанесения количества пигмента на никелевую подложку составляет  $\pm 15\%$ .

В опыт брали от 2 до 6 параллельных проб пигмента одного варианта. Подложки с нанесенными мишенями ксантофиллов облучали  $\alpha$ -частицами, ускоренными на циклотроне Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе АН СССР. Для активации использовали ядерную реакцию  $O^{18}_{(\alpha,n)}Ne^{21}$ . Ядро  $Ne^{21}$  переходя в основное состояние, испускает  $\gamma$ -кванты с  $E = 350$  кэв, которые детектировали при помощи сцинтилляционного спектрометра с кристаллом  $NaJ(Tl)$  и многоканального анализатора амплитуды импульсов. Выход  $\gamma$ -лучей нормировали на все мишени и количество тока, перенесенного бомбардирующими  $\alpha$ -частицами. Подробно методику активации  $O^{18}$  изложены в работе (12). В предварительном опыте была показана хорошая воспроизводимость параллельных проб, а также оценено влияние повторного облучения мишени на выход реакции активации. Ниже в условных единицах приведены выходы  $\gamma$ -лучей при активации трех параллельных мишеней антраксантина, обогащенного изотопом  $O^{18}$ . При первичном облучении они составляют 214; 260; 264; при повторном облучении этих же мишеней выход реакции активации был соответственно 120; 162; 137.

В опыт было взято шесть параллельных проб препарата антраксантина, выделенного из эвглены, экспонированной на свету на  $H_2O^{18}$ , и пять параллельных проб этого же пигмента, но выделенного из темновой суспензии водоросли, выдержанной на  $H_2O^{18}$ . Представилось возможным выделить лишь по три параллельных пробы зеаксантина для каждого варианта. Фоновыми контролями служили пробы антраксантина и зеаксантина, выделенные из суспензии эвглены, выращенной на воде с обычным изотопным обогащением по кислороду. Контроль качества очистки пигментов осуществляли по препаратам каротина, выделенным из суспензии эвглены, экспонированной на  $H_2O^{18}$ . Это было обусловлено тем, что в проведенных ранее экспериментах (5) в препаратах каротина, молекула которого не содержит атомов кислорода, тем не менее обнаружился большой выход  $\gamma$ -лучей, связанный с наличием  $O^{18}$ .

Из данных табл. 4 видно, что световые и темновые препараты антраксантина и зеаксантина характеризуются большим выходом  $\gamma$ -квантов с энергией  $E = 350$  кэв, связанных с реакцией  $O^{18}_{\alpha,n}Ne^{21}$ . Радиоактивность фоновых, не обогащенных искусственно изотопом  $O^{18}$ , препаратов в 20—25 раз ниже образцов, экспонированных на меченом субстрате. Дополнительным критерием качества радиохимической очистки экспериментального материала служит весьма низкий уровень радиоактивности в препаратах каротина, полученного из светового варианта опыта с  $H_2O^{18}$ .

Таким образом, первый вывод из анализа табл. 4 заключается в достаточно достоверной регистрации включения изотопа кислорода  $O^{18}$  из тя-

Таблица 4

Наведенная радиоактивность во фракциях ксантофиллов эвглены в расчете на 100  $\mu$ г пигмента и 1 микрокулон заряда (отн. ед.)

Вариант опыта и фракция пигмента	Параллельные пробы						Средняя проба
	1	2	3	4	5	6	
Антраксантин-18 световой	180	205	170	200	149	169	179
Антраксантин-18 темновой	128	139	145	128	113		130
Зеаксантин-18 световой	188	154	180				174
Зеаксантин-18 темновой	118	111	112				114
Антраксантин-16 световой	6	8					7
Зеаксантин-16 световой	4	6	8				6
Каротин-18 световой	8	12	2				7

желокислородной воды в молекулы антераксантина и зеаксантина как на свету, так и в темноте.

Табл. 1 позволяет выяснить влияние света на степень обмена кислорода молекул антераксантина и зеаксантина с кислородом воды. Полученные материалы указывают на более энергичный обмен фонда кислорода пигментов и воды на свету, чем в темноте. Отношение приведенной радиоактивности световых препаратов ( $C_B$ ) антераксантина и зеаксантина к соответствующим темновым препаратам ( $T_B$ ) довольно близко: для антераксантина  $C_B/T_B = 1,38$ , для зеаксантина  $C_B/T_B = 1,52$ . Таким образом, возникает возможность сделать вывод о стимуляции светом скорости обмена кислорода воды с кислородными группами ксантофиллов антераксантина и зеаксантина.

На основании ранее известных фактов можно было ожидать, что у.а. препаратов антераксантина будет выше, чем у зеаксантина, ибо в составе молекулы антераксантина есть одна эпоксидная группа, кислород которой, как можно было ожидать, должен активно обмениваться с кислородом воды. Однако, по нашим данным, отношения у.а. световых препаратов антераксантина и зеаксантина и отношения у.а. темновых препаратов этих пигментов близки к единице: у.а. антераксантина  $C_B$ /у.а. зеаксантина  $C_B = 1,03$ ; у.а. антераксантина  $T_B$ /у.а. зеаксантина  $T_B = 1,14$ .

Представленные данные (с учетом ошибок опыта) не позволяют считать, что в антераксантин включается больше атомов кислорода из воды, чем в зеаксантин. Учитывая химическое строение данных пигментов и предполагая, что обмен кислорода гидроксильных и эпоксидных групп ксантофиллов происходит с одинаковой интенсивностью, следует ожидать, что отношение у.а. этих ксантофиллов равно 3 : 2. Правда, есть указания (7), что в процессе двукратного хроматографирования происходит потеря метки по  $O^{18}$  в виолаксантине на 41%, а в лютеине на 39%. Величина потери метки у обоих пигментов в пределах ошибки определения одинакова. Если предположить в этой связи, что равное количество актов хроматографирования антераксантина и зеаксантина не меняет отношение начальных уровней у.а. этих двух пигментов, а также тот факт, что есть определенная вероятность включения молекулярного  $O_2^{18}$  в эпоксидную группу антераксантина (8), то можно высказать предположение об активном обмене гидроксильных групп ксантофиллов с кислородом или гидроксильными группами воды.

Таким образом, в настоящей работе представлены данные, показывающие возможность светового и темнового обмена фонда кислорода ксантофиллов и кислорода воды. Из наших предварительных данных следует, что вероятно обмен происходит по гидроксильным группам пигментов. Свет стимулирует реакции обмена кислорода воды и пигментов.

Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений

Сибирского отделения Академии наук СССР  
Иркутск

Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
5 VIII 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. D. Dorough, M. Calvin, J. Am. Chem. Soc. 73, 5, 2362 (1951).  
<sup>2</sup> E. Shepeour, M. Calvin, Nature, 196, 4853, 439 (1962). <sup>3</sup> Д. И. Сапожников, Д. Г. Алхазов и др., Бот. журн., 46, 4, 613 (1961). <sup>4</sup> Н. У. Уомомото et al., Arch. Biochem. and Biophys., 96, 3, 645 (1962). <sup>5</sup> Д. И. Сапожников, Д. Г. Алхазов и др., ДАН, 194, № 4, 974 (1964). <sup>6</sup> В. С. Сааков, ДАН, № 5, 1212 (1964). <sup>7</sup> Д. И. Сапожников, В. М. Кутюрин и др., ДАН, 175, № 5, 1182 (1967). <sup>8</sup> С. А. Takeguchi, Н. У. Yamamoto, Biochim. et biophys. acta, 153, 2, 459 (1968). <sup>9</sup> Г. Н. Луценко, В. С. Сааков, Информ. бюлл. координац. совета зоны Сиб. и Дальн. Вост., № 5, 35 (1969). <sup>10</sup> В. С. Сааков, Г. А. Ширяева, Тр. Бот. инст. АН СССР, Эксп. бот., 18, 156 (1967). <sup>11</sup> В. С. Сааков и др., Информ. бюлл. координац. совета зоны Сиб. и Дальн. Вост., № 4, 82 (1969). <sup>12</sup> И. Х. Лемберг и др., Зав. лаб., 32, 12, 1499 (1966).